维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0243-04

# 白果内酯治疗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎后的形态学变化

唐小葵[1],倪小毅[2],王 健[2],江 涛[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院肺科,重庆 400016,2.深圳市第二人民医院感染科,深圳 518035)

【摘 要】目的:研究经白果内酯治疗后卡氏肺孢子虫肺炎(PCP)大鼠的肺部病理学变化。方法:以地塞米松连续 6 周皮下注射 Wistar 大鼠,建立卡氏肺孢子虫肺炎动物模型,腹腔内注射白果内酯 30mg/(kg.d)×8 天,停药 1 周后杀鼠取肺,光镜和电镜观察大鼠肺部病理学变化,同时设有感染对照组和正常对照组。结果:经白果内酯治疗后肺印片中卡氏肺孢子虫(Pc)包囊数显著减少,肺部炎症明显吸收。透射电镜观察Ⅰ型肺泡上皮细胞水肿明显减轻,肺孢子虫滋养体大量空泡形成、细胞器肿胀破坏,髓样结构形成、胞膜破坏和胞质内出现一些电子密度较高的颗粒。结论:白果内酯可杀死卡氏肺孢子虫,经白果内酯治疗后肺部炎症减轻。

【关键词】白果内酯;卡氏肺孢子虫肺炎;病理学;超微结构

【中国图书分类法分类号】R363.+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-14

# Pathological changes in lungs of rats infected with Pneumocystis carinii pneumonia after treatment with bilobalide

*TANG Xiaokui, et al*

(*Department of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the Pathological changes in lungs of rats infected with Pneumocystis carinii pneumonia after treatment with bilodalide (BL). *Methods*: PCP rat models were established of hypodermic injection of dexamethasone twice a week for 6 weeks. The PCP rats were treated with BL 30mg/ (kg.d) × 8days and killed to obtain lungs. Pathological changes in lung tissues were observed under light and electron microscope .Infected and normal rats were established as controls. *Results*: The number of Pc cysts was markedly reduced in the lung print smear and inflammation in the lung was lightened. The investigation of thinner lung tissue section by transmission electronic microscope showed that the Pneumocystis carinii treated with bilobalide had formation of vacuoles in trophozoites, swelling and destroying of cell organ, rupture of cytomembrane and some high density electronic granulae were investigated in the cytoplasm. Membrane of cyst was destroyed too. *Conclusion*: Bilodalide can kill Pc and alleviate inflammation in the lung tissues of PCP rats.

【Key words】Bilobalide; Pneumocystis carinii pneumonia; Pathological; Ultrastructure

卡氏肺孢子虫肺炎(Pneumocystis carinii pneamonia PCP)是免疫缺陷病人常见的一种机会性感染,在艾滋病人中发病率尤高,为艾滋病人直接死因之一。作为治疗 PCP 的一线抗肺孢子虫药物戊烷脒和复方磺胺甲基异噁唑其毒副作用明显,耐药性的发生率也明显增加[1]。因此,寻找新的高效低毒药物是很有必要的。白果内酯(bilobalide,BL)为银杏叶中的有效活性内酯成份,属倍半萜类化合物。目前许多研究表明植物来源的萜类化合物具有一定的抗寄生虫作用[2]。作者已对 BL 治疗实验大鼠 PCP 作了观察,研究显示白果内酯 20mg/kg、30mg/kg 治疗组大鼠肺印片每视野的包囊均数分别为 2.31 ± 0.88、1.95 ± 0.57 明显低于免疫抑制组对照组 7.39 ± 2.33($P<0.01$),发现该药对大鼠 PCP 有明显的治疗作用[3],为进一步探讨药物的杀虫机制,本文采用形态学方法研究 BL 治疗对 PCP 大鼠肺组织以及 Pc 虫体超微结构的影响。

作者介绍:唐小葵(1972- ),女,主治医师,硕士,主要研究方向:肺部感染性疾病。

基金项目:国家自然科学基金资助(30070680)。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品

白果内酯(由 Sigma 公司提供,批号 33570-04-6)。

### 1.2 PCP 大鼠模型的建立

维普资讯 http://www.cqvip.com



纯系 Wistar 大鼠，雌性，体重 230~270g，由本校实验动物中心提供，大鼠 PCP 动物模型建立按文献报道方法略作修改[6]。大鼠皮下注射地塞米松 3.5mg/(只·次)，每周 2 次，连续 6 周，经 6 周诱导后，随机选取 2 只大鼠处死取肺作切面印片，六亚甲基四胺银(Gomoris GMS)染色，油镜观察印片，见平均每视野 6~10 个包囊，证实大鼠已诱发中度肺孢子虫感染，即大鼠 PCP 模型建立成功。

