

· 论 著 ·

## 卡氏肺孢子菌肺炎动物模型建立及其病原体的超微结构观察\*

郑玉强<sup>1</sup>, 蔡 辉<sup>2</sup>, 武卫华<sup>2</sup>, 叶 彬<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学附属儿童医院临检中心/儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地 400014;  
2. 重庆医科大学病原生物教研室 400016)

**摘要:**目的 建立 SD 大鼠的卡氏肺孢子菌肺炎(PCP)的实验动物模型,观察肺组织病理变化特点和卡氏肺孢子菌(Pc)的超微结构特征,探讨其致病机制。方法 地塞米松皮下注射诱导 SD 大鼠 PCP,肺印片吉姆萨染色检测 Pc 滋养体,GMS 染色检测 Pc 包囊,肺组织切片 HE 染色观察肺组织病理变化,透射电镜观察 Pc 超微结构。结果 地塞米松诱导 6 周后,大鼠肺印片可见少许 Pc 滋养体和少许包囊,第 9 周肺泡腔内可见大量滋养体和包囊;PCP 肺泡腔变小,肺泡上皮增生,间隔增宽,肺间质内有以淋巴细胞、嗜酸性粒细胞为主的细胞浸润并伴炎性物质渗出,并随病程时间延长炎症进行性加重;透射电镜显示,Pc 黏附在肺 I 型上皮细胞,滋养体形态多样,表面有管状突出和伪足样结构,内部含有丰富的线粒体、内质网、管状小体、囊内小体、高密度特殊颗粒等超微结构;包囊表面有皱褶但未见管状突起,囊内有数个囊内小体,具有滋养体样特征。结论 Pc 对肺 I 型上皮细胞的黏附和过度繁殖增生以及刺激肺间质大量炎性细胞浸润和炎性物质渗出是引发 PCP 不可逆肺损伤的重要因素。

**关键词:**卡氏肺孢子菌;肺炎;超微结构;模型,动物;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2907-04

## Establishment of pneumonia model for pneumocystis carinii and observation of its' ultra-structure in rat\*

Zheng Yuqiang<sup>1</sup>, Cai Hui<sup>2</sup>, Wu Weihua<sup>2</sup>, Ye Bin<sup>2</sup>

(1. Laboratory Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China;  
2. Department of Pathogen Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To observe the pathological change of lung tissue and the ultra-structure of p. carinii, P. carinii pneumonia was induced in SD rats using Dexamethasone. Methods The P. carinii was detected by microscope with staining of Giemsa for trophozoites, GMS for cyst and HE staining for lung tissue slice. The ultra-structure of P. carinii was observed by transmission electron microscopy. Results A few trophozoites and cysts were found in the alveolar cavity at weeks 6 and more organisms in severe case at weeks 9. It were noted that the shrunken alveolar space, proliferated alveolar epithelium, broadening alveolar septum, numbers of infiltrating inflammatory cell and rosiness foam-like extravasate in the lung tissue of PCP. Many ultra-structures were observed by TEM, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, tubular bodies, intracystic bodies, high-density specific granule, and so on. Conclusion The adherency and excessive multiplication of P. carinii, with numbers of infiltrating inflammatory cell and rosiness foam-like extravasate, play a role in the development of irreversible lung lesion in PCP rats.

**Key words:** pneumocystis carinii; pneumonia; ultra-structure; models, animal; rats

卡氏肺孢子菌肺炎(pneumocystis carinii pneumonia, PCP)是由卡氏肺孢子菌(pneumocystis carinii, Pc)引起的一种发生于免疫功能低下患者肺部的严重并发症,也是艾滋病(AIDS)最常见的感染并发症和最主要的死亡原因之一。PCP 患者病情严重,缺乏相应的临床体征,如不及时治疗,其病死率可高达 60%。近年来,由于免疫抑制剂、抗肿瘤药物的广泛应用,以及世界各地 AIDS 病例的增加,PCP 病例也随之急剧增多,使得肺孢子菌的预防、治疗<sup>[1-2]</sup>及其生物学<sup>[3-4]</sup>和免疫学<sup>[5-6]</sup>特性等方面正成为目前研究的热点。建立 PCP 动物模型和体外培养肺孢子菌,是开展肺孢子菌分类、生活史、发病机制、药物筛选、疫苗研制,以及免疫学与分子生物学等研究的基础。鉴于 PCP 临床表现不典型,缺乏可靠、稳定、廉价的 Pc 体外培养系

