DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.005

γ-干扰素对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵及红外期发育的影响*

秦晓红 王兴相 况明书 (第三军医大学基础部寄生虫学教研室) 630038

提 要 用葡萄球菌肠毒素A刺激体外培养的大鼠脾细胞所获得的γ-干扰素(IFN-γ),于接种约氏疟原虫子孢子前5 h静注于Wistar大鼠体内,子孢子接种42 h后肝内红外期(EEF)数量显著减少,其子孢子发育率仅为对照组的7%～20%,但EEF的大小及成熟度均未受影响。大鼠接种子孢子后2 h给IFN-γ,则红外期的密度、子孢子发育率及红外期大小,成熟度均与对照组无明显差异。将子孢子与IFN-γ共孵40 min,然后超速离心洗脱IFN-γ后再接种于大鼠,则红外期的密度、大小、成熟度也均类似于对照组。结果提示:IFN-γ的抗疟作用并非是针对子孢子或红外期本身,而是通过修饰枯否氏细胞活性,减少入侵肝细胞的子孢子数来表达的。

关键词 疟原虫,yoelii;孢子虫纲;红外期*;干扰素类Ⅰ型;葡萄球菌类毒素类;大鼠
中图法分类号 R382.31;Q511

干扰素是在病毒、病菌等病原或诱生剂的作用下,产生的一种有效的淋巴因子,γ-干扰素因较α、β-干扰素具有更强的免疫调理等作用而日益受到人们的重视。近来又发现IFN-γ有明显的抗疟作用,而关于其抗疟机制Maheshwari等认为IFN-γ在恒河猴体内可抑制食蟹猴疟原虫(Plasmodium cynomolgi)红外期的发育[1];Ferriera等也认为IFN-γ可抑制大鼠肝内伯氏疟原虫(P. berghei)红外期的发育[2]。但他们均未对红外期的发育作直接的形态学观察。本试验用IFN-γ诱生剂——葡萄球菌肠毒素A (staphylococeal enterotoxin A)刺激体外培养的大鼠脾细胞,使之产生IFN-γ[3];并将其作用于感染约氏疟原虫子孢子的大鼠。在不同实验条件下,观察、比较约氏疟原虫红外期的密度、大小、形态及发育率。进而探讨IFN-γ对大鼠疟原虫子孢子入侵及红外期发育的影响。

1 材料与方法

1.1 疟原虫

约氏疟原虫(P. yoelii)BY265株,引自军事医学科学院,保种于昆明株小鼠体内每周血传1次,每5周蚊传1次。

1.2 斯氏按蚊(Anopheles stephensi)

成蚊羽化后3 d吸血感染,感染后第16～20天,进行子孢子分离。

1.3 Wistar大鼠

每批体重分别为:85～135 g、127～167 g、91～128 g和79～119 g,由本校动物所提供。同批鼠的性别相同。

1.5 大鼠IFN-γ制备及鉴定

据文献[4]等,将100～150 g Wistar大鼠数只活杀,酒精消毒外表面,无菌取脾,分离脾细胞,经过滤,离心后,用RPMI-1640液配成5×10^6脾细胞/ml的液,滴入24孔培养板内,另加入葡萄球菌肠毒素A(SEA)μg/ml,置37℃ 5% CO_2箱内48 h,收集培养液,离心取上清液,用混合纤维素脂滤膜(0.22 μm)过滤,置－20℃下备用。其活性经酸处理,热灭活,抗体中和等检测为IFN-γ。另不加SEA,同样处理脾细胞,制仿诱生对照剂。

将制备的IFN-γ以1∶50至1∶6,400依次倍比稀释液0.1 ml,处理L929细胞;置37℃ 5% CO_2育24 h,加入水泡口腔炎病毒(VSV)100TCID 50/ml,置37℃ 5% CO_2继续培养至病变时,固定、染色,在倒置镜下观察。能保护50%的细胞不出现病变效用的干扰素的最高稀释度为1∶1 600,其浓度即相当于16 000 u/ml[5]。

1.6 IFN-γ对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵的影响

15只大鼠均分3组,1组尾静脉注射IFN-γ,其剂量依据文献[2]选定为10 μl/kg;1组为仿诱生对照组,1组为对照组;5 h后尾静脉接种子孢子,接种42 h后观察结果。该实验重复1次。

