

究的 64 例全程随访者中, 尚有 4 例(6.3%)于服药后第 3 天的无性体原虫未转阴, 因其腋温不符合早期治疗失败的服药后第 3 天腋温 ≥ 37.5 °C 而判为完全临床原虫治疗成功, 由于服药后第 4~6 天未随访, 未能获得其确切的转阴时间, 但该 4 例患者从服药至服药后第 3 天随访最小跨度时间为 65.9 h, 比作者在云南观察的最长无性体原虫转阴时间 (63 h)^[3]长, 这可能与当地恶性疟原虫对哌喹和青蒿素类敏感性下降有关, 推测当地部分恶性疟原虫可能对双氢青蒿素哌喹片敏感性下降, 应加强对该药的抗性和疗效的长期监测。

参 考 文 献

[1] WHO. The use of artemisinin and its derivatives as anti-malarial drugs: Report of a joint CTD/DMP/TDR informal consultation [R]. Geneva: World Health Organization, 1998: 10-12.

[2] WHO. The use of antimalarial drugs: Report of an informal consultation [R]. Geneva: World Health Organization, 2000: 13-17.

[3] Sun XD, Zhang ZX, Liu DQ, et al. Clinical study on the efficacy of dihydroartemisinin and piperazine in treatment of multi-drug resistant Plasmodium falciparum [J]. Chin Trop Med, 2006, 6(2): 211-212. (in Chinese)
(孙晓东, 张再兴, 刘德全, 等. 双氢青蒿素哌喹片治疗云南恶性疟的临床观察[J]. 中国热带医学杂志, 2006, 6(2): 211-212.)

[4] Yang YM, Yang HL, Dong Y, et al. In vitro sensitivity of

Plasmodium falciparum to seven antimalarial drugs in China-Burma border area [J]. J Prac Parasit Dis, 1994, 2(3): 23-26. (in Chinese)
(杨亚明, 杨恒林, 董莹, 等. 中缅边境地区恶性疟原虫对 7 种抗疟药敏感性的体外测定[J]. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2(3): 23-26.)

[5] Yang HL, Liu DQ, Yang YM, et al. In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas [J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 1997, 28(3): 460-464.

[6] Yang HL, Liao MZ, Dong Y, et al. In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum in China-Burma border to chloroquine, artesunate and pyronaridine [J]. Chin J Parasit Dis Control, 1994, 7(1): 4-6. (in Chinese)
(杨恒林, 廖明铮, 董莹, 等. 中缅边境西段缅甸恶性疟原虫对氯喹、青蒿琥酯及咯萘啶的敏感性体外测定[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(1): 4-6.)

[7] WHO. Guidelines for the treatment of malaria [M]. Geneva: World Health Organization, 2006.

[8] WHO. Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission [M]. Geneva: World Health Organization, 1996.

[9] WHO. Monitoring antimalarial drug resistance: report of a WHO consultation [R]. Geneva: World Health Organization, 2002.

[10] Yang HL, Li XL, Gao BH, et al. Surveillance of Plasmodium falciparum susceptibility to seven antimalarials, including artemether, in the western part of the Sino-Myanmar border area [J]. Chin J Pathogen Biol, 2009, 4(11): 831-832. (in Chinese)
(杨恒林, 李兴亮, 高白荷, 等. 中缅边境西段恶性疟原虫对 7 种抗疟药敏感性的监测[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(11): 831-832.)

(收稿日期: 2010-11-30 编辑: 高石, 杨频)

文章编号: 1000-7423(2011)-05-0375-03

【研究简报】

卡氏肺孢子菌肺炎大鼠超氧化物歧化酶和过氧化脂质变化的研究

刘兴辉^{1*}, 周必英², 戴晓煌²

【提要】 24 只 SD 大鼠分为卡氏肺孢子菌肺炎感染组(18 只)和健康对照组(6 只)。感染组以地塞米松磷酸钠 3.5 mg/(只·次), 每周 2 次, 连续 8 周腹腔皮下注射 SD 大鼠, 建立卡氏肺孢子菌肺炎动物模型。肺组织印片六亚甲基四胺银染色和肺组织病理切片伊红-苏木素(HE)染色观察实验大鼠肺组织的病理学变化。分光光度法检测肺组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)活力和过氧化脂质(LPO)含量。结果显示, 感染组大鼠可见卡氏肺孢子菌包囊并发现典型病理改变; 感染组 SOD 值[(31.49±7.18) U/mgprot]与健康对照组[(54.41±8.97) U/mgprot]相比, 差异有统计学意义(P<0.01); 感染组 LPO 值 [(2.26±0.21) nmol/mgprot]与健康对照组[(1.63±0.01) nmol/mgprot]相比, 差异有统计学意义(P<0.01)。

