

课题研究·论著

人型耶氏肺孢子虫姬姆萨氏染色形态表达

陈敬捷, 李勇, 何晗, 苏凌松, 刘春明, 秦松树, 唐柳生, 李世立, 胡宏波

基金项目: 国家十一五科技重大专项资金资助项目(编号:2008ZX10005-003); 广西卫生厅自筹经费科研课题(编号:Z2007030)

作者单位: 545005 柳州, 广西壮族自治区龙潭医院检验科(陈敬捷, 何晗, 唐柳生, 李世立), 艾滋病科(李勇, 苏凌松); 柳州市中心医院检验科(刘春明); 柳州市肿瘤医院检验科(秦松树); 柳铁中心医院检验科(胡宏波)

作者简介: 陈敬捷(1959-), 男, 大学本科, 医学学士, 副教授, 副主任技师, 研究方向: 生物化学和形态学。E-mail: chenjjie5903@163.com

通讯作者: 胡宏波(1972-), 男, 医学硕士, 副主任技师, 研究方向: 分子生物学。E-mail: goodman220125@163.com

【摘要】 目的 研究人型耶氏肺孢子虫姬姆萨氏染色形态。方法 采用姬姆萨氏染色法涂片染色痰液和肺泡灌洗液孢子虫, 在油镜下观察形态。结果 痰液人型孢子虫大小约 1.0~7.5 μm, 包囊圆形或椭圆形, 包囊囊壁染成淡蓝色, 囊内小体染成紫红或紫蓝色; 滋养体胞浆染成淡蓝色, 内容细胞质染成紫红或紫蓝色; 包囊可单个、几个、散在、成群或串状存在, 成群排列常伴不同发育阶段孢囊和滋养体, 虫体大小差异较大, 形态多样, 成熟典型的包囊很少, 大多是不成熟包囊或滋养体。结论 人型肺孢子虫姬姆萨氏染色形态较动物孢子虫形态更显大小不均、形态多样, 常以不成熟包囊和滋养体在片中表达。

【关键词】 耶氏肺孢子虫(菌); 姬姆萨氏染色; 染色形态

【中图分类号】 R 382.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2011)10-0913-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.10.01

Giemsa's dyeing form expression of human pneumocystis jirovecii CHEN Jing-Jie, LI Yong, HE Han, et al. Department of Clinical Laboratory, Longtan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Liuzhou 545005, China

【Abstract】 Objective To study Giemsa's dyeing form of human pneumocystis jirovecii (PJ). **Methods** Giemsa staining method was used for smearing and dyeing of sputum and BALF PJ. The PJ forms were observed under microscope with oil immersion lens. **Results** PJ in sputum showed about the size of 1.0~7.5 μm. Its cysts were round or oval. The cyst wall was light blue. Intracystic bodies were purple or purplish blue. Trophozoite cytoplasm was light blue. Its cytoplasm was purple or purplish blue. The cysts can be single, several, scattered, arranged in groups, or clusters. In the cysts arranged in groups there were different development stages of trophozoites. The difference of bug body size was bigger. Bug body form was diversiform. Typical mature cysts were very rare. Immature cysts and trophozoites were in the majority. **Conclusion** Giemsa's dyeing form of human PJ have more types than animal PJ. Often in immature cysts and trophozoites are in the majority in the film expression.

【Key words】 Pneumocystis jirovecii; Giemsa staining; Dyeing form

耶氏肺孢子虫肺炎(pneumocystis jirovecii pneumonia, PJP)是由肺孢子虫(pneumocystis jirovecii, PJ)寄生于肺部引起的一种严重的致命性肺炎^[1]。目前将寄生于鼠类者称为卡氏肺孢子虫(pneumocystis carinii, PC),寄生于人体者称为耶氏肺孢子虫(pneumocystis jirovecii)^[2]。在大量实验中笔者发现感染人类耶氏肺孢子虫的姬姆萨氏染色形态与文献报道动物模型肺卡氏孢子虫的姬姆萨氏染色形态存在一定差异^[3-5],为充实人们对肺孢子虫认识,提高艾滋病合并肺孢子虫肺炎及其他肺孢子虫病的检查质量,促进学术交流,现将人型肺孢子虫姬姆萨氏染色形态报告分析如下。

