

## 恶性疟原虫体外培养的不同步化方法

郝明明 杨照青\*

**摘要** 本文就恶性疟原虫体外培养的不同步化方法加以综述,主要对恶性疟原虫的不同步化方法,如传统的浓度分离法、渗透压分离法、Percoll梯度法、温度周期法、阿非迪霉素法,及近几年发展起来的磁性分离法及流式细胞分析法进行了介绍。

**关键词** 恶性疟原虫;不同步化;体外培养

中图分类号:R531.3 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)9-1154-03

Synchronization of *in vitro* culture of *Plasmodium Falciparum*. HAO Ming-ming, YANG Zhao-qing. (Department of the Parasitology, Kunming Medical University, Kunming, 650031, Yunnan P.R. China. Corresponding author: YANG Zhao-qing, Email zhaoqingy92@hotmail.com)

**Abstract:** The recent synchronization methods of *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum*, the traditional density method, the osmotic lysis method, the Percoll gradient method, the temperature cycling method and aphidicolin treatment method were discussed in this paper and recently developed methods such as the magnetic separation and the flow cytometric analysis were also introduced.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*; Synchronization; *in vitro* culture

疟疾是热带和亚热带地区最常见的寄生虫病之一。目前,发现有50多种疟原虫可以导致哺乳动物患病,但是能够引起人类患病的只有恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫、诺氏疟原虫五种<sup>[1-4]</sup>。2003年,全球每年因罹患疟疾死亡人数高达150万人,尤其是撒哈拉以南的非洲儿童更是深受其害<sup>[5]</sup>。人们与疟疾的斗争也从未停息过,并取得了可观的效果。短短几年之后,WHO在报道中就指出:到2009年新发病例将降至20~30万,死亡人数也将降至60~90万。但是,在疟疾流行区的国家中,疟疾仍是导致人类死亡的主要原因,流行范围也呈现出扩大趋势<sup>[6]</sup>。因此,防治疟疾的任务仍然很严峻。

周期性发热是疟疾的典型临床症状之一,主要原因:在宿主与恶性疟原虫的共同作用下导使其在宿主内生长状态相当同步<sup>[7]</sup>,裂殖子在红细胞内的释放也比较同步<sup>[8]</sup>。其中,单等位基因家族SAF(Single-allelic-family)与不同步化状态有密切的联系<sup>[7]</sup>。然而,恶性疟原虫在体外培养的无性繁殖过程中却呈现出生长的不同步化状态。在科学研究过程中,保持疟原虫体外培养的不同步化生长非常必要。例如:疟原虫不同步化在其各期生长的精确时间的研究中<sup>[9]</sup>,及其基因研究中(特别是随着恶性疟原虫基因序列的测定完成<sup>[10-13]</sup>),其作用显得日趋重要。通常,恶性疟原虫的不同步化方法大体可以分为收集早期滋养体和收集后期

滋养体。

### 1 常见的不同步化方法

1.1 浓度分离法(The density method)是1978年由Jensen JB最早提出的用于恶性疟原虫不同步化的方法之一。该方法基于被恶性疟原虫感染的红细胞沉降速度受原虫不同发育阶段的影响,其沉降速度也不同。此方法可以分离出各个时期的疟原虫,但不同步化程度相对较低。

1.2 渗透压分解法(The osmotic lysis method)是1979年由Lambros C和Vanderberg JP首先提出来的。具体做法:在环状体感染率相对较高时加入5%的D-山梨醇,室温下静止5min,然后离心后弃掉上清液,连续处理两个周期。该方法相对较廉价,且操作较简单,但是由D-山梨醇对虫体有一定的毒性,需要消耗较长的时间来恢复虫体的健康状态。是目前最经典的同步化方法,同时也是被广泛采用的同步化方法。时至今日,该方法仍然被广泛采用。

1.3 Percoll梯度法(Percoll gradient method)该方法又分为无山梨醇法,山梨醇法及葡萄糖联合法。Nilni EA, Londner MV及Spira DT三人在1981年提出。由于被感染红细胞的细胞膜在最初的6h之内才有很好的渗透耐受性,所以利用这一差别,将Percoll配置成不同的浓度梯度来分离各期疟原虫。同步化后的原虫仍然有很强的感染新鲜红细胞的能力。由于该方

基金项目:国家自然科学基金(No.30960050, No.81161120421)

作者单位:昆明医科大学基础医学院病原生物学教研室,云南 昆明 650500

作者简介:郝明明(1984-),男,汉族,山东人,在读硕士研究生,研究方向:恶性疟原虫种群抗药性的研究。

\*通讯作者 Email zhaoqingy92@hotmail.com

法可以分离出各个时期的疟原虫,所以仍很多研究人员在应用。但是该方法需要精确的仪器和较为严格的操作。

1.4 温度周期法<sup>[14]</sup> (Temperature cycling method)早在1989年 Dominic Kwiatkowski 就发现40℃下培养疟原虫24h就可以获得同步化的效果。在此基础上,进一步研究发现了该方法。其原理和做法是:恶性疟原虫在不同的发育时期需要的发育时间是不同的,且在某个时期升高和降低培养温度,会抑制疟原虫此时的进一步发育,先使疟原虫停止在成熟滋养体期,然后将培养温度恢复到37℃,此时疟原虫会很快发育到裂殖体,最后裂殖子同时释放并侵染红细胞,从而达到同步化的效果。

