DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.005
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

文章编号:1000-5404(2003)10-0851-03

论著

白果内酯抗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验研究

唐小葵[1],倪小毅[2],陈雅棠[2],王 健[3],吴亚梅[1],卢 萍[2] (重庆医科大学:[1]附属一院肺科;[2]传染病寄生虫病研究所;重庆 400016;[3]深圳市第二人民医院呼吸内科,深圳 518035)

提 要:目的 研究白果内酯治疗实验大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的疗效。方法 以地塞米松皮下注射大鼠6周诱导建立肺孢子虫肺炎动物模型,用不同剂量白果内酯治疗实验大鼠,以免疫抑制为对照组,通过大鼠肺质量/体质量的值,肺印片每视野的包囊均数为指标评价疗效。结果 白果内酯20 mg/kg、30 mg/kg治疗组大鼠肺质量/体质量的值分别为0.009 7±0.003 3、0.010 2±0.002 1,明显低于免疫抑制组对照组0.014 6±0.003 4($P<0.05$)。白果内酯20 mg/kg、30 mg/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($P<0.01$)。结论 白果内酯具有一定抗卡氏肺孢子虫肺炎作用。

关键词:白果内酯;卡氏肺孢子虫;治疗
中图法分类号:R382.3;R563.130.53;R978 文献标识码:A

Experimental study of the effect of bilobalide on *pneumocystis carinii*

TANG Xiao-kui, NI Xiao-yi, CHEN Ya-tang, WANG Jian, WU Ya-mei, LU Ping (Department of Pulmonary Diseases, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of bilobalide on *pneumocystis carinii pneumonia* (PCP) in rats. Methods PCP rat model was established by hypodermic injection with dexamethasone twice a week for 6 weeks. The PCP rats were intraperitoneally administered with bilobalide at dose of 20 mg/kg and 30 mg/kg of body weight daily for 8 days. The immunosuppressed rats were served as control. The therapeutic effect was evaluated by lung weight/body weight ratio and mean cyst number per field of lung print smear. Results The lung weight/body weight ratio and mean cyst number per field of lung print smear of rats treated with bilobalide of 20 mg/kg and 30 mg/kg were (0.009 7±0.003 3), (0.010 2±0.002 1), and (2.31±0.88), (1.95±0.57), lower than those of the immunosuppressed rats control (0.014 6±0.003 4) ($P<0.05$) and (7.39±2.33) ($P<0.01$). Conclusion Bilobalide is effective in the treatment of *pneumocystis carinii* pneumonia.

Key words: bilobalide; *pneumocystis carinii*; therapeutic

卡氏肺孢子虫肺炎(*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP)是免疫缺陷病人常见的机会性感染。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恶唑其毒副作用明显,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。白果内酯为银杏叶中的有效活性内酯成分,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。最近,我们用白果内酯治疗实验大鼠PCP,发现该药对肺孢子虫有一定抑制作用,值得进一步研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

白果内酯(Sigma公司),用0.8 ml无水乙醇溶解40 mg白果内酯,然后加生理盐水9.2 ml制成白果内酯水溶液;复方磺胺甲基异恶唑(西南制药股份公司),用10 ml生理盐水溶解240 mg复方磺胺甲基异恶唑;用无水乙醇作为溶媒,将0.8 ml无水乙醇与9.2 ml生理盐水混匀后制成溶液。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 纯系Wistar大鼠105只,雌性,体质量230~270 g,由本校实验动物中心提供,大鼠PCP动物模型建立按文献[2]报道方法略作修改。每只大鼠皮下注射地塞米松3.5 mg/次,每周2次,连续6周,经6周诱导后,用简单随机抽样法随机选取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[2],即大鼠PCP模型建立成功。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070680);重庆市卫生局青年科学基金资助项目(99-3019)
作者简介:唐小葵(1972-),女,湖北省蒲圻市人,硕士,主治医师,主要从事呼吸系统疾病方面的研究。电话:(023)69012605
收稿日期:2002-06-21;修回日期:2002-12-27

