

# 卡氏肺孢子虫感染小鼠动物模型的研究

陈锡慰<sup>①</sup> 荣珩<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>南京医科大学病原生物学系 南京 210029; <sup>②</sup>南京大厂妇幼保健所 南京 210035)

**摘要:** 采用口服肾上腺皮质激素的方法在国产昆明小鼠成功诱导卡氏肺孢子虫感染。在 54 只实验鼠中,47 只发现虫体,阳性率为 87.03%。表明该方法可适用于建立卡氏肺孢子虫感染的小鼠动物模型,并具有简便、经济等优点。

**关键词:** 卡氏肺孢子虫;动物模型;甲苯胺蓝染色;姬氏染色

**中图分类号:**R382.3 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)04-48-03

## A Study on the Animal Model of *Pneumocystis carinii* Infection in Mice

CHEN Xi-Wei<sup>①</sup> RON Heng<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>Nanjing Medical University Nanjing 210029;

<sup>②</sup>Dachang Children and Women Health Station of Nanjing Nanjing 210035, China)

**Abstract:** The infection of *Pneumocystis carinii* in Kunming mice was established by oral intake using prednisolone. Of 54 experimental mice, *P. carinii* was found in 47 mice and the infection rate was 87.03%. The result shows that the inducing method is suitable for establishing the mice model of *P. carinii* infection and has both simple and economical advantages.

**Key words:** *Pneumocystis carinii*; Animal model; Toluidine blue O stain; Giemsa's stain

---

第一作者介绍 陈锡慰,51岁,男,副教授,医学硕士;研究方向:医学寄生虫学;

收稿日期:2000-05-08,修回日期:2001-03-05

卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*) 寄生在人和多种哺乳动物的肺内, 属机会性致病寄生虫。在免疫力低下的宿主, 如艾滋病患者, 可引起卡氏肺孢子虫性肺炎, 致死率极高。该虫在宿主免疫功能下降时, 开始大量增殖, 诱发肺炎。对此致病过程, 除观察到宿主体内 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞绝对值下降以外, 尚不清楚其它的致病机理。因此, 寻找适宜的卡氏肺孢子虫感染动物模型, 是研究该虫致病机理所必需的步骤。本文报道在国产昆明小鼠建立卡氏肺孢子虫感染动物模型的方法。

## 1 材料与方法

**1.1 昆明小鼠的选择和免疫抑制方法** 选择我校动物中心繁殖的昆明小鼠, 体重 10 g 左右, 雄性小鼠 30 只, 雌性 24 只。免疫抑制剂采用醋酸氢化泼尼松 (hydroprednisoni acetatis), 每支含 125 mg/5 ml。为了防止细菌感染, 采用盐酸多西环素片 (盐酸脱氧土霉素), 每片含 0.1 g, 均为国产药物。将上述醋酸氢化泼尼松 1 支和盐酸多西环素片 10 片放入 2000 ml 洁净的自来水中, 充分震荡混匀, 作为小鼠的饮水。每 100 ml 饮水大约可供 4~5 只小鼠饮用 3~4 日。小鼠食物系我校动物中心提供的复合饲料, 由该中心自外单位购得, 而非低蛋白饲料。对实验中途死亡的小鼠予以剖胸取肺制作涂片; 对出现消瘦、蓬毛、运动迟缓和呼吸困难的小鼠, 则予处死后取肺制备涂片。每一小鼠至少制备 4 张涂片, 并待自然干燥后, 用甲醇固定备用。

**1.2 甲苯胺蓝 (toluidine blue O, TBO) 染液配制与染色方法** 基本上按作者已报道的方法进行, 所有试剂均为国产, 并要求新鲜配制<sup>[1]</sup>。

**1.2.1 配制硫化乙醚** 将 100 ml 乙醚置分馏瓶内, 再加入 30 ml 蒸馏水, 用力震荡。至上下两层分界清晰, 且下层转为透明后, 弃去下层水, 允许少量乙醚洗涤通路。取 80 ml 已用水饱和的乙醚加入烧杯内, 然后缓慢加入 80 ml 浓硫酸混匀, 此即为硫化乙醚。一般需置棕色瓶内密封保存。

**1.2.2 配制甲苯胺蓝染液** 由甲苯胺蓝色素

300 mg, 蒸馏水 60 ml, 浓盐酸 2 ml 和无水乙醇 140 ml 组成。先用蒸馏水溶解色素, 再加入盐酸和无水乙醇。

**1.2.3 染色方法** 涂片风干, 立即染色时不需甲醇固定。置硫化乙醚内 5 min 后, 水洗 10 遍。甲苯胺蓝染液内染色 3 min 后, 异丙醇脱水 3 次。二甲苯透明、封片。

**1.3 姬氏染色** 姬氏染色的原液可按疟原虫的染色方法配制, 也可从有关试剂公司购买。用于卡氏肺孢子虫染色时, 一般采用 1:20 的稀释液, 用 pH 7.2 的磷酸缓冲液配制。染色时间原则上为 1 h。为使囊内小体清晰, 可延长至 2~3 h 以上。肺印片风干后, 甲醇固定 2~3 min 后染色<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与讨论

