DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.04.022

经验交流

恶性疟原虫4个分离株的体外培养*

张津利 冯崇英 陈志强 祁兆平 段建华 （第三军医大学训练部 寄生虫学教研室）630038

为了筛选在体外培养中能形成成熟配子体的虫株，以建立恶性疟原虫蚊期和红外期实验模型，我们于1990年在云南南部疟疾流行区从4个病人分离出4个恶性疟原虫分离株，暂定名为B-1（Burma-1），FCC-901/YN，FCC-902/YN，FCC-903/YN，并进行了体外培养观察。

1 材料与方法

1.1 血源及采集

1.1.1 B-1：患者夏××，在赴缅甸景栋做工返回途中发病，于1990年7月27日晚在思茅地区人民医院查见恶性疟环状体，经反复询问病史证实为缅甸境内感染，于28日凌晨1时采血，去血浆后经RP[2]（RPMI-1640加HEPES缓冲剂）洗2次，立即分入2个50ml三角烧瓶培养。

1.1.2 FCC-901/YN：患者沈××，勐腊县人，于1990年7月26日在勐腊县勐仑卫生院查到恶性疟环状体，经询问病史证实为勐仑当地感染，7月27日上午静脉滴注蒿甲醚约10mg，于当日下午6时采血，同上处理后培养。

1.1.3 FCC-902/YN：患者罗××，勐腊县人，于1990年8月7日在勐腊县医院查到恶性疟环状体，经询问病史证实为该县勐棒乡感染，8月8日下午2时采血，同上处理后培养。

1.1.4 FCC-903/YN：患者张××，澜沧县人，于1990年8月8日在思茅地区医院查到恶性疟环状体，经询问病史证实为澜沧当地感染，于8月12日下午3时采血，同上处理后培养。

1.2 方 法

1.2.1 恶性疟原虫体外连续培养：在云南省疟疾防治研究所（思茅）进行，采用烛缸法[1]，培养基为RPMI-1640及HEPES缓冲剂加入“AB”型人血清（15%），培养用红细胞为“O型”，每4天加血球稀释，培养温度为36.8℃～37.0℃。

1.2.2 冻存及复苏：采用常规方法[2]进行。4株原虫当感染率达5%左右时不同时间冻存各若干瓶，放入液氮罐带回重庆，于1990年12月分别复苏，作进一步观察。复苏后所用培养基中加入次黄嘌呤（50mg/L）[3]，在CO_2孵箱内（CO_2浓度5%）进行培养。

2 结果与讨论

2.1 体外连续培养

B-1，FCC-901/YN，FCC-902/YN，FCC-903/YN在当地分别培养38d，39d，24d和20d，起始感染率分别为3.0%，0.1%，3.5%和2.0%，培养过程中原虫率最高分别可达5.5%，5.0%，7.3%和9.0%。FCC-901/YN起始感染率较低（0.1%），且在采血前用过少量抗疟药，培养初期徘徊在低水平，有时仅能见到在红细胞内呈点状的原虫，至20d～30d左右才达到较高水平（0.5%～2.0%），其余3株适应性较强，分离培养后一直维持较高的原虫率。B-1为缅甸输入，初步观察结果表明，该株在生长特性方面与3个云南分离株无明显差别。

*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

1990年8月27日在思茅首次复苏冻存的FCC-903/YN，FCC-902/YN和B-1（冻存5d～13d），全部成活。1990年12月在本实验室再次复苏，均获成活。

2.2 配子体形成情况

分离培养后4个分离株均有配子体出现，除FCC-903/YN配子体率略低外，其余3株原虫均有较高的配子体率，B-1，FCC-901/YN，FCC-902/YN，FCC-903/YN的配子体率（每100个原虫中）范围分别为5%～15%，6%～12%，6%～18%和1%～6%，按Hawking等[4]的分类标准，其V期配子体率（每100个配子体中）范围分别为0%～31%，0%～10%，0%～21%，5%～100%。复苏后对3个分离株的观察表明培养30d仍有较高的配子体率，B-1，FCC～901/YN，FCC～903/YN的配子体率范围分别为5%～15%，4%～12%和10%～13%，V期配子体率范围分别为0%～5%，0%～24%和0%～9%。FCC-903/YN在采血时血液内就有成熟配子体，培养初期配子体率较低，但冻存复苏后配子体率较高，原因有待探明。实验显示培养过程中4个分离株虽可持续较长时间出现配子体，配子体绝对数变化也不大，但随着时间的延长，成熟配子体数量逐渐减少。本实验对恶性疟原虫在体外培养中配子体的形成情况进行了系统观察，但观察到的V期配子体是否功能上成熟仍有待探讨，如何使培养中的疟原虫保持产生配子体的能力并使之功能上成熟是我们正在努力解决的问题。

2.3 药效测定

按常规方法进行体外微量药效测定[5]，所用聚苯乙烯塑料氯喹测定板由中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供，结果显示4个分离株对氯喹均有抗药性。

（本项工作承蒙云南省疟疾防治研究所李学忠所长，朱兆鸿医师和病原科其他同志的支持和帮助，谨致谢意。）

关键词 恶性疟原虫；体外培养

参 考 文 献

1. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976;193:673～675
2. 任道性。红内期疟原虫的体外培养。见赵慰先主编。人体寄生虫学。北京：人民卫生出版社，1983:204～212
3. Ponnudurai T, Meuwissen JHETH, Leeuwenberg ADEM, et al. The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982;76:242～250
4. Hawking F, Wilson ME, Gammage K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. Trans R Soc Trop Med Hy 1971;65:549～559
5. 中华人民共和国卫生部地方病防治局编。恶性疟原虫对氯喹敏感性测定方法。疟疾防治手册。第3版，北京：人民卫生出版社，1988:179～186

（收稿：1991.05.28；修回：1991.06.19）

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