382-384
(18)
维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2000)04-0382-03

改良卡氏肺孢子虫肺炎动物模型的建立

倪小毅、陈雅棠
（重庆医科大学传染病寄生虫病研究所　重庆　400016）

R563.1
R382.3

摘　要：目的　为了缩短诱发大鼠卡氏肺孢子虫肺炎（PCP）的时间，减少二重感染，我们对建立大鼠PCP模型的方法进行了改良。**方法**　用地塞米松皮下注射Wistar大鼠 2次/周，共4周，第2周时实验组气管内注入冻存的卡氏肺孢子虫，阴性对照注射正常大鼠肺匀浆，4周后剖杀大鼠。同时作常规卡氏肺孢子虫大鼠模型对照，8周后剖杀大鼠。**结果**　实验组大鼠PC感染90%(9/10)，阴性对照组仅20%(2/10)。常规大鼠模型组虽PC感染达90%，但二重感染高达40%（4/10）。**结论**　在抑制大鼠免疫功能的同时气管内注入冻存的卡氏肺孢子虫，可缩短大鼠发生PCP的时间，并明显减少了二重感染。提示是一种较好的诱发大鼠PCP模型的方法。

关键词：卡氏肺孢子虫肺炎；地塞米松；动物模型　　pcp
中国图书分类法分类号：R382.3　　**文献标识码：**A　　**收稿日期：**2000-02-18

Rapid animal model of pneumocystis carinii pneumonia

NI Xiao-yi, et al
(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Chongqing Medical University, 400016*)

Abstract: Objective We developed a modified method to get a rat model of PCP in shorter time with much less mixed infections. **Methods** Rats were immunosuppressed with dexamethasone twice a week for 4 weeks. The experimental rats were injected intratrachealy with cryopreservation Pneumocystis carinii and the negative controls injected intratrachealy with normal lung homogenate at end of 2nd week. All rats were killed at end of 4th week. At the same time, normal animal models served as positive controls and were killed at end of the 8th week.. **Results** 90% (9/10) of the experimental rats showed PC infection while only 20% (2/10) of the rats in the negative controls had PC infection. Although 90% of the positive controls also got PC infection, but there were 40% (4/10) mixed infections. **Conclusion** Therefore, it denoted that our modified method can shorten the time for the rat model to develop PCP with much less mixed infection.

Key Words: Pneumocystis carinii pneumonia (PCP); Dexamethasone; Animal model

卡氏肺孢子虫是一种重要的机会感染性寄生虫，可使免疫功能低下病人尤其是艾滋病人发生致死性肺炎。该病的动物模型早在50年代就开始研究，所采用的方法大多为低蛋白食物+肾上腺皮质激素类药物+抗生素，而诱发PC感染的时间多为8周以上[1,2]。为了使诱发PCP时间缩短，减少在此过程中动物伴发其它病原体的二重感染，我们对建立PC感染动物模型的方法进行了改良，现报告如下：

1　材料与方法

1.1　卡氏肺孢子虫的提取与冻存

1.1.1　卡氏肺孢子虫分离纯化：用常规方法诱导大鼠产生PCP（即皮下注射醋酸可的松25mg/次/只×6～8周），无菌技术取出完整肺脏，放入不含Mg^{2+}，Ca^{2-}的PBS（含200μg链霉素，200u青霉素，0.5μg二性霉素B/ml，即PBS+）[3]清洗三次，用剪刀剪碎，按每克肺组织加PBS+5ml，玻璃匀浆器匀浆，匀浆液离心500×g 10min，取上清液，沉渣加PBS+重悬后离心，重复2次。三次上清液集中后离心1800×g 20min，取沉淀，加DMEM+（含青霉素 90mg/L，链霉素 120 mg/L，二性霉素B 0.5 mg/L，10%新生牛血清）到所需量。取少量接种于血平板，若无细菌、霉菌生长，则该标本可用。