1.7 IFN-γ对红外期发育的影响

2组大鼠,1组接种子孢子后2 h(即大部分子孢子已进入肝细胞时行红外期发育)[6]给IFN-γ 10 μl/kg;另1组为对照组;接种42 h后观察结果。

1.8 IFN-γ对子孢子的直接作用

将分离的子孢子液3等份,各7 ml;1份加2ml IFN-γ,第2、3份加2 ml含10%小牛血清的葡萄糖生理盐水稀释液;而后将第1、2份液体室温育40 min后。12 000 r离心10 min,弃上清,用稀释液洗涤1次,即与第3份液分别接种于3组大鼠,42 h后观察结果。

2 结果

2.1 IFN-γ对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵的影响

两批实验的干扰素组的EEF密度显著降低,子孢子发育

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

率各为对照组的7.7%、21.1%和仿诱生物对照的9.2%、21.2%，二组之间均各有显著差异（$P<0.001$），但后2组EEF密度相近，无明显差异。3组分别检测完整的EEF 37、36、25个，其大小、成熟度均相近，无明显差异（见表1）。

表1 接种子孢子前5 h给予IFN-γ对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵及红外期发育的影响

Tab 1 The effect of INF-γ on sporozoite invasion and EEF development of P. yoelii in rats, when it was given 5 h before sporozoite inoculation

No. test	Group	No. rat	No. sporozoite inoculated (1×10^5)	Sporozoite viability (%) ($\bar{x}\pm s$)	Diameter of EFF (μm) ($\bar{x}\pm s$)	Maturation rate (%)
I	IFN-γ	5	11.6	0.43±0.31*△	43.90±5.56	81.08
	IFN-γ-like	5	11.6	4.64±1.12□	35.28±6.64	80.00
	Control	5	11.6	5.69±0.89	35.32±6.48	75.00
II	IFN-γ	5	8.64	3.91±1.78*△		
	IFN-γ-like	5	8.64	18.48±3.75□		
	Control	5	8.64	18.39±4.12		

Notes * :compared with control, $P<0.01$; △:compared with IFN-γ-like, $P<0.01$; □:compared with control, $P>0.05$

2.2 IFN-γ对红外期发育的影响

干扰素组的EEF密度无明显下降，子孢子发育率与对照组相近似，无明显差异（$P>0.1$）。两组分别检查了38、37个红外期（EEF），其大小和发育成熟度均相类似（见表2）。

表2 接种子孢子后2 h给予IFN-γ对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵及红外期发育的影响

Tab 2 The effect of IFN-γ on sporozoite invasion and EEF development of P. yoelii in rats, when it was given 2 h after sporozoite inoculation

Group	No. rat	No. sporozoite inoculated (1×10^5)	Sporozoite viability (%) ($\bar{x}\pm s$)	Diameter of EEF (μm) ($\bar{x}\pm s$)	Maturation rate (%)
IFN-γ	5	10.8	7.83±1.18	34.30±5.65	78.95
Control	5	10.8	7.89±1.78	34.86±5.61	83.38

2.3 IFN-γ对子孢子的直接作用

3组的红外期密度相近似，子孢子发育率分别为5.45%、4.82%、5.12%，各2组之间无显著差异（$P<0.05$）。另3组各检测了40个红外期，其平均直径及发育成熟率均接近（见表3）。

表3 IFN-γ与子孢子共孵对约氏疟原虫子孢子入侵及发育的影响

Tab 3 Incubated the sporozoite with IFN-γ for 40 min, the effect of IFN-γ on the infectionsness of sporozoite

Group	No. rat	No. sporozoite inoculated (1×10^5)	Sporozoiteviability (%) ($\bar{x}\pm s$)	Diameter of EEF (μm) ($\bar{x}\pm s$)	Maturation rate (%)
IFN-γ	5	7.15	5.31±0.52	35.41±6.34	82.86
Ultracentrifugal	5	7.37	4.84±1.70	35.58±3.98	85.29
Control	5	8.30	5.12±2.33	35.51±4.54	85.29