【关键词】 卡氏肺孢子菌肺炎; 超氧化物歧化酶; 过氧化脂质

中图分类号: R382.33

文献标识码: B

Changes of Superoxide Dismutase and Lipid Peroxide in Rats with Pneumocystis carinii Pneumonia

LIU Xing-hui^{1*}, ZHOU Bi-ying², DAI Xiao-huang²

作者单位: 1 南华大学附属南华医院检验科, 衡阳 421001; 2 遵义医学院, 遵义 563003

* 通讯作者, E-mail: qingfeng0715@126.com

(1 Clinical Laboratory of Nanhua Hospital Affiliated to University of South China, Henyang 421001, China; 2 Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

【Abstract】 Sprague-Dawley(SD) rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia(PCP) was established by groin subcutaneous injection with dexamethasone sodium phosphate 3.5mg each twice a week for eight weeks. There were two groups: infected group (eighteen rats) and normal control group (six rats). Pathological changes in lung tissues were observed in the lung imprint after staining with Gomori methenamine silver (GMS) and in tissue sections after staining with hematoxylin-eosin (HE). The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of lipidperoxide (LPO) in lung tissue homogenate were detected by spectrophotometric method. Results showed that in infected group more PC cysts were found in the lung imprint and typical pathological change observed in the lung section. SOD activity in infected group [(31.49±7.18) U/mgprot] decreased significantly compared with the control [(54.41±8.97) U/mgprot] ($P<0.01$), but LPO in infected group [(2.26±0.21) nmol/mgprot] was higher significantly than the control [(1.63±0.01) nmol/mgprot] ($P<0.01$).

【Key words】 *Pneumocystis carinii* pneumonia; Superoxide dismutase; Lipid peroxide

* Corresponding author, E-mail: qingfeng0715@126.com

卡氏肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP) 是大鼠感染卡氏肺孢子菌 (*Pneumocystis carinii*, Pc) 后所引起的一种致命性肺炎。PCP 是免疫功能低下的宿主最为主要的并发症和死因之一。有研究发现, 免疫功能低下的患者 PCP 的发病率可达 7%–41%, 若未经治疗死亡率可达 60%^[1]。目前关于 PCP 发病机制的研究很多, 有资料显示, PCP 发病过程中存在明显的肺泡毛细血管膜通透性增高、基底膜剥脱和 I 型上皮细胞坏死等肺损伤^[2]。也有研究表明, 自由基与急性肺损伤关系密切, 在肺损伤过程中, 氧自由基如过氧化脂质 (lipid peroxide, LPO) 增多, 自由基产生和清除的酶系如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 减少^[3,4]。但是 PCP 发病过程中自由基是否发生变化尚未见报道。本研究观察 PCP 的大鼠 SOD 活性和 LPO 浓度变化, 探讨自由基是否与 PCP 的发病过程有关, 结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 大鼠 24 只, 雌雄各半, 体重 222.9–290.5 g, 清洁级, 购自重庆第三军医大学野战外科研究所动物室。

1.2 主要试剂和仪器 超氧化物歧化酶试剂盒和脂质过氧化物试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 可见分光光度计 (721 型) 为上海申仪仪表自动化控制公司产品, 地塞米松磷酸钠注射液购自重庆迪康长江制药有限公司, 六亚甲基四胺银 (GMS) 购自成都联合化工试剂研究所, 伊红-苏木素 (HE) 购自上海山浦化工有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 PCP 模型的建立 按文献[5]方法进行。将 24 只 SD 大鼠分为 2 组, 每组均雌雄各半, 其中感染组 18 只, 健康对照组 6 只。感染组经腹股沟皮下注射地塞米松磷酸钠 3.5 mg/(只·次), 每周 2 次, 连续注射 8 周, 建立 PCP 动物模型。健康对照组与感染组分别在不同的实验室饲养, 正常饮食和饮水, 连续 8 周。

1.3.2 肺组织印片的制作和观察 断颈处死大鼠, 无菌环境下打开胸腔, 取出肺脏, 用无菌生理盐水洗净, 以肺组织切面在处理过的洁净载玻片上制备印片, 室温干燥后用 10% 甲醛固定 3 min, 晾干, 采用六亚甲基四胺银染色^[6], 在显微镜下观察肺组织感染情况。

1.3.3 肺组织病理切片的制作和观察 取肺组织用生理盐水洗

净, 10% 甲醛固定, 乙醇浓度梯度 (75%、85%、95% 和 100%) 脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、连续切片 (厚度 6 μm)、HE 染色, 封片, 显微镜下观察其病理变化。