1 材料和方法

1.1 病例来源 病例来源于广西壮族自治区龙潭医院艾滋病科和关爱门诊艾滋病合并 PJP 患者及柳州市中医院肾移植患者,时间为 2004-03~2010-01,共检查 4 721 例,其中阳性 1 793 例,阳性检出率为 37.98%,阳性涂片妥善保存备查。

1.2 方法

1.2.1 标本留取方法 (1)痰标本:按早晨、夜间和随机时间采用专用痰杯分别留取一份标本,要求漱口深咳,共三份痰标本一道送检,当天涂片当天完成检查。(2)支气管肺泡灌洗液(BALF):行支气管肺泡灌洗术,收集 30~50 ml 灌洗液,立即送检。

1.2.2 样本检查 (1)痰标本:三份痰标本分别涂一张1.5 cm × 2.0 cm 薄片,行姬姆萨氏染色15~30 min,染色液配制按《全国临床检验操作规程》(第3版)^[6]执行。(2)BALF:将收集的全部灌洗液离心沉淀,取沉淀物均匀涂片三张,染色方法同上。

1.2.3 技术人员要求 检验者要求具有检验师以上专业资格,且经过专门PJP实验检验技术培训。

1.2.4 仪器和设备 上海复星ACT-2000超高分图文系统;日本OLYMPUS CH-40生物显微镜,目镜安装测量标尺;日本OLYMPUS BF-P30支气管纤维镜。

1.3 统计学方法 使用SPSS13.0统计软件处理肺孢子虫直径数据。

2 结果

2.1 孢子虫直径测量结果 从1793例阳性片中随机抽取50例涂片,进行孢子虫直径测量,结果最大7.5 μm,最小1.0 μm,平均4.3 μm,中位数4.2 μm。

2.2 典型成熟包囊形态 直径约4 μm,囊壁染成淡蓝色,靠边缘颜色加深且不规则,囊内小体清晰可见(约8个),着紫红色或紫蓝色。但典型成熟孢子不易见到(图1)。

2.3 包囊多样性形态 染色痰片中可见到各式各样和不同排列的包囊,可单个、几个或成群,甚至成片分布;成群包囊可含不同发育阶段虫体,有成熟、未成熟、囊前期、滋养体以及小体从囊里溢出后形成的“空壳包囊”,但大多为不成熟包囊,多数外形呈规则的圆形或椭圆形,少数不规则,边缘可见“波浪或刺状”突起;包囊囊壁染色成淡蓝色,边缘突起染色较深;囊内可有几个大小形态不一的小体,染成紫红或紫蓝色,也常见到囊内小体溶合在一起,染色较深,有核固缩现象,整个包囊非常形似骨髓瑞氏染色的“晚幼红”细胞^[7](图2)。

2.4 滋养体形态 滋养体相对包囊比较少见,常夹杂在成群包囊里,其外形不规则,细胞质染成淡蓝色,核质分布不规则,染成紫红色或紫蓝色(图3)。

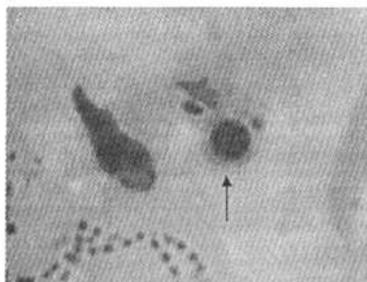


图1 典型成熟包囊形态(1000 ×)

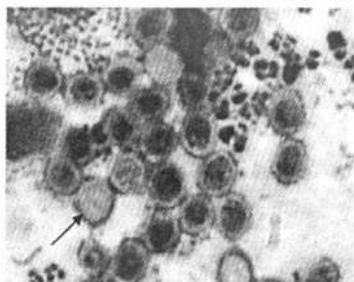


图2 一群包囊中有“核固缩”和“空壳包囊”(1000 ×)