统,所以,目前动物模型仍然是相关研究的重要工具<sup>[7]</sup>。本研究采用免疫抑制方法诱发 SD(sprague dawley)大鼠 PCP,进行了病理和病原学研究,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 清洁级大鼠 20 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量(200±10)g,雌雄各半。普通敞式大鼠笼中颗粒饲料喂养。用药前剖杀 2 只,肺印片检查 Pc 包囊为阴性。实验组大鼠 14 只,对照组 4 只。两组大鼠均在相同条件下饲养。

**1.2 诱导方法** 实验组大鼠腹股沟皮下注射地塞米松磷酸钠,每周 2 次,每次每只 2.5 mg。第 5 周开始每次每只 1.25 mg,同时饮用含四环素(1 g/L)的水预防细菌性感染。第 6 周

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000745);重庆市卫生局医学科学技术研究基金资助项目(渝卫科教[2009]66 号和渝卫科教[2010]51 号)。

开始剖杀实验鼠取肺组织做肺叶横断印片,吉姆萨染色、环六亚甲基四胺银(gomoris methenamine silver ntrate staining, GMS)染色光镜观察 Pc 滋养体和包囊,判断 Pc 感染程度;对照组注射生理盐水。

1.3 观察内容

1.3.1 一般情况观察 观察大鼠毛色、摄食、活动、体质量等情况变化,每周记录 1 次体质量。实验第 6 周开始每周剖杀实验组鼠 2 只,第 10 周再杀对照组大鼠。每次于无菌条件下取肺组织,肉眼观察其病理变化。

1.3.2 肺组织病原学检查 用药 6 周后分期、分批将大鼠处死解剖,取出肺组织做肺横断印片,吉姆萨染色和 GMS 染色油镜检查 Pc 滋养体及包囊。

1.3.3 肺组织病理学检查 肉眼观察肺的大体变化;各肺叶取材,常规石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察肺组织病理变化。

1.3.4 肺组织透射电镜观察 取各组大鼠左肺叶新鲜肺组织少许,切成 1 mm<sup>3</sup> 大小组织块,迅速以 2.5% 戊二醛前固定,常规清洗后 1% 锇酸后固定,常规梯度丙酮脱水。环氧树脂 Epon 812 包埋,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,日立 H-600 透射电镜观察。

2 结 果

2.1 一般情况观察 实验组大鼠前 4 周活动、饮食无明显异常;第 5 周起精神不振,体毛竖起,光泽变暗,体质量开始下降;第 8 周起体毛呈斑片状脱落;厌食,活动迟缓,常静卧不动,呼吸急促,体毛散乱无光泽,精神萎靡,体质量下降明显,上述体征随诱导时间增加而加重。肉眼观察鼠肺:对照组呈粉红色,质软,光滑,无异常发现;实验组明显肿胀增大,表面粗糙不平,质地较硬,灰褐色,肺表面及切面有米粒大小灰白色结节样病灶,挤压后切面有黏稠样渗出物溢出。

2.2 病原学检查 实验组第 6 周肺印片可见少许 Pc 滋养体和包囊。吉姆萨染色:滋养体胞核呈紫红色、胞浆染成淡蓝色,形态不规则,包囊囊壁不着色,可见数个囊内小体。GMS 染色:包囊呈圆形、椭圆形或月牙形,囊壁为淡褐色,可见 1~2 条皱褶,或一对括号状特征结构(图 1、2)。