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

1.2.2 实验动物分组 将PCP大鼠75只用随机数字表法随机分为5组，A组：免疫抑制大鼠对照组(15只)，注射地塞米松6周，不给予任何药物治疗；B组：溶媒对照组(15只)，注射地塞米松6周，腹腔内注射乙醇0.4 mg·kg^{-1}·d^{-1}×8 d；C、D组：白果内酯(Bilobalide，BL)治疗组(每组15只)，注射地塞米松6周后，腹腔内注射白果内酯20 mg·kg^{-1}·d^{-1}×8 d、30 mg·kg^{-1}·d^{-1}×8 d；E组：复方磺胺甲基恶唑(SMZCo)治疗对照组(15只)，注射地塞米松6周后，灌胃SMZ+TMP，SMZ100+TMP20 mg·kg^{-1}·d^{-1}×8 d。于第7周开始治疗，连续用药8 d后，停药并观察1周，第9周处死评价疗效。

1.2.3 疗效评价 在治疗实验过程中观察各组大鼠存活状态，记录存活只数，存活天数，每周称重。实验完毕时，杀鼠取肺去除气管及肺门组织，吸干表面水分后称全肺湿质量，将每只鼠的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，GMS染色，油镜观察[3]。顺序观察100视野，计数肺孢子虫包囊数，计算每肺每视野的包囊均数，再计算每组的包囊均数。取左肺上部分小块组织，10%甲醛固定，石蜡包埋，制成切片，经HE和GMS+伊红双重染色后观察。

1.3 统计学处理

实验资料经审核后用SAS软件进行分析，多组间比较用方差分析(F检验)，两组间比较用q检验。

2 结果

动物模型建立成功后，将PCP大鼠随机分为5组，每组15只，实验结束时，各组大鼠均有不同程度的死亡，白果内酯20 mg/kg、30 mg/kg治疗组和SMZCo治疗对照组大鼠存活数分别为13只、12只、13只，免疫抑制对照组和溶媒对照组大鼠存活数各10只。

2.1 各组大鼠肺质量、肺质量/体质量比比较，见表1

白果内酯20 mg/kg治疗组、30 mg/kg治疗组、SMZCo治疗对照组大鼠治疗后的体质量增加，肺质量降低，肺质量/体质量比明显降低，与免疫抑制对照组和溶媒治疗组比较有显著性差异($P<0.05$)。

表1 各组大鼠的肺质量、肺质量/体质量比比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of lung weight and ratio of lung weight to body weight in different groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Mean body weight at start of therapy(g)	Mean body weight at end of therapy(g)	Mean lung weight(g)	Mean ratio of lung weight to body weight(×10^{-2})
A	10	186±15	201±24	2.93±0.72	1.46±0.34
B	10	179±13	195±18	2.91±1.02	1.50±0.51
C	13	186±12	216±21	2.12±0.75	0.97±0.33 *△
D	12	186±13	218±28	2.23±0.61	1.02±0.21 *△
E	13	191±16	212±29	2.14±0.66	0.98±0.51 *△

*：$P<0.05$ *vs* A，△：$P<0.05$ *vs* B

2.2 各组大鼠肺印片每视野包囊均数比较，见表2

白果内酯20 mg/kg、30 mg/kg治疗组与SMZCo治疗对照组每视野包囊均数明显低于免疫抑制对照组和溶媒治疗组，与之比较有显著性差异($P<0.01$)。

表2 各组大鼠肺孢子虫包囊均数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of the mean cysts of *pneumocystis carinii* in different groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Mean No of cysts Per	cysts(%)
A	10	7.39±2.33	——
B	10	7.08±3.57	4.19
C	13	2.31±0.88 **△△	68.74
D	12	1.95±0.57 **△△	73.61
E	13	1.05±0.44 **△△	85.80