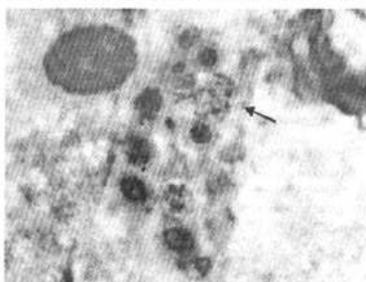


图3 滋养体与包囊形态(1000 ×)

2.5 囊前期包囊形态 囊前期包囊尺寸较小,约为1~3 μm,外形似瓜子仁样,囊内似小体核质物居中间或靠边(图4)。

2.6 排列和分布情况 当痰中PJP较多时,PJP大多

几个或成群散落于片中(大多数阳性片PJP是很少的,找见者多是单个),PJP除了成群成堆排列外,还发现常见成串排列。视野背景可见伴上皮细胞、白细胞、真菌和其它微生物。排列见图5,6。

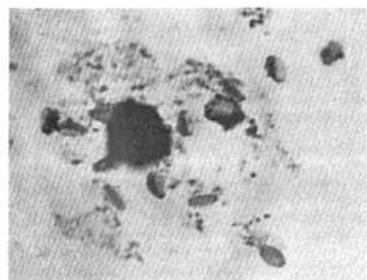


图4 囊前期包囊形态(1000 ×)

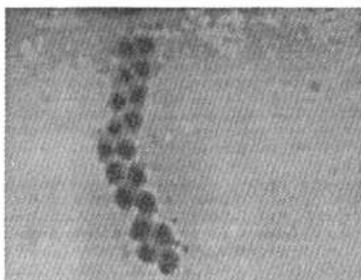


图5 成串排列的包囊(1000 ×)

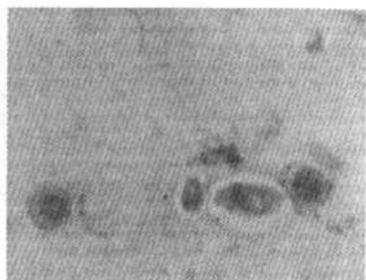


图6 散在包囊和真菌(1000 ×)

3 讨论

目前认为卡(耶)氏肺孢子虫有滋养体、囊前

期、包囊三种形态,本组通过姬姆萨氏染色方法对艾滋病患者痰液和BALF标本及肾移植者痰液进行肺

孢子虫检查,取得大量一手图片资料和经验,参考有关孢子虫检查研究文献,发现大多来源于大鼠动物模型研究,而研究人类的罕见,其未见专门研究人型肺孢子虫染色形态的报道。国内姜云霞等^[8]采用扫描电镜对大鼠模型肺孢子虫进行了形态学专门研究,他们观察到虫体有表面光滑和表面粗糙两种形态,粗糙型虫体表面呈浅蜂窝状,或有粗细不等的管状物,有大小不一的颗粒及壁上有凹陷、脱囊及伪足。同时他们还用光学显微镜观察了大鼠模型肺孢子虫经瑞-姬氏染色形态,其包囊为圆形,囊壁透亮,囊内小体可见紫红色的细胞核和蓝色的细胞质,数量不等,部分包囊无囊内小体,滋养体呈圆形、椭圆形、月牙形或不规则形,或一端钝圆,一端较尖,成堆或散在分布,细胞核呈紫红色,细胞质为淡蓝色。Murphy等^[9]用扫描电镜对原始鸡胚肺上皮细胞培养的鼠源卡氏肺孢子虫进行观察,虫体明显呈多态性,可见表面光滑、外壁微绒毛样结构,表面呈波浪状或有明显凹陷的虫体。Balachandran等^[10]用扫描电镜观察人胸腔液中卡氏肺孢子虫滋养体表面有粗短的丝状突起。Itatani等^[11]观察到卡氏肺孢子虫包囊壁上有凹陷,推测囊内小体系通过包囊壁孔向外逸出。李文桂等^[12]用扫描电镜观察大鼠卡氏肺孢子虫,包囊呈球形,表面凹凸不平,具有棘状、指状小突起。囊内小体逸出后,囊壁呈半球形。倪小毅等^[13]用扫描电镜观察细胞培养基中的卡氏肺孢子虫表面有较密集的微绒毛结构,用药物作用后,虫体表面微绒毛脱落及出现凹陷性损伤。纵观上述微观孢子虫形态描述,可以佐证本组染色形态研究的一些结论,即人型肺孢子虫也大致分为滋养体、囊前期、包囊三种形态,滋养体外形多变,可有伪足、突起、大小不一、类似阿米巴;囊前期形态不易界定,其体积较小,囊内有可见核物质,囊内似小体核质物居中或靠边,形态似南瓜子样;包囊也较为多变,因发育过程的原因可分成成熟包囊和未成熟包囊,成熟包囊因小体脱壳作用可形成无小体空壳包囊,空壳包囊可凹陷、偏曲及边缘缺损,完整包囊囊壁较厚,着蓝色淡浅,边缘可不齐,膜边可呈毛玻璃样深染、不均匀,囊内含3~8个不等的小体,染成紫红或紫蓝色,细胞质染淡蓝色。当临床用药后,由于药物作用包囊可观察到虫体形态发生变化。刘克芹等^[14]在大鼠感染卡氏肺孢子虫试验中发现对照组与SMZ组比较,SMZ组包囊壁不完整或消失,核碎裂或减少;刘成伟等^[15]用扫描电镜观察经双氢青蒿素治疗后的大鼠肺组织卡氏肺孢子虫,表面微绒毛稀疏、变