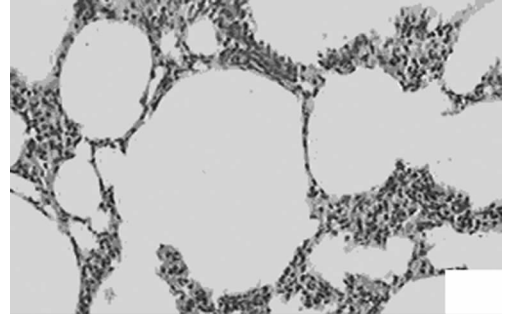


图 3 正常鼠肺组织切片(HE 染色,×400)

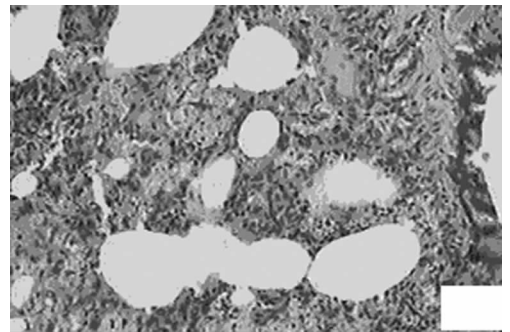


图 4 PCP 鼠肺组织切片(HE 染色,×400)

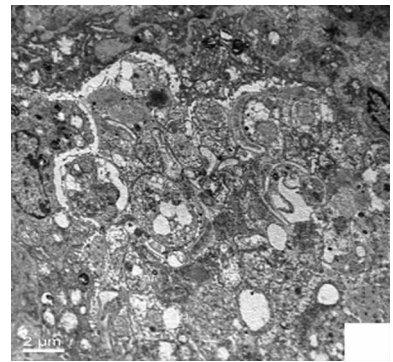


图 5 PCP 肺透射电镜观察肺泡影响(×5 000)

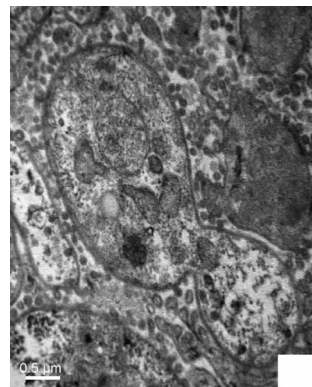
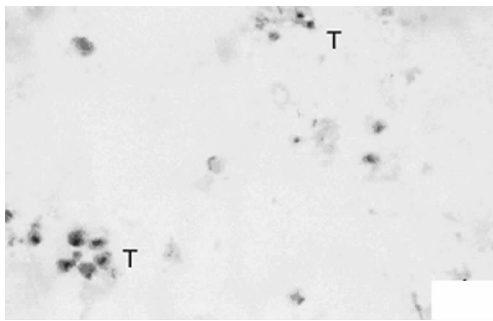


图 6 PCP 肺透射电镜观察滋养体影像(×25 000)



T:Pc 滋养体。

图 1 PCP 鼠肺印片(姬姆萨染色,×1 000)

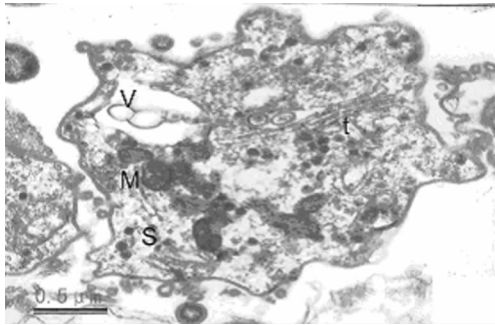


C:Pc 包囊。

图 2 PCP 鼠肺印片(GMS 染色,×1 000)