1.3 PCP 大鼠分组及治疗

将 PCP 大鼠用随机数字表法随机分为 2 组，每组 10 只，A 组：白果内酯治疗组，注射地塞米松 6 周后，腹腔内注射白果内酯 30mg/(kg·d)×8 天，于第 7 周开始治疗，连续用药 8 天后，停药并观察 1 周，第 9 周初处死考核疗效；B 组：感染对照组，注射地塞米松 6 周，不给予任何药物治疗，继续饲养 2 周至第 9 周初；另有 10 只健康大鼠作为健康对照组。

1.4 大鼠肺标本制备

实验第 9 周初处死各组大鼠，无菌取全肺。

1.5 肺印片观察

将每只大鼠的主要 5 个肺叶作上下横断，分别以切面在不同载玻片上印片，共 5 张，每张印片编号。印片空气干燥，甲醇固定，六亚甲基四胺银(GMS)染色，油镜观察。

1.6 肺组织病理学观察

取左肺下部分小块组织，10%甲醛固定，酒精逆行梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋制成切片，HE 和 GMS+ 伊红双重染色后观察肺组织病理学变化。

1.7 肺超微病理学观察

大鼠剖杀后立即取左上肺新鲜肺组织少许，迅速以 4% 戊二醛前固定，1% 锇酸后固定，环氧树脂 618 包埋，超薄切片，醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色，H—600 透射电镜观察。

## 2 结 果

2.1 肺印片观察

正常对照组：油镜下观察未发现 Pc 包囊。感染对照组：油镜下观察发现大部分视野 Pc 包囊较多，包囊为圆型、椭圆型或不规则型，囊壁棕黑色，囊内括弧样结构清楚(图 1A)。BL 治疗组：油镜下观察发现大部分视野 Pc 包囊稀疏(图 1B)。

2.2 肺组织病理学观察

2.2.1 大体标本

正常对照组大鼠肺光滑润泽、质软而富有弹性，呈海绵状。感染对照组大鼠肺外观呈暗红色、体积增大、质地稍硬易碎似肝组织，表面及切面可见点状或片状灰白色病灶，挤压后有粉红色泡沫样渗出物流出。经白果内酯治疗后的大鼠肺组织炎症减轻，肺泡腔内渗出物减少。

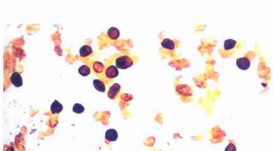


图 1A 经 6 周地塞米松诱导后大鼠肺印片中可见大量 Pc 包囊(×1000)

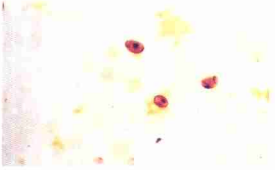


图 1B 经白果内酯治疗后的 PCP 大鼠肺印片中可见少量的 Pc 包囊(×1000)

2.2.2 HE 染色

正常对照组大鼠肺切片镜下可见肺泡壁很薄，表面大部分覆以Ⅰ型肺泡上皮细胞，有基膜。细胞扁平，表面光滑，核扁圆型，含核部分较厚，其余部分均很薄。肺泡间隔内有丰富的毛细血管网，紧贴肺泡上皮，间隔内还有丰富的弹性纤维。感染对照组大鼠肺切片镜下可见肺实变明显，大多数肺泡腔内充满粉红色渗出物，渗出物中有红细胞、纤维蛋白及炎性细胞。肺泡间质水肿，弹力纤维增生，大量炎性细胞浸润，以淋巴细胞为主，有少量浆细胞，肺泡上皮细胞明显增生，肺泡间隔增宽(图 2A)。白果内酯治疗组大鼠肺切片镜下可见肺实变明显减轻，肺泡腔渗出减少，只有少数肺泡腔中有少许渗出，但仍有肺泡上皮细胞增生和肺泡间质的弹力纤维增生(图 2B)。

2.2.3 GMS+ 伊红染色

HE 染色的肺切片中，肺孢子虫包囊是不着色的。采用 GMS+ 伊红染色，感染对照组大鼠肺切片可见被染成棕黑—黑色的肺孢子虫包囊散在或成堆的存在于许多肺泡腔中，大多紧贴在肺泡壁上，肺泡间质中也可见少量包囊(图 3A)。白果内酯治