小,甚至脱落,残存的微绒毛变形,虫体表面出现凹陷,周边不规则,表膜出现较大较深的缺陷。本组系人类 AIDS 合并 PJP 感染,因人类较动物接受药物更多,多数 AIDS 患者使用 SMZ 预防和治疗,因药物作用可以看到更严重的畸形变化,使典型包囊结构很少找到,常见的是囊内小体由于核碎裂,相互融合,使染色后的囊内小体界限不清,形成一个大的细胞核,整体看似骨髓细胞分析中的“中晚幼红细胞”。笔者认为这一形态特点可以作为 PJP 痰液和 BALF 标本姬姆萨氏染色涂片检查诊断的标志性特征,其特点在油镜视野中非常明显,故记住和熟悉这一鲜明特点,对提高阳性率非常重要,并可使 PJP 检查变得更简单而容易掌握。

参考文献

- 1 卢致民,张振明,张进顺.肺孢子虫肺炎研究进展[J].河北北方学院学报(医学版),2008,25(1):68-71.
- 2 林睿,黎学铭,张陆娟,等. AIDS 患者合并感染耶氏肺孢子虫的巢式 PCR 检测及 ITS 基因的克隆测序[J].应用预防医学,2009,15(4):198-202.
- 3 佟小莺,纪伟华.瑞-姬代染液复合染色法诊断卡氏肺孢子虫肺炎的研究[J].中国寄生虫病防治杂志,2002,15(4):220-221.
- 4 李自慧,卢思奇.卡氏肺孢子虫肺炎动物模型及虫体体外培养研究[J].中国寄生虫病防治杂志,2004,17(4):251-253.
- 5 王元松,常志尚,张忠广,等.卡氏肺孢子虫标本染色方法的改进[J].青岛大学医学院学报,2004,40(3):278-279.
- 6 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].第3版.南京:东南大学出版社,2006:889.
- 7 陈敬捷,李勇,何晗,等.艾滋病合并耶氏肺孢子虫(菌)肺炎的实验室诊断[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2011,29(3):81-83.
- 8 姜云霞,官玉香,张忠广,等.卡氏肺孢子虫扫描电镜观察[J].中国病原生物学杂志,2008,3(4):292-294.
- 9 Murphy MJ, Linda L, Hughes WT. Pneumocystis carinii in vitro: A study by scanning electron microscopy [J]. Am J Pathol, 1977, 86(2):387-401.
- 10 Balachandran I, Jones DB, Humphrey DM. A case of Pneumocystis carinii in pleural fluid with cytologic, histologic and ultrastructural documentation [J]. Acta Cytol, 1990, 34(4):486-490.
- 11 Itatani CA. Ultrastructural demonstration of a pore in the cyst wall of Pneumocystis carinii [J]. J Parasitol, 1994, 80(4):644-648.
- 12 李文桂,陈雅棠,刘成伟,等.双氢青蒿素对大鼠体内卡氏肺孢子虫作用的超微结构研究[J].中国地方病学杂志,2004,23(1):28-31.
- 13 倪小毅,陈雅棠,王健,等.青蒿素衍生物体外抗卡氏肺孢子虫作用的扫描电镜观察[J].中国寄生虫病防治杂志,2003,16(4):193-195.
- 14 刘克芹,尹卫东,薛贵平,等.大鼠感染卡氏肺孢子虫后血清中 10 种酶测定结果分析[J].河北北方学院学报(医学版),2005,