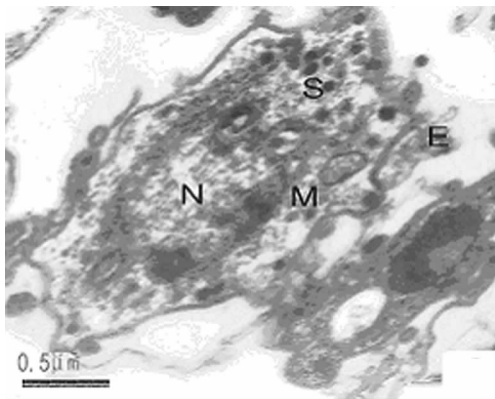
2.3 病理学检查 PCP 模型肺泡腔变小,肺泡上皮增生,间

隔增宽,间质内有以淋巴细胞、嗜酸性粒细胞为主的细胞浸润。部分肺泡腔内充满淡红色泡沫样渗出物。诱导的时间与 PCP 病情严重程度和肺损伤程度呈正相关,诱导时间越长, Pc 的繁殖能力越强,肺泡上皮增生和肺间隔增宽越明显,炎性细胞浸润和泡沫样渗出物越多,肺损伤越严重(图 3、4)。



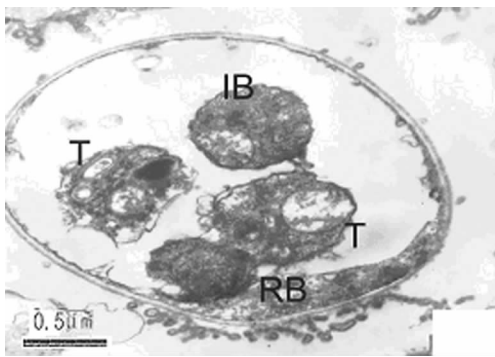
E:形态不规则,表面有管状突起;V:胞浆内有空泡;M:较多线粒体;t:较多管状体;S:内含吞饮小泡,较多高密度特殊颗粒;N:细胞核。

图 7 PCP 肺透射电镜观察滋养体影像(×30 000)



E:形态不规则,表面有管状突起;V:胞浆内有空泡;M:较多线粒体;t:较多管状体;S:内含吞饮小泡,较多高密度特殊颗粒;N:细胞核。

图 8 PCP 肺透射电镜观察滋养体影像(×30 000)

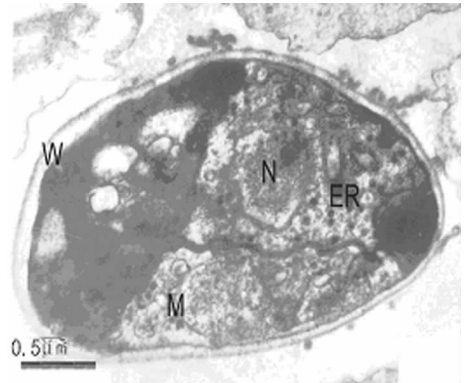


T:Pc 包囊内成熟滋养体;IB:囊内小体;RB:剩余体;W:双层细胞壁;ER:内质网;M:线粒体。

图 9 PCP 肺透射电镜观察 Pc 包囊影像(×30 000)

**2.4 透射电镜观察** 可见肺泡内有大量滋养体和成熟的小包裹;滋养体为单层细胞膜,形状多变,表面有管状突起和伪足样结构;细胞内含 1 个有完整核膜的细胞核,胞质内可见线粒体、内质网、管状小体、吞饮小泡、空泡以及高密度的特殊颗粒等超微结构;有的胞质中可见空泡,有较多高密度特殊颗粒、线粒体和管状体,内含吞饮小泡。可见滋养体的二分裂繁殖方式。包裹按成熟状态可分为未成熟、成熟和囊内小体逸出 3 种类型。

未成熟包裹和成熟包裹呈圆形或椭圆形。未成熟包裹含少于 8 个的囊内小体,每个小体形态为圆形或椭圆形,含有 2 个细胞核。成熟包裹囊壁较厚,由双层细胞壁组成,胞质内可见内质网、线粒体等超微结构;囊内一般含有 8 个囊内小体,有的少于 8 个,囊内小体含有 1 个细胞核;有的囊内见成熟滋养体、囊内小体以及剩余体(图 5~10)。