**：$P<0.01$ *vs* A；△△：$P<0.01$ *vs* B

$$\text{包囊减少率}=\frac{\text{免疫抑制对照组包囊数}-\text{药物治疗组包囊数}}{\text{免疫抑制对照组包囊数}}\times 100\%$$

2.3 病理观察

免疫抑制组大鼠肺切片HE染色镜下可见肺实变明显，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。采用GMS+伊红染色，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。

白果内酯治疗组大鼠肺切片HE染色镜下可见肺实变明显减轻，肺泡腔内渗出减少，只有少数肺泡腔中有少许渗出。GMS+伊红染色肺切片镜下可见存在肺孢子虫包囊的肺泡和肺泡腔中包囊数量均明显减少，见图1。

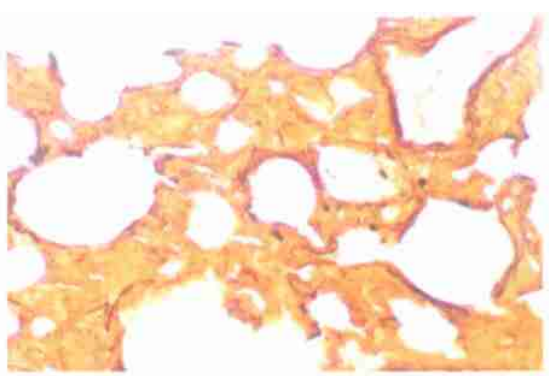


图1 经BL治疗后，大鼠肺内PC明显减少 (GMS+伊红×400)

Fig 1 The decreased PC cysts in rat lungs after treatment with bilobalide (GMS+E×400)

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

3　讨论

PCP 常见于各类先天或获得性免疫机能障碍者, 在 AIDS 患者中, PCP 位于所有机会感染之首, 并为其重要致死原因之一。由于目前用于治疗该病的主要药物 SMZCo 和戊脘脒严重的毒副作用和耐药的出现, 寻找新的高效低毒的药物是很有必要的。目前发现羟基萘醌类化合物阿托喹酮通过影响肺孢子虫嘧啶的生物合成起到杀虫作用, 已被美国食品药品管理局批准为抗 PCP 二线药物[4], 一些抗真菌药物如 FK463、Sordarin 的衍生物、terbinafine[5] 和青蒿素、阿苯哒唑等在实验动物体内和体外具有抗肺孢子虫的活性。本研究通过白果内酯对大鼠 PCP 治疗的体内研究, 发现该药具有较好的抑制肺孢子虫作用。

本研究选用肺质量/体质量的值, 肺印片的每视野包囊均数等作为评价指标, 并结合病理综合观察判断药物抗肺孢子虫作用。BL 治疗组大鼠经过 8 d 的治疗后病情缓解, 体质量增加、肺质量减低、肺质量/体质量的值较免疫抑制组大鼠明显降低, 该指标为评价疗效的良好指标, 它反映了 PCP 的严重程度[6]。结合 BL 治疗组大鼠肺实变明显减轻、肺泡腔内渗出明显减少的病理结果, 可说明经 BL 治疗后大鼠肺部炎症明显缓解吸收。

评价疗效最直接有效的指标是衡量肺内的肺孢子虫负荷, 观察经 GMS 染色的肺印片, 计数肺孢子虫包囊数是经典有效的方法。本研究表明, BL 治疗组大鼠肺印片平均每视野包囊数明显减少, 与免疫抑制组有显著性差异。在 GMS＋伊红染色的肺切片中, 可见存在肺孢子虫包囊的肺泡和肺泡腔中包囊数量均减少, 说明经 BL 治疗后大鼠肺内的肺孢子虫负荷明显减低。该结果与 Atzori 等[7] 的研究结果一致, BL 在体内和体外均有抑制肺孢子虫生长的作用, 在体内 BL 能阻止肺孢子虫与肺泡上皮细胞膜的相互作用, 在体外能阻止肺孢子虫与用于培养的肺细胞的相互作用, 这可能与其亲脂性的半萜内酯分子结构有关。

总之, 上述研究结果显示 BL 对大鼠 PCP 有明显的治疗效果, 有可能成为一种新的抗肺孢子虫的药物。

参考文献:

[1] Powel Kazanjian, Wendy Armstrong, Paul A. Hossler, *et al*. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients[J]. JID, 2000, 182(8): 551－557.