1.5 Plasmion 富集法<sup>[15]</sup> (Plasmion enrichment method)和 Plasmagel 富集法 (Plasmagel enrichment method)。Plasmion 富集法是根据恶性疟原虫各期对 Plasmion 处理后反应的不同,利用 Plasmion 来获得高效的同步化结果。具体方法是:1)用含有 Plasmion 的培养基处理并进行一段时间的体外培养,从而获得含有后期滋养体的红细胞。2)用刀豆球蛋白A将其变成单层细胞形式。3)培养一段时间后就得到同步化程度很高的环状体期的恶性疟原虫。此方法操作简单,而且不需要特殊的仪器设备。不足之处就使不易把握后期培养时间。Plasmagel 富集法与之相似,但是由于适用范围窄而没有被广泛应用,所以被 Plasmion 富集法逐渐替代。

1.6 阿非迪霉素法<sup>[16]</sup> (Aphidicolin)阿非迪霉素是真核细胞 $\alpha$ -DNA-聚合酶的抑制因子,能够可逆性的阻断恶性疟原虫DNA复合物的合成,从而使成熟滋养体和裂殖体不能进一步发育。另外,阿非迪霉素也能可逆性阻断环状体和早期滋养体的进一步发育。阻断主要发生于裂殖子感染红细胞后的30h之后,因此,阿非迪霉素法用于高密度无性繁殖期的同步化。

1.7 磁性分离法<sup>[17-19]</sup> (Magnetic separation method)是由 Staalsoe 发现,后经 Thi Trang 等人改进而逐步完善的。该方法的原理是:1)疟原虫利用血红蛋白的代谢产物之一是疟色素。裂殖体期的疟原虫代谢产生的疟色素最多,而其他期产生的疟色素甚微;2)疟色素含有Fe<sup>3+</sup>,而血红蛋白含有Fe<sup>2+</sup>;3)Fe<sup>3+</sup>的顺磁效应(Paramagnetic effect)要比Fe<sup>2+</sup>强得多,因此Fe<sup>3+</sup>在磁场中产生的磁吸引力(Magnetic attraction)也大得多;4)利用磁性吸附柱(Magnetic bead column)可以将裂殖体分离出来,从而达到同步化的目的。同步化后的裂殖体仍有很强的侵染新鲜红细胞的能力。但是该方法需要特殊的仪器,投资较大。

1.8 流式细胞分析法<sup>[20]</sup> 基于细胞内染色法,在培养基中加入不同的染色剂,培养一段时,恶性疟原虫体内就会含有不同的染色剂,再根据染色剂荧光度值的不同,用流式细胞分析仪进行分离而得到生长状态高度同步的恶性疟原虫细胞。但是,该方法需要价格昂贵的流式细胞分析仪,投资较大,不适合有资金困难的实验室。

## 2 结语

目前用于恶性疟原虫同步化的方法有很多。作为传统的同步化方法,渗透压分解法已使用多年。总体来说,渗透压分解法适用各种实验室,实验结果也较稳定可靠,操作步骤也较简单,也不需要特殊的仪器设备,但是由于山梨醇对恶性疟原虫有一定的毒性作用,尤其是其感染新鲜红细胞的能力受到严重的损害,往往需要培养两个生长周期才能恢复正常的生长状态。因此,该方法好时较长。浓度分离法虽原理和操作都很简单,但是同步化效果较差,影响实验数据的精确性。Percoll 梯度法可以分离出各个时期的疟原虫,但是其同步化效果稍差一些。Plasmion 富集法和 Plasmagel 富集法的作用原理和操作过程相似,但由于 Plasmagel 在使用范围上得限制而逐渐被 Plasmion 替代。以上方法在疟原虫自然感染红细胞后均不能达到极高水平的同步化效果。磁性分离法和流式细胞分析法是目前较新的同步化法,它克服了应用山梨醇同步化后对疟原虫感染力的影响,而且也克服了以上方法的共同缺点,但是这两种法都需要一些特殊的仪器设备,资金耗费较大。因此,它们均不适合有资金困难的实验。

## 参考文献:

- [1] Kantele A, Jokiranta TS. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*[J]. *Clinical Infectious Dis*, 2011, 52(11):1356.
- [2] Barber BE, William T, Jikal M, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in children[J]. *Emerg Infectious Dis*, 2011, 17:814-820.
- [3] White N. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite[J]. *Clinical Infectious Dis*, 2008, 46(2):172-173.
- [4] Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening[J]. *White, NJ*, 2008, 46(2):165-171.
- [5] Rouzine IM, McKenzie FE. Link between immune response and parasite synchronization in malaria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(6):3473.
- [6] Aregawi M, Cibulskis R, Otten M, et al. World Malaria Report, 2008//: World Health Organization; 2008.
- [7] Touré-Ndouo FS, Zang-Edou ES, Bisvigou U, et al. Relationship between in vivo synchronicity of *Plasmodium falciparum* and allelic diversity[J]. *International Parasitol*, 2009, 58(4):390-393.