T:Pc 包囊内成熟滋养体;IB:囊内小体;RB:剩余体;W:双层细胞壁;ER:内质网;M:线粒体。

图 10 PCP 肺透射电镜观察 Pc 包囊影像(×30 000)

### 3 讨论

肺孢子菌,以前又名肺孢子虫,是一种机会致病性病原体,寄生在人类和哺乳动物的肺,免疫功能受损的宿主感染后,可引起肺孢子菌肺炎。长期以来,人们一直认为 Pc 是一种原虫,是引起人体“卡氏肺孢子虫肺炎”(pneumocystis carinii pneumonia)的病原体。然而,20 世纪 80 年代末的分子生物学和生物化学的研究结果证实,它属于真菌;目前,主要有 5 个种类:P. carinii、P. jirovecii、P. oryctolagi、P. murina 和 P. wakefieldiae;它们有相对的宿主特异性。P. carinii 主要感染大鼠等鼠类肺,引起“卡氏肺孢子菌肺炎”;P. jirovecii 主要感染人类肺,引起“耶氏肺孢子菌肺炎”;P. oryctolagi 是兔源性肺孢子菌;P. murina 和 P. wakefieldiae 主要感染豚鼠、猪、犬、猴等齿类哺乳动物肺<sup>[8-9]</sup>。由于鼠源性 Pc 与人源性耶氏肺孢子菌在形态、致病性、基因和抗原性等方面具有某些共性,因此,人们多采用鼠卡氏肺孢子菌肺炎为模型研究 PCP 的诊断、治疗和预防等方面内容。

目前,影响 PCP 的诊断、治疗和预防等方面进一步深入研究的关键问题是 Pc 的培养问题。虽然,国内外学者经过不懈努力,在 Pc 体外培养方面取得阶段性成果<sup>[10-11]</sup>,但要建立一个能在体外稳定、长期传代、廉价、可靠的 Pc 培养体系仍然是一个不小的挑战。Pc 的体外培养极其困难,这不仅影响了对其生活史的研究,不能确切解释 Pc 的传播机制,也阻碍了抗原的制备和 PCP 免疫学诊断方法的建立,在预测新候选药的临床疗效方面至今仍以体内法即免疫抑制鼠模型进行研究。国内对于 PCP 动物模型的研究起步于 20 世纪 80 年代,现阶段模型制作成功的实验动物除有大鼠、小鼠外,还有仓鼠、豚鼠、裸鼠、猪、犬、猴和新西兰白兔等。PCP 动物模型研究显示,实验大鼠是建立 PCP 较为理想的动物,具有耐受性强、死亡率低、阳性率高、菌体数量多和饲养方便等优点。本研究采用免疫抑制法皮下注射地塞米松自然感染法建立 PCP,第 6 周开始肺组织印片病原学检查观察到了 Pc 滋养体和包裹,成功建立了 PCP 鼠实验动物模型。组织病理观察到 PCP 肺以炎症、渗

出、细胞浸润、间质细胞增生等为主并随病程存在明显病理学不可逆改变。病原体超微结构观察显示, Pc 在肺泡腔内多见, 滋养体附着在肺泡 I 型上皮细胞, 滋养体形态多样, 表面有管状突起和伪足样结构, 内含管状体、吞饮小泡以及线粒体、内质网、细胞核等细胞器; 包囊表面有皱褶但未见管状突起, 囊内有数个囊内小体, 具有滋养体样特征; 这些超微结构与文献报道相似<sup>[12-13]</sup>。与文献报道不同的是, 本研究还注意到在肺泡腔内的 Pc 滋养体内, 外有大量高密度特殊颗粒, 这种颗粒与 PCP 感染的严重程度正相关, 感染越严重的鼠肺类似高密度特殊颗粒越多。因此, 对于高密度特殊颗粒的成分及其在 Pc 生长发育过程中的作用需待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 冯燕梅, 江涛. 卡氏肺孢子虫肺炎治疗的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(3): 329-333.
- [2] Cushion MT, Linke MJ, Ashbaugh A, et al. Echinocandin treatment of *Pneumocystis pneumonia* in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection[J]. *Plos One*, 2010, 5(1): 24-26.
- [3] Cushion MT, Collins MS, Linke MJ. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(2): 197-206.
- [4] Kutty G, Hernandez-Novoa B, Czapiga M, et al. *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 258-267.
- [5] Kelly MN, Shellito JE. Current understanding of *Pneumo-*