3 讨论

关于IFN-γ的抗疟作用，一般认为是通过抑制红外期发育特别是晚期发育来表达的。Maheshwari等（1988）依据虫血症前期的长短和虫血症的高低而认为IFN-γ可抑制红外期的发育，Ferreira等（1986）用特异DNA探针检测肝内伯氏疟原虫DNA含量的技术进行研究，也认为IFN-γ可抑制红外期的发育，但其均未对红外期的发育情况进行直接观察。

本试验结果表明，只有当IFN-γ于接种子孢子前使用，才能显著降低红外期的数量，但对红外期的大小、成熟率均无显著影响；当子孢子进入肝实质细胞后使用IFN-γ或子孢子与IFN-γ共孵后再接种于大鼠，都显示对红外期的数量、大小、成熟率无明显作用。这一结果明显否定了IFN-γ可抑制红外期发育的推论，也排除了其对子孢子的直接作用，并提示IFN-γ的作

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用是在子孢子侵入肝实质细胞前的某一阶段。

子孢子入侵肝细胞之前，枯否氏细胞对转运子孢子穿越肝血窦壁或杀伤子孢子具有非常重要的作用[7]。王兴相等研究证明子孢子入侵肝细胞的数量与枯否氏细胞的吞噬活性高低呈正相关，而与其杀伤活性的高低呈负相关[8]。IFN-γ对巨噬细胞（含枯否氏细胞）有着既可促进其吞噬活性，又可促进其释放 O_2、OH 等氧代物，从而增强其杀伤活性的双重作用[9]。因此，我们认为 IFN-γ 的抗疟作用是通过修饰枯否氏细胞活性，使之能吞噬更多的子孢子，从而杀伤更多的子孢子来表达的。依据此理论，也可解释 Maheshwari、Ferriera 等的试验结果。

参考文献

1 Maheshwari RK, Czarniecki CW, Dutta GP. Recombinant human gamma interferon inhibits simian malaria. Infect Immunity, 1986, 53: 628～630

2 Ferriraa A, Schofield L, Enea V, et al. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasite by interferon-γ. Science, 1986, 232: 881～884

3 王兴相，黄复生. 环磷酰胺对大鼠体内约氏疟原虫红外期发育的影响. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1987，5(3)：180～182

4 Stobo J, gtreen I. Identification of a subpopulation of mouse lyphoid cells repuired for interferon production after stimulation with mitogen. J Immunoi, 1974, 112: 1589～1593

5 杜　平. 医用实验病毒学. 北京：人民军医出版社，1985. 134～215

6 Danforth HD, Moon RJ. Retention of plasmodium berghei sporozoites within perfused mouse liver. Acta Tropica, 1982, 38: 5～10

7 Meis JFGM, Verhane JP. An ultrastructual study on the role of Kupffer cells in the process of infection by P. berghei sporozoite in rat. Parasitol, 1983, 86: 231～242

8 王兴相，陈志强. BCG、地塞米松和碳素对大鼠体内约氏疟原虫子孢子入侵及红外期发痛的影响. 第三军医大学学报，1987，9(2)：175～177

9 Nathan CF, Prenergast TJ. Activation of human marcophage. J Exp Med, 1984, 160: 600～605

（收稿：1993-07-08；修回：1993-12-12）

Effect of INF-γ on the sporozoite invasion and EEF development of *P. yoelii* in rats

Qin Xiaohong, Wang Xingxiang, Kuang Mingshu (Department of Parasitology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Gamma-interferon (IFN-γ) was obtained through the culture of the splenocytes of Wistar rats and the culture was stimulated with the enterotoxin A of staphylococcus. Rats were injected with INF-γ 5 hours before sporozoite inoculation. It was found that 42 hours after inoculation, the density of exoerythrocytic forms (EEF) was markedly decreased and the viability of the sporozoites was noly 7%～20% of that of the control. However, the size and maturation rate of EEF were not affected. When IFN-γ was given 2 hours after sporozoite inoculation, the sporozoite viability, the size and maturation of EEF were all normal as compared with those of the control. When sporozoites were preincubated with IFN-γ for 40 minutes and then injected into rats, the density, size and maturation rate of EEF were not affected. The findings suggest that the anti-malarial effects of INF-γ are not directly act on the sporozoits or EEF but prevent the invasion of sporozoites through the modification of the activities of Kuppffer cells.

Key words Plasmodium yoelii; sporozoa; exoerythrocytic form*; interferon type I; stoaphylococcal toxoid; rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net