- [8] Ahn SY, Shin MY, Kim YA, et al. Magnetic separation: a highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic Plasmodium falciparum[J]. Parasitol Research, 2008, 102(6):1195-1200.
- [9] Lisa RC, Abhinav S, Georgina H, et al. New synchronization method for Plasmodium falciparum[J]. Malaria J, 2010, 9.
- [10] Hall N, Pain A, Berriman M, et al. Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 1, 3, 9 and 13[J]. Nature, 2002, 419(6906): 527-531.
- [11] Gardner MJ, Shallom SJ, Carlton JM, et al. Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14[J]. Nature, 2002, 419 (6906):531-534.
- [12] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498-511.
- [13] Florens L, Washburn MP, Raine JD, et al. A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle[J]. Nature, 2002, 419(6906): 520-526.
- [14] Haynes JD, Moch JK. Automated synchronization of Plasmodium falciparum parasites by culture in a temperature-cycling incubator[J]. Methods Molecular Med, 2002, 72:489-498.
- [15] Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for Plasmodium culture synchronization[J]. Experimental parasitology, 2005, 109(3):195-197.
- [16] Naughton J, Bell A. Studies on cell-cycle synchronization in the asexual erythrocytic stages of Plasmodium falciparum[J]. Parasitol, 2007, 134(3):331.
- [17] Spadafora C, Gerena L, Kopydlowski KM. Comparison of the in vitro invasive capabilities of Plasmodium falciparum schizonts isolated by Percoll gradient or using magnetic based separation[J]. Malaria J, 2011, 10(1):96.
- [18] Trang DTX, Huy NT, Kariu T, et al. One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells[J]. Malaria J, 2004, 3(1):7.
- [19] Reed MB, Caruana SR, Batchelor AH, et al. Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in Plasmodium falciparum is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion [J]. Proceedings of the National Academy of Sci, 2000, 97(13):7509.
- [20] Jouin H, Daher W, Khalife J, et al. Double staining of Plasmodium falciparum nucleic acids with hydroethidine and thiazole orange for cell cycle stage analysis by flow cytometry[J]. Cytometry Part A, 2004, 57 (1):34-38.

收稿日期 2012-07-05 编辑 崔宜庆

(上接第1130页)

比例分别为:42.3%、28.5%、23.0%、19.8% ,碘适宜比例分别为 32.5%、36.5%、32.5%、34.9% ,碘高于适宜量比例分别为 :13.7%、21.5%、24.2%、21.0% ,碘过量比例分别为 :11.6%、13.5%、20.4%、24.3%。结果见表3。

**表3 海口市2010~2011年育龄妇女尿碘结果统计表****Table 3 The results of women of childbearing age iodine in urine, Haikou City, 2010-2011**

	孕妇及哺乳期 妇女	非妊娠期 女	育龄妇女 (合计)
碘量分布 Iodometric distribution	Pregnant and lactating women	Non-preg nant women	Women of childbearing age (Total)
碘不足比例(%) Ratio of inadequate iodine (%)	61.7	24.5	28.7
碘适宜比例(%) Ratio of suitable iodine (%)	24.0	35.4	34.1
碘超适宜比例(%) The iodine ultra appropriate ratio (%)	11.7	21.0	20.0
碘过量比例(%) Ratio Of excess iodine (%)	2.6	19.1	17.2

### 3 讨论

虽然海口市作为沿海城市,曾有不少人担心补碘过量,但通过2010~2011两年的监测结果显示,全市仍有28.7%的育龄妇女处于碘缺乏状态。孕妇及哺乳期妇女中位数明显低于非妊娠妇女,且碘不足的比例43%~73%。明显高于非妊娠妇女碘不足的比例6%~41%。其中秀英区育龄妇女的碘营养不足明显高于其他区的育龄妇女。美兰区育龄妇女碘过量比例略高于其他区的育龄妇女。

海口市孕妇和哺乳期妇女碘营养不足明显,今后应进一步加大预防碘缺乏病的宣传力度,对合理膳食进行指导,多摄入含碘量丰富的食物,如紫菜、海带、海产品等。政府应继续加强对重点人群的监测工作,特别是碘不足比例较高的秀英区及碘过量比例高的美兰区,在补碘同时也要预防碘过量带来的危害。

#### 参考文献:

- [1] The health industry standard of the People's Republic of China. WS/T.107.2006. The urinary iodine arsenic cerium catalytic spectrophotometric method[S].  
(中华人民共和国卫生行业标准. WS/T.107.2006.尿中碘的砷铈催化分光光度测定方法[S].)
- [2] Chinese iodized salt and residents iodine nutritional status risk assessment[R]. technical report NO.2010-002, 13  
(中国食盐加碘和居民碘营养状况的风险评估[R].技术报告 NO.2010-002,13)

收稿日期 2012-05-13 编辑 吴中菲