1.1.2　包囊计数：根据文献[4]取混悬液20μl，置于载玻片上，分别涂片2张，每1张涂片复盖面积约为$1cm^2$=10μl，空气干燥，甲醇固定，六亚甲基四胺银（GMS）染色[5]，计数包囊。每一面积数10个视野，共20个视野，计算出20个视野包囊均数，按以下公式算出每毫升液体含包囊数：

包囊数（个/ml）＝每个油镜视野包囊均数×每cm^2油镜视野总数×10^2

1.1.3　卡氏肺孢子虫冻存　将卡氏肺孢子虫悬液加入15%的二甲亚砜后置冻存管中，每管1ml，含卡氏肺孢子虫包囊5×10^6个，慢冻逐步降温：（4℃ 45min，-20℃ 45min，液氮蒸

作者介绍：倪小毅（1959-　），女，副教授，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

气30min）最后放入液氮罐中冻存备用。

1.2 动物试验

1.2.1 动物模型 纯系Wistar大鼠30只，雌性，体重120～150g，由本校动物中心提供。置普通敞式大鼠笼中颗粒饲料喂养。观察1周无异常后，将大鼠分3组，每组10只，1、2组大鼠皮下注射地塞米松2.5mg/次/只，每周2次，第3组大鼠皮下注射醋酸可的松25mg/次/只，每周2次，同时在饮水中加入四环素100mg/100ml，以预防细菌感染。

1.2.2 动物接种卡氏肺孢子虫 从液氮中取出卡氏肺孢子虫冻存管，立即放入37℃水浴中解冻，离心1000×g，10min，去上清液，加适量DMEM+，计数，每鼠注射2×10^5个包囊[6]，约0.2ml，方法如下：大鼠乙醚麻醉后，用自制气管内接种管、接上1ml注射器，吸0.4ml空气，再吸0.2ml悬液。将大鼠头部尽量向背侧牵拉，使气管伸直，曝露会厌，使接种管沿气管插入、注入0.2ml P.C悬液。大鼠立即有短暂呼吸困难，或咳嗽，或哮鸣等症状，表示已注入气管。立即抓住大鼠头部以重力旋转其身体数圈，使注射的液体均匀分布于全肺。将其送入鼠笼，大鼠很快恢复正常。第1组大鼠按此法接种冻存卡氏肺包子虫，第2组大鼠接种正常大鼠肺组织均浆。第3组大鼠不接种。第1、2组大鼠继续注射地塞米松2周，整个实验共4周，后全部剖杀。第3组大鼠连续注射醋酸可的松8周后全部剖杀。

1.2.3 肺组织包囊计数 每一实验动物按一定肺组织部位制作相同的肺组织印片。用GMS染色，计数100个油镜视野内包囊[7]。每视野按平均包囊密度划分：轻度感染<3个包囊/视野；中度感染3～10个包囊/视野；重度感染 >10个包囊/视野。

2 结 果

2.1 注射部位感染情况 实验结束时第1、2组大鼠无1只注射部位发生感染或瘘管形成。第3组大鼠有4只发生局部感染，其中1只局部红肿，2只发生脓肿，1只发生瘘管。

2.2 感染鼠全身情况 第1、2组大鼠四周末有轻度食欲减退，活动减少，毛色变暗，第一组大鼠有少量脱毛，但两组动物一般情况尚好。第3组大鼠从第6周开始出现精神萎靡、进食少、毛色灰暗、体毛松散并呈斑片状脱落、呼吸急促等症状。

2.3 死亡情况 第1组、第2组完成实验时无1只死亡，第3组大鼠在第5周至第8周期间共死亡4只（2只死于肺脓肿，2只死于腹泻）。

2.4 大鼠肺外观 第1组大鼠（除1只以外）肺外观均有不同程度的充血，其中3只（3/10）肺外观明显水肿，呈灰白色，肺体积和重量明显增加。第2组大鼠肺外观仅2只轻度充血，其余外观基本正常。第3组大鼠肺外观均有不同程度的充血水肿，其中2只有肺脓肿病变。