维普资讯 http://www.cqvip.com



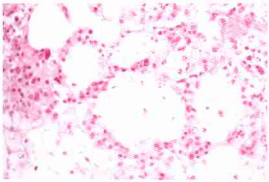


图 2A PCP 大鼠肺组织切片，PCP 大鼠肺泡腔内充满渗出物，间隔水肿，大量炎性细胞浸润 (HE×400 )

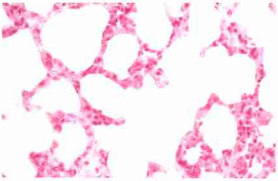


图 2B 经白果内酯治疗后大鼠肺实变明显减轻，肺泡腔渗出减少(HE×400)

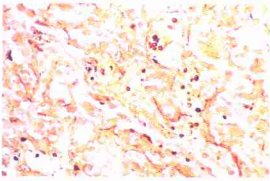


图 3A PCP 大鼠肺切片，肺内有较多的 Pc(GMS+伊红×400)

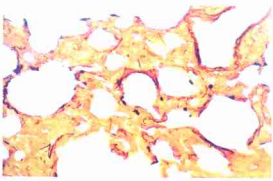


图 3B 经白果内酯治疗后大鼠肺内 Pc 减少(GMS+伊红×400)

疗组大鼠肺切片镜下可见存在肺孢子虫包囊的肺泡以及肺泡腔中包囊数量均明显减少(图 3B)。

2.3 透射电镜观察

2.3.1 正常对照 大鼠肺泡为不规则的囊泡，囊壁由Ⅰ型和Ⅱ型肺泡上皮细胞组成，基部附着基膜，相邻细胞间存在紧密连接。Ⅰ型肺泡上皮细胞呈扁平形，胞核卵圆形，核仁清晰，细胞器结构完整。Ⅱ型肺泡上皮细胞呈立方形胞核居中，胞浆丰富，可见大量线粒体，内质网和板层结构。

2.3.2 感染对照 肺实变明显，Ⅰ型肺泡上皮细胞肿胀膜质内可见许多空泡，部分坏死，坏死的碎片脱落到肺泡腔，Ⅱ型肺泡上皮细胞增生。肺泡腔周围的Ⅰ型肺泡上皮细胞表面可见成堆的肺孢子虫滋养体附着，滋养体之间有管状或不规则突起交叉粘附。滋养体多见附着于肺泡壁，直径 2~6 μm，表膜较薄，内含 1 个较大的细胞核，核膜较厚，核仁清晰。细胞质内有 1 个线粒体和较多的粗面内质网，表膜伸出指状或丝状伪足与肺泡上皮细胞紧密粘连(图 4A)。包囊圆形或椭圆形，直径 4~5 μm，囊壁较厚，分为 3 层，外层与内层电子密度较高，中层较

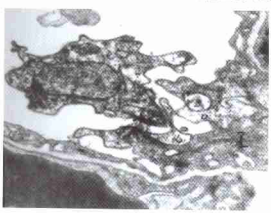


图 4A Ⅰ型肺泡上皮细胞(Ⅰ)肿胀，胞质内可见许多空泡(▲)，肺孢子虫滋养体，可见细胞核、线粒体、内质网等超微结构。(×20000)



图 4B Ⅰ型肺泡上皮细胞胞质内可见许多空泡(▲)，肺孢子虫成熟包囊，见数个囊内小体。(×17000)

维普资讯 http://www.cqvip.com





图 4C 经白果内酯治疗后,肺孢子虫滋养体空泡化,附着处的Ⅰ型肺泡上皮细胞肿胀明显减轻,结构正常,胞质内出现一些电子密度较高的颗粒 (×25000)

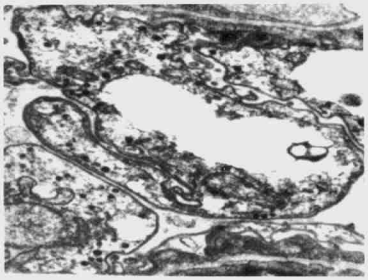


图 4D 经白果内酯治疗后,肺孢子虫滋养体胞质内巨大空泡形成,髓样结构形成(×20000)

低。成熟包囊内可见数个囊内小体,每个囊内小体内也可见细胞核、线粒体和内质网(图 4B)。未成熟包囊内线粒体较多,还有核糖体、糖原颗粒等。

2.3.3 白果内酯治疗组 经 BL 治疗后大鼠肺实变明显减轻,滋养体附着处的Ⅰ型肺泡上皮细胞肿胀明显减轻,结构正常,肺内的肺孢子虫包囊和滋养体明显减少,部分肺孢子虫变形坏死脱落至肺泡腔。肺孢子虫超微结构变化主要有空泡形成;细胞器肿胀破坏,部分滋养体及包囊内的线粒体、内质网肿胀,膜破损,在膜破损附近出现嗜锇性很强的髓样结构;胞质内出现一些电子密度较高的颗粒(图 4C、D)。