1.3.4 SOD 和 LPO 的测定 称取 0.2 g 肺组织, 剪碎, 放入试管中, 加 1 ml 4 ℃ 生理盐水, 将试管置于冰水浴中, 用超声粉碎仪粉碎肺组织, 5 s/次, 间隔 10 s, 反复 8–10 次。再加入 4 ℃ 生理盐水至 2 ml, 超声粉碎仪匀浆 2 次, 5 s/次, 制备成 10% 的匀浆。用低温低速离心机, 3 000×g 离心 15 min, 取上清液, 用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆。按试剂盒操作说明书测定匀浆 SOD 活力和 LPO 含量。

1.4 统计学分析 用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 实验数据用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 肺印片 GMS 染色结果 显微镜观察结果显示, 感染大鼠肺印片可见清晰的 Pc 包裹, 呈圆形、椭圆形或不规则形, 囊壁棕色或棕褐色, 部分包裹可见括号样结构, 或核状物和条索状结构, 囊内小体不着色 (图 1)。

2.2 肺切片观察 感染组大鼠多数肺泡壁增厚, 部分肺泡腔毛细血管和肺间质小血管扩张充血, 部分肺泡腔内见充血, 肺间质伴多量淋巴细胞、巨噬细胞和少量中性粒细胞等炎症细胞浸润, 呈间质性肺炎改变。少部分胞浆内可见体积大、有丰富泡沫状胞浆的巨噬细胞, 肺泡腔内可见泡沫状渗出物, 部分肺泡扩张甚至相互融合呈肺气肿改变 (图 2)。

2.3 肺组织匀浆中 SOD 和 LPO 的变化 感染组大鼠和健康对照组大鼠 SOD 活力分别为 (31.49±7.18) 和 (54.41±8.97) U/mgprot, LPO 含量分别为 (2.26±0.21) 和 (1.63±0.01) nmol/mgprot, 两者差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨 论

动物体内存在自由基产生和清除的酶系 (如 SOD), 当自由基的产生超出机体的清除能力时, 会发生脂质过氧化反应, 产生过氧化脂质 LPO, 它们保持着动态平衡。若这种平衡被破坏, 自由基的产生超过机体的清除能力, 就会造成自由基的堆积, 从而攻击生物膜使其中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化链

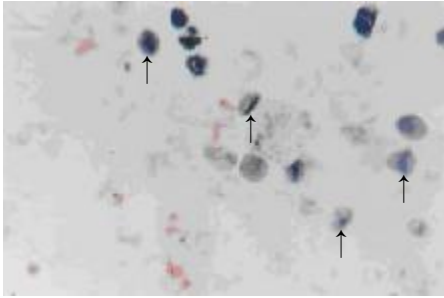
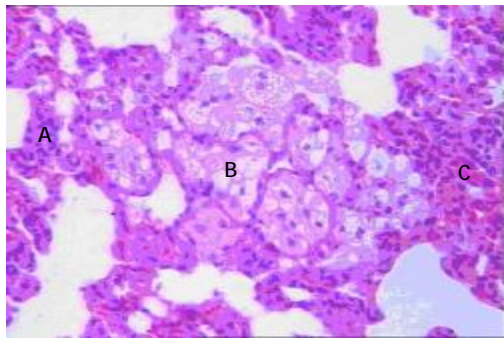


图 1 感染组大鼠肺印片可见较多 Pc 包囊(↑, ×1000)



A: 炎症细胞浸润; B: 泡沫样巨噬细胞; C: 毛细血管扩张充血。

图 2 感染组大鼠肺组织切片(HE 染色, ×400)

式反应, 产生大量 LPO, 后者不但可造成细胞本身结构和功能受损, 而且还会损伤其他组织细胞^[7,8]。LPO 和 SOD 含量分别反映了机体的氧化反应和抗氧化能力。

本研究发现, 感染组大鼠肺印片可见 Pc 包囊并出现炎症细胞浸润、大量的泡沫样巨噬细胞和毛细血管扩张充血等病理学变化, 说明 PCP 诱导成功, 并发现 PCP 感染组大鼠与健康对照组相比, SOD 活力下降, 而 LPO 升高, 提示氧自由基参与了 PCP 的病理过程。这与病毒性肺炎^[9]、新生儿肺炎^[10]和支气管肺炎^[11]等肺炎中报道的相似。肺是与氧代谢有密切关系的组织, 肺组织本身具备抗氧化系统, 肺内自由基增加可导致细胞损伤, 导致体内脂质过氧化, 引起肺实质损伤。研究表明, 在肺损伤过程中, 白细胞和巨噬细胞在炎症趋化作用下, 通过吞噬、脱颗粒和呼吸暴发释放活性氧和氧自由基, 大量自由基引起肺组织细胞损伤^[3,4]。本研究发现, PCP 发病过程中有巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞浸润, 提示这些炎症细胞通过吞噬、呼吸暴发产生大量氧自由基(如 LPO), 当这些自由基超出了机体自身清除自由基的能力时, SOD 活力下降。