2.5 PC感染情况 大鼠肺印片包囊计数感染程度如表1所示。

表1 3组大鼠PC感染率比较

组别	n	无PC感染	感染PC只数		
			轻度	中度	重度
第1组	10	1	2	5	2
第2组	10	8	2	-	-
第3组	10	1	1	5	3

* 其中4只死亡

2.6 统计学处理 将各组大鼠按感染PC（包括轻、中、重度）和无感染划分，大鼠PC感染情况分别为：第1组发生PC感染9只（9/10），第2组2只（2/10），第3组9只（9/10）。将第1组与第2组大鼠发生PC感染情况进行比较并做χ^2检验，第1组发生PC感染较第2组高，其差异具有显著性（$P<0.01$），第1组与第3组比较，差异无显著性（$P>0.05$）。

3 讨 论

卡氏肺孢子虫的虫种大多来自动物模型。每周两次皮下注射醋酸考的松，7～8周后可在大鼠体内诱发卡氏肺孢子虫肺炎[2]，有的文献报道用皮质激素处理大鼠后9～12周方可作为有用的PCP模型[1]，此方法为国内外PCP动物模型建立的最常用的方法。但该法耗费时间较长，动物肺部并发感染（真菌、细菌感染）也明显增加，不利于卡氏肺孢子虫体外研究，如细胞培养、无细胞培养等工作的开展。因此，我们对建立PCP大鼠模型的方法作了三项改进。

3.1 卡氏肺孢子虫的冻存 根据我们对卡氏肺孢子虫的冻存实验，首先将卡氏肺孢子虫以15%二甲亚砜冻存备用。液氮冻存的虫种，可随时解冻取用，是保存虫种的简易方法。本文所用虫种已在液氮内冻存了三个月，解冻后供实验使用，可成功地制成PCP大鼠模型。估计还可作更长时间的保存。

3.2 免疫抑制处理加大鼠气管内PC接种 本实验第1组大鼠先经皮下注射地塞米松2周后再从气管内接种PC，2周后10只大鼠中有9只感染肺孢子虫，其中7只达到中重度感染，使大鼠PCP模型建立的时间明显缩短为4周，有利于PCP和卡氏肺孢子虫的相关研究。

在动物实验过程中事先用免疫抑制剂抑制大鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

的免疫功能是十分必要的，卡氏肺孢子虫是条件致病病原体，在免疫状态正常的大鼠即使有卡氏肺孢子虫存在也不易患PCP[8]。我们在预试验中发现，没有经免疫抑制处理的大鼠，接种卡氏肺孢子虫匀浆后短期内PCP的发生中、重度感染极少。因此我们将动物实验的方法进一步改良，事先对大鼠进行免疫抑制处理，2周后才经气管注入PC，既提高了感染PC的机会，又缩短了发生PCP的时间。

3.3 改用皮下注射地塞米松溶液：本实验第3组为常规应用注射醋酸可的松诱发PCP的方法，虽然有较高的PCP诱发率，但大鼠局部皮肤感染和肺部二重感染的发生率及死亡率均较高，而有二重感染的肺是绝不能用作提取PC体外实验的虫体来源。此外，醋酸可的松注射液为混悬液，每次注射1ml，必须用较大的针头，对局部损伤较为严重，因反复注射，局部吸收不良，易引起局部脓肿、溃疡、瘘管。本实验第1组改用地塞米松皮下注射，每次只需注射0.5ml（若为10mg/支，则注射体积更少）而且可用较细的针头，对局部损伤小。同时也能很好诱导出PCP。

本实验所用方法不但可缩短大鼠发生PCP的时间，还明显减少动物肺部的二重感染及局部皮肤感染，是一种快速建立PCP大鼠模型的较好方法。

参 考 文 献

[1] Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V. Animal models of pneumocystosis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1998; 22(1-2): 163-168.