## 3 讨 论

白果内酯为银杏叶中的有效活性内酯成份,属倍半萜类化合物。目前许多研究表明植物来源的萜类化合物具有一定的抗寄生虫作用。我们已经用白果内酯治疗 PCP 大鼠,经白果内酯治疗的 PCP 大鼠肺内虫体负荷明显降低,大鼠存活率增加,显示该药对肺孢子虫有一定杀虫作用。本文研究发现感染对照组大鼠肺印片有许多包囊,而治疗组较少,提示白果内酯可减少 PCP 大鼠体内的包囊数。肺组织病理学观察显示感染对照组大鼠肺实变明显,大多数肺泡腔内充满粉红色渗出物,肺泡间质水肿,弹力纤维增生,肺泡间隔增宽。经白果内酯治疗后的大鼠肺组织炎症减轻,肺实变明显减轻,肺泡腔内渗出物减少,只有少数肺泡腔中有少许渗出,但仍有肺泡上皮细胞增生和肺泡间质的弹力纤维增生。表明白果内酯可减轻 PCP 大鼠的肺部炎症。

本文用透射电镜观察发现感染对照组大鼠Ⅰ型肺泡上皮细胞明显水肿,大量小空泡形成,影响肺的气体交换,引起 PCP 大鼠缺氧、呼吸困难,肺泡腔内有许多 Pc 滋养体和包囊。而治疗组大鼠肺部炎症明显减轻,肺泡Ⅰ型上皮细胞水肿明显减轻,结构正常,肺泡腔内 Pc 滋养体和包囊明显减少,有的虫体肿胀变形脱落至肺泡腔。经白果内酯治疗后 Pc 滋养体和包囊内出现大量空泡,可能是白果内酯诱导的细胞器液化性坏死。髓样结构的形成是由于各种膜性结构如细胞膜、内质网、线粒体、高尔基体、核膜等,在受到损伤因素作用后均可在膜破损附近出现嗜锇性很强的髓样结构,这是因膜破坏后膜中磷脂溢出,与胆固醇在水溶液环境中又组成双脂分子层膜样结构,即磷脂分子疏水端彼此相接,亲水端向外,形成同心圆多层膜样结构[5]。在许多经白果内酯作用后的 Pc 虫体内有髓样结构出现,同时有线粒体、内质网等膜性结构细胞器的肿胀破损,提示白果内酯可能作用于 Pc 的膜系结构。在白果内酯作用后的 Pc 胞质内出现了一些电子密度较高的颗粒,其性质不十分明确,有些类似溶酶体。这在过去我们做过的其它药物如青蒿素衍生物及 SMZco 作用 Pc 后的电镜中没有发现的。

总之,经白果内酯 30mg/(kg·d)×8 天治疗后,大鼠肺组织炎症减轻,肺实变明显减轻,肺孢子虫滋养体、包囊和包囊前体的胞膜以及虫体内的膜系结构均受到破坏,提示白果内酯有抗肺孢子虫作

(下转第 302 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



钟通气量原已增加的基础上适度增加通气量，增加通气量的方式应主要以增加通气频率为主，以避免增加对循环的干扰[5]。

### 3.2 后腹腔镜手术对老年病人血流动力学及血气的影响

腹腔镜 $CO_2$ 气腹可引起显著的血流动力学变化，其原因可能有，气腹导致腹内压和胸内压增高，血管活性物质如儿茶酚胺和血管加压素等释放增加，高碳酸血症诱发交感神经张力增加等[6]。后腹腔是人工腔隙，内含脂肪、结缔组织，$CO_2$ 在皮下组织易吸收，加上 $CO_2$ 吸收达平衡状态的时间较腹腔镜胆道手术长，对循环的干扰更大。$CO_2$ 吸收的量往往与灌注压力、手术时间长短有关。气腹后 MAP 增高、HR 增快、pH 降低是难以避免的，本组的观察发现这种对机体的干扰比腹腔镜胆囊手术大[2]。对老年病人、ASA III~IV 级的病人提倡以低 $CO_2$ 气腹压灌注为宜，以减轻对心脑血管系统及呼吸力学的干扰[7]。术中应严密监测 $PaCO_2$、$PetCO_2$，应根据手术进展情况及病人当时的状况，综合考虑是否继续腹腔镜手术还是中转开腹手术？健康人体对 $PetCO_2$ 有一定的调节范围，如果 $PetCO_2$ 大于 $(69 \pm 15)$ mmHg[8]，这对麻醉者是一个警示。应考虑到高 $PetCO_2$ 会对机体产生不可逆性损伤，甚至发生意外事件。