22(1):19-22.

838-840.

15 刘成伟,陈雅棠,李文桂,等.扫描电镜观察双氢青蒿素对大鼠体内卡氏肺孢子虫表面形态的影响[J].重庆医学,2004,33(6): [收稿日期 2011-05-22][本文编辑 韦挥德 吕文娟]

课题研究·论著

VEGF 及 nm23 在广西地区食管癌中的表达及其相关性研究

苏乃伟, 冯 旭, 覃家锦

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科青 0640047),项目得到广西大型仪器网测试资助

作者单位: 530003 南宁,广西壮族自治区妇幼保健院外科(苏乃伟); 530021 南宁,广西医科大学第一附属医院心胸外科(冯 旭,覃家锦)

作者简介: 苏乃伟(1978-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:心胸外科疾病诊治。E-mail:sunaiwei2408@sina.com

通讯作者: 冯 旭(1971-),男,博士,硕士研究生导师,副主任医师,教授,研究方向:心胸外科疾病诊治。E-mail:feng_xudr@sina.com.cn

[摘要] 目的 探讨血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)及 nm23 在广西地区食管癌中的表达及其与临床病理因素的关系。方法 用免疫组织化学链霉素亲生物素-过氧化物酶(Streptavidin-Peroxidase, SP)法检测 80 例食管癌及 10 例正常食管黏膜组织中 VEGF、nm23 的表达。结果 VEGF 在食管癌组织中的阳性表达显著高于正常食管黏膜组织($P < 0.05$); VEGF 的高表达与食管癌患者的年龄、性别、组织学类型无关($P > 0.05$),而与分化程度、浸润程度、区域淋巴结转移情况及 TNM 分期有关($P < 0.05$)。nm23 在食管癌组织中的阳性表达显著低于正常食管黏膜组织($P < 0.05$); nm23 的表达与患者的性别、年龄、组织学类型、分化程度、浸润程度无关($P > 0.05$),而与有无淋巴结转移及 TNM 分期有关($P < 0.05$)。VEGF、nm23 之间呈负相关($r = 0. -0.520, P < 0.05$)。结论 VEGF 在广西地区食管癌的发生、侵袭、淋巴结转移过程中起一定的作用; nm23 的表达缺失与食管癌的发生密切相关,可作为评价食管癌预后良好的指标之一; VEGF、nm23 在参与食管癌的发生过程中起相互抑制的作用。

[关键词] 食管癌; VEGF; nm23; 免疫组织化学

[中图分类号] R 735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)10-0916-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.10.02

Expression of VEGF and nm23 in esophageal cancer in Guangxi and the relationship between them SU Naiwei, FENG Xu, QIN Jia-Jin. Department of Surgery, the Maternal and Children's Health Care Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the level of VEGF and nm23 expression in esophageal cancer and normal esophageal mucosa in Guangxi, and detect their relationships with clinical predictive indicators. **Methods** The levels of VEGF and nm23 expression in 80 cases of esophageal cancer and 10 cases of normal esophageal mucosa were detected by SP immunohistochemical method. **Results** VEGF positive expression rate