[2] 陈雅棠，刘约翰，沈际琨，等. 大鼠肺孢子虫肺炎动物模型建立及病原学病理学观察[J]. 重庆医科大学学报，1989; 3(14):181-183.

[3] Cushion MT, Walzer PD. Growth and Serial Passage of Pneumocystis carinii in the A549 Cell Line[J]. Infect Immun, 1984; 44(2): 245-251.

[4] Bartlett MS, Vervanac PA, Smith JW, et al. Cultivation of Pneumocystis carinii with WI-38 cells[J]. J Clin Microbiol, 1979;10:796-799.

[5] 倪小毅，陈雅棠. 快速鉴定卡氏肺孢子虫[J]. 重庆医科大学学报，1999;24(3):283-285.

[6] Bartlett MS, Fishman JA, Queener SF, et al. New Rat Model of Pneumoxystis carinii Infection[J]. J Clin Microbiol 1988; 26: 1100-1102.

[7] 陈发凯，徐秉锟. 卡氏肺孢子虫感染裸小鼠的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志，1992;8(5):20-21.

[8] Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD et al. Parasitologic and serologic observations of infection with Pneumocystis in humans[J]. Infect Dis. 1977;136(1):43.

（上接第381页）

但不是唯一指标，还应结合细胞异型性、边界浸润、出血及凝固性坏死等综合因素才能对子宫平滑肌肉瘤作出正确诊断。

3.2 免疫组化Desmin，Actin在子宫平滑肌肿瘤中的表达

Desmin和Actin(HHF35)是肌源性肿瘤的标记物，可作为平滑肌肿瘤分化程度的指标。Evans等[4]检测了多种器官肌源性肿瘤Desmin的表达，其中5例普通型子宫平滑肌瘤瘤细胞胞浆为强阳性着色，2例奇异型子宫平滑肌瘤瘤细胞胞浆阳性程度较普通型更强，而2例子宫平滑肌肉瘤瘤细胞全部呈阴性；王美清等[5]也得出上述类似结果。Amada的研究[6]发现：肌肉特异性actin(HHF35, α-SMA)在几乎所有良性子宫平滑肌瘤中弥漫阳性，而24例子宫平滑肌肉瘤仅10例有HHF35或α-SMA染色局灶阳性；两者有显著差异(P=0.0004)。这些与我们的实验结果是相一致的，提示Desmin和Actin在子宫平滑肌肿瘤良恶性鉴别中有较重要的意义，Desmin或/和Actin表达阴性或弱阳性，应考虑恶性的可能。

参 考 文 献

[1] Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms: a clinical pathologic study of 213 cases [J]. Am J Surg Pathol, 1994;18:535-558.

[2] Perrone T, Dehner LP. Prognostically favorable "mitotically active" smooth-muscle tumors of the uterus [J]. Am J Surg Pathol, 1998;12(1):1-5.

[3] Oconnor DM, Norris HJ. Mitotically active leiomyomas of the uterus [J]. Hum Pathol, 1990;21:223-227.

[4] Evans DJ, Lampert IA, Jacobs M. Intermediate filaments in smooth muscle tumors [J]. J Clin Pathol, 1983;36:57-61.

[5] 王美清，徐艳峰，张延国，等. 51例子宫平滑肌肿瘤病理诊断标准的探讨[J]. 中华病理学杂志，1996;25(5):263-265.

[6] Amada S, Nakano H, Tsuneyoshi M. Leiomyosarcoma versus Bizarre and cellular leiomyomas of the Uterus: a comparative study based on the MIB-1 and proliferating cell nuclear antigen indices, P53 expression, DNA flow cytometry, and muscle specific actins [J]. Int J Gynecol Pathol. 1995;14:134-142.