本研究证实, 氧自由基参与了 PCP 的发病过程, 在此过程中, 机体氧化反应亢进, 抗氧化的能力下降, 如果在综合治疗的基础上辅以一定剂量的自由基清除剂, 或可减轻肺炎的临床症状^[12], 对缩短疗程、降低病死率有一定作用。

参 考 文 献

- [1] Su XP, An CL, Guo FS, et al. Analysis of 100 cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia in China [J]. Chin J Zoonoses, 2002, 18(6): 91-93. (in Chinese)
(苏晓平, 安春丽, 郭福生, 等. 我国卡氏肺孢子虫肺炎 100 例分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(6): 91-93.)
- [2] Qu JM, Rong ZH, Pan J, et al. The study on relationship between the burden of *Pneumocystis carinii* and lung injury [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2000, 13(3): 178-180. (in Chinese)
(瞿介明, 容朝晖, 潘珏, 等. 卡氏肺孢子虫虫体负荷与肺损伤关系的研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(3): 178-180.)
- [3] Tyurina YY, Tyurin VA, Kaynar AM, et al. Oxidative lipidomics of hyperoxic acute lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation [J]. Am J Physiol-Lung C, 2010, 299(1): L73-85.
- [4] Vaporidi K, Francis RC, Bloch KD, et al. Nitric oxide synthase 3 contributes to ventilator-induced lung injury [J]. Am J Physiol-Lung C, 2010, 299(2): 147-149.
- [5] Tang XK, Li XY, Chen YT, et al. Experimental study of the effect of bilobalide on *Pneumocystis carinii* [J]. Acta Acad Med Militaris Tertiae, 2003, 25(10): 851-853. (in Chinese)
(唐小葵, 倪小毅, 陈雅棠, 等. 白果内酯抗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(10): 851-853.)
- [6] Zhou BY, Dai XH, Wan QH. Improvement of Gormori methenamine silver staining method for *Pneumocystis* [J]. Acta Acad Med Zunyi, 2005, 28(2): 177-178. (in Chinese)
(周必英, 戴晓煌, 万启惠. 肺孢子虫六胺银染色方法的改进 [J]. 遵义医学院学报, 2005, 28(2): 177-178.)
- [7] Shen WM. Biological free radicals and cell membrane [J]. Foreign Med Sci Section Paediatr, 1990, 19(4): 203-207. (in Chinese)
(沉伟敏. 生物自由基与细胞膜 [J]. 国外医学儿科学分册, 1990, 19(4): 203-207.)
- [8] Hu MC, Cai Y. Effect and Prevention of active oxygen in pediatric disease [J]. Foreign Med Sci Section Paediatr, 1988, 17(2): 61-63. (in Chinese)
(胡明昌, 蔡毅. 活性氧在儿科疾病中的作用及防治 [J]. 国外医学儿科学分册, 1988, 17(2): 61-63.)
- [9] Sun YJ, Liu D. The study of SOD and LPO in viral pneumonia of 91 patients [J]. J Ningxia Med, 1995, 17(2): 97-98. (in Chinese)
(孙月姝, 刘东. 91 例病毒性肺炎的 SOD 及 LPO 变化研究 [J]. 宁夏医学杂志, 1995, 17(2): 97-98.)
- [10] Quan W, Wu PY, Tian RY, et al. Serum SOD, LPO and VE levels in patients with neonate pneumonia [J]. J Neonat Paediatr, 1994, 9(5): 217-217. (in Chinese)
(全文, 吴培云, 田如意, 等. 新生儿肺炎患儿血中 SOD、LPO 和 VE 的测定 [J]. 新生儿科杂志, 1994, 9(5): 217-217.)
- [11] Zhao PG. Clinical significance of changes of serum SOD, LPO and GSH-PX levels in pediatric patients with broncho pneumonia [J]. J Radioimmun, 2010, 23(3): 277-278. (in Chinese)
(赵沛光. 支气管肺炎患儿治疗前后 SOD、LPO、GSH-PX 检测的临床意义 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3): 277-278.)
- [12] Deng FW, Xiang YL. The auxiliary treatment effect to the children with pneumonia with oxygen free radical scavengers [J]. Med Inform, 2010, 23(4): 112. (in Chinese)
(邓发文, 向艳丽. 氧自由基清除剂佐治小儿肺炎的观察 [J]. 医学信息, 2010, 23(4): 112.)

(收稿日期: 2011-03-09 编辑: 高石)