本研究中, 在激素使用后 45 d 死亡 1 小鼠, 肺涂片经甲苯胺蓝染色, 发现已有卡氏肺孢子虫感染。经甲苯胺蓝染色的该虫包囊呈紫红色、圆形; 滋养体的膜染成蓝色, 但难以识别, 背景为深蓝色。54 只实验鼠中, 发现虫体的有 47 只, 阳性率为 87.03%。在大多数鼠中, 每一油镜视野可见虫数为 3~4 个。在免疫抑制后 2 个月处死的 30 只鼠中, 有 28 只发现虫体, 阳性率为 93.33%; 免疫抑制后 70~90 d 处死的 23 只鼠中, 虫体阳性率为 78.26% (18/23)。阳性率高峰在感染后 2 个月左右, 这与采用大鼠的动物模型结果相似。至 3 个月前后, 感染鼠内虫数量减少, 可能与动物自愈现象有关。姬氏染色仅能使滋养体的核和胞浆着色, 核呈紫红色, 胞浆为蓝色; 卡氏肺孢子虫包囊的囊壁不着色, 成熟包囊内的 8 个囊内小体清晰可见, 此为姬氏染色中鉴定卡氏肺孢子虫的依据。由于散在的滋养体, 形态易于与姬氏染色的色素颗粒以及该染料着色的其它类似颗粒相混淆, 一般难以确认。本研究 54 只小鼠经姬氏染色确认虫体感染的仅 8 只, 阳性率为 14.81% (表 1)。表明该方法难以用于诊断, 这与其他学者的研究结果一致。

卡氏肺孢子虫所引起的肺炎在免疫功能低

下的宿主有着较高的发病率和致死率,在美国的艾滋病病毒感染者,其并发率高于 60%;如未及时治疗者,死亡率几乎为 100%<sup>[3]</sup>。在脏器移植者,也是常见的并发症,且往往导致移植

手术以失败而告终。因此,有必要深入研究卡氏肺孢子虫性肺炎的发生机制,特别是与宿主免疫状态的关系。在此方面,采用动物模型是必需的途径。

表 1 小鼠模型中卡氏肺孢子虫的感染结果

小鼠 编号	检查结果		小鼠 编号	检查结果		小鼠 编号	检查结果		小鼠 编号	检查结果	
	TBO	姬氏		TBO	姬氏		TBO	姬氏		TBO	姬氏
1	+	-	15	+	-	29	+	-	43	+	-
2	+	-	16	+	+	30	+	+	44	+	+
3	+	-	17	+	-	31	+	-	45	+	-
4	+	+	18	+	-	32	+	-	46	-	-
5	+	-	19	+	-	33	+	-	47	+	-
6	+	-	20	+	+	34	+	-	48	+	-
7	+	-	21	+	-	35	-	-	49	-	-
8	+	-	22	-	-	36	+	-	50	+	-
9	-	-	23	+	-	37	+	-	51	-	-
10	+	-	24	+	-	38	+	-	52	+	-
11	+	-	25	+	+	39	+	-	53	-	-
12	+	+	26	+	-	40	+	-	54	+	-
13	+	-	27	+	-	41	+	+	阳性		
14	+	-	28	+	-	42	+	-	合计	47	8

注:1号鼠在免疫抑制后 45 d 死亡,2~31 号鼠在免疫抑制处理后 60 d 处死,32~34 号鼠在免疫抑制处理后 70 d 处死,35~54 号鼠在免疫抑制处理后 90 d 处死。

已有仓鼠、豚鼠、兔、裸鼠和犬等动物感染模型的研究,大多采用感染动物或患者肺匀浆制备的含虫液,经鼻感染动物,以确定该虫的感染性。目前报道较多的是以激素诱导大鼠感染的模型,但从经济和操作便利角度来看,仍存在缺点。

有关小鼠感染模型的研究,分别有采用经鼻感染和激素皮下注射法等,但呈现不同的结果。Walzer 等采用皮下注射激素诱导小鼠感染方法,发现感染程度与鼠的种系有关。C3H/HeN 感染较重,BALB/cAnN、C57BL/6N 为中度感染,DBA/2N 感染较轻<sup>[5]</sup>。本实验使用的国产昆明小鼠获得较高感染的结果表明,这一动物模型及其诱导方法可用于该虫致病机制及其它方

面的研究,并具有动物价格低廉、来源广等优势。

## 参 考 文 献

- [1] 陈锡慰. 甲苯胺蓝染色的卡氏肺孢子虫包囊中发现特征性括号状结构. 中国血吸虫病防治杂志, 1993, 5(1): 46~48.
- [2] 吉田幸雄. *Pneumocystis carinii* Pneumonia. 东京:南山堂, 1981, 203~204.
- [3] 吉田幸雄. 图说人体寄生虫学, 第 4 版. 东京:南山堂, 1991, 62~71.
- [4] Farrow, B. R. H. et al. *Pneumocystis carinii* in the dog. *J. Comp. Path.*, 1972, 82:447~453.
- [5] Walzer, P. D. et al. Experimental *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Indifferent strains of cortisonized mice. *Infect. Immun.*, 1979, 24: 839~847.