[2] 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

[3] 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.

[4] Cushion M T, Collins M, Hazra B, *et al*. Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. Carinii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(3): 713－719.

[5] Ito M, Nozu R, Kuramochi T. Prophylactic effect of FK463, a novel antifungal lipopeptide, against *Pneumocystis carinii* infection in mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(9): 2259－2262.

[6] Kim C K, Foy J M, Cushion M T, *et al*. Comparison of histologic and quantitative techniques in evalution of therapy for experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987, 31(2): 197－201.

[7] Atzori C, Bruno A, Chichino G, *et al*. Activity of Bilobalide, a Sesquiterpene from Ginkgo biloba, on *Pneumocystis carinii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(7): 1492－1496.

（编辑　冯崇英）

（上接 847 页）

舒适, 无患者感觉难受, 对照组 78.5%的患者感觉难受, 无患者感觉舒适。统计分析两组间相差非常显著($P<0.01$)。

血氧饱和度、心率及血压变化: 两组血氧饱和度均有轻度下降, 但无统计学意义($P>0.05$); 对照组患者检查前心率为(88.9±16.6)次/min, 检查中心率为(107.9±17.4)次/min, 较检查前明显增加($P<0.05$), 检查后恢复, 而实验组患者心率无明显变化($P>0.05$); 对照组检查中血压为(157.4±20.4)/(83.2±11.5) mmHg, 较检查前收缩压和舒张压增高显著($P<0.05$), 检查后渐恢复至检查前水平, 实验组在检查中血压为(127.4±20.4)/(63.2±11.5) mmHg, 较检查前有所下降(15～25 mmHg), 但在检查完成后迅速恢复正常。

3　讨论

由于胃镜检查时患者心情紧张、胃镜管的刺激(尤其是刺激会厌产生呛咳, 恶心, 呕吐等反应)导致儿茶酚胺分泌增加, 致使胃镜检查过程中心率血压发生显著变化[1], 这对高血压病人不利, 严重者可产生脑血管意外, 因此对高血压患者进行常规胃镜检查有所顾虑。

异丙酚静脉注射后起效快, 能使患者迅速进入浅睡眠状态, 而且药物维持时间短, 患者苏醒快; 咪唑安定镇静效果好, 近期遗忘作用明显。研究发现严格控制两药用量, 对呼吸无明显抑制, 不良反射被抑制, 心率、血压、SpO_2 无明显变化。临床中广泛用于门诊手术及检查的麻醉。在实验组所观察的 50 例高血压患者中, 发现注射异丙酚和咪唑安定后可使其血压及血氧饱和度轻度下降, 心率无明显变化, 在我们临床应用中未发生有严重的麻醉意外。但是对重要器官功能不全, 肺部感染, 消化道或呼吸道活动性出血的病人使用还需要进一步的研究[2]。

异丙酚及咪唑安定静脉注射对高血压患者进行胃镜检查可减少心血管反应、提高检查安全性, 同时显著减少患者痛苦和不适, 具有较高的推广应用价值。

关键词: 胃镜; 异丙酚; 咪唑安定
中图法分类号: R971.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王　旭, 曹国梁. 常见胃镜并发症的病因分析[J]. 中华消化内镜杂志, 2001, 4(10): 3124.

[2] 方秧青, 朱黎明. 异丙酚静脉麻醉应用于门诊胃镜检查术[J]. 河北医学, 2002, 04(6): 231.

（编辑　栗　嘉）

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