*cystis immunology*[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(1): 43-65.

- [6] 任一鑫, 郑莉莉, 秦元华, 等. 卡氏肺孢子虫感染与宿主免疫应答反应的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(4): 390-392.
- [7] 谷俊朝, 刘建, 俞巍. 卡氏肺孢子虫肺炎动物模型建立的现状[J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(5): 714-717.
- [8] Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power[J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(5): 708-726.
- [9] Cho JY, Kim DM, Kwon YE, et al. Newly formed cystic lesions for the development of pneumomediastinum in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2009, 9(2): 171-173.
- [10] 郑玉强, 叶彬, 武卫华, 等. 肺孢子虫体外无细胞培养的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(4): 569-571.
- [11] 黄敏君, 安亦军, 李淑珍, 等. 从大鼠肺灌洗液中分离纯化培养卡氏肺孢子虫[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 129-132.
- [12] 姜云霞, 宫玉香, 张忠广, 等. 卡氏肺孢子虫扫描电镜观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 292-294.
- [13] 刘成伟, 陈雅堂, 李文桂, 等. 双氢青蒿素治疗实验大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的透射电镜观察[J]. 重庆医学, 2003, 32(6): 701-703.

(收稿日期: 2012-02-14 修回日期: 2012-04-22)

(上接第 2906 页)

- metastasis[J]. *Zhong hua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2003, 38(3): 213-216.
- [4] Yi S, Guangqi H, Guoli H. The association of the expression of MTA1, nm23H1, with the invasion, metastasis of ovarian carcinoma[J]. *Chin Med Sci J*, 2003, 18(2): 87-92.
- [5] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis associated gene, *mta1*, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37): 22958-22963.
- [6] Cui Q, Takiguchi S, Metsusue K, et al. Assignment of the human metastasis-associated gene 1 (MTA1) to human chromosome band 14q32. 3 by fluorescence in situ hybridization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 93(2): 139-140.
- [7] 杜媛媛. *mta1*/MTA1 在乳腺癌转移过程中的作用及可能机制[J]. 国外医学生理、病理学科与临床分册, 2005, 25(3): 260-263.
- [8] Kumar R, Wang RA, Bagheri YR. Emerging roles of MTA1 family members in human cancers[J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(5): 30-37.
- [9] 黄永平, 孟翔凌. MTA1 与 KISS-1 在胃癌中的表达及临

床病理意义[J]. 皖南医学院学报, 2010, 29(4): 259-262.

- [10] 杨晶, 张中明. MTA1 蛋白在 II a 期食管癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(1): 91-92.
- [11] 李中文, 赵海泉. MTA1 在不同肝癌细胞和组织中的表达及其调控初步研究[J]. 药物生物技术, 2011, 18(2): 106-110.
- [12] Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology[J]. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5(10): 1621-1623.
- [13] Mahoney MG, Simpson A, Jost M, et al. Metastasis-associated protein (MTA1) 1 enhances migration, invasion and anchorage-independent survival of immortalized human keratinocytes[J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2161-2163.
- [14] Hofer MD, Menke A, Genze F, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(2): 455-457.
- [15] 王永霞, 陈桂林, 李伟宏. MTA1 蛋白表达与口腔鳞癌临床病理特征的关系[J]. 海南医学院学报, 2010, 16(9): 1149-1152.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-04-22)