### 3.3 老年后腹腔镜手术的麻醉安全性

老年后腹腔镜手术病人麻醉的安全性取决于生命体征的相对稳定。后腹腔镜手术对老年病人最大的威胁是不可避免的高 $CO_2$ 血症以及血流动力学的波动。后腹腔镜手术过程中 $CO_2$ 吸收的量往往取决于手术时间长短、灌注压力、外科技术以及病人的心肺功能。在气腹开始前应常规采用 20%~30%的过度通气，以增加通气量，主要以增加呼吸频率为主。对合并有肺部疾病的病人应以采用低气腹压灌注为宜，以减轻对心脑血管系统及呼吸力学的干扰[8]。对手术时间较长者可以采用呼气末正压通气，以提高动脉血氧分压[9]。

密切监测是老年后腹腔镜手术病人麻醉的安全保障。通气功能、血流动力学、血气分析是不可缺少的，同时也应重视术中并发症如皮下气肿等的发生及处理。本组有 2 例术中发生严重的皮下气肿，伴有 $PaCO_2$ 增高超过 80mmHg，及时中转手术，病人安全度过围手术期。腹腔镜手术中 $PaCO_2$、$PaCO_2$ 的安全范围是多少？目前尚无报道。老年病人往往合并症多，气腹、侧卧位都会对病人产生负面影响，在密切监测下实施后腹腔镜手术麻醉是老年病人的安全保障。

## 参 考 文 献


[1] Abu-Rafea B, Vilos GA, Vilos AG, et al. High-pressure laparoscopic entry does not adversely affect cardiopulmonary function in healthy women[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2005; 12(6): 475-479.

[2] Streich B, Decailliot F, Perney C, et al. Increased carbon dioxide During retroperitoneal laparoscopy [J]. Br J Anaesth, 2003; 91 (6): 793-796.

[3] Fang Sd, Lin cz, Yang Hl, et al. Hemodynamic effects induced by pneumoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy under different anesthesia[J]. China Journal of endoscopy, 2004; 10(5): 47-50.

[4] 李仲宜，胡杏花，顾明祥，等. 腹腔镜肾上腺肿瘤切除术对血流动力学及血气的影响[J]. 中华泌尿外科杂志，2000; 8(21): 504.

[5] 王永光，张利东，徐建国，等. 后腹腔镜与腹腔镜手术对全麻患者通气功能的影响[J]. 临床麻醉学杂志，2004; 3(20): 146-148.

[6] Gutt CN, Oniu T, Mehrabi A, et al. Circulatory and respiratory complications of carbon dixide insufflation [J]. Dig Surg, 2004; 21: 95-105.

[7] Catani M, Guerricchio R, De Milito R, et al. "Low-pressure" laparoscopic cholecystectomy in high risk patients (ASA III and IV): our experience[J]. Chir Ital, 2004; 56(1): 71-80.

[8] Gao QC, Chen XM, Chen YX, et al. A study on shifts of cerebral autoregualtion following end-tidal CO2 by critical closing pressure[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005; 85(22): 1542-1546.

[9] Meininger D, Byhahn C, Mierdl S, et al. Positive end-expiratory pressure improves arterial oxygenation during prolonged pneumoperitoneum[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2005; 49(6): 778-783.


(上接第 246 页)

用，膜系结构可能是药物的作用部位。

## 参 考 文 献


[1] Ma L, Kovacs JA. Rapid detection of mutations in the human-derived Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase gene associated with sulfa resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001; 45(3): 776-780.

[2] 吴 坚，汪明亮. 银杏叶中萜内酯的研究进展[J]. 药学实践杂志，1999; 17(6): 356-358.

[3] 唐小葵，倪小毅，陈雅棠，等. 白果内酯抗实验大鼠卡氏肺孢子肺炎的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003; 25(10): 851-853.

[4] 倪小毅，陈雅棠. 改良 PCP 动物模型[J]. 重庆医科大学学报，2000; 25(4): 382-385.

[5] 杭振镳，蔡文琴. 电子显微镜术在临床医学的应用[M]. 重庆：重庆出版社，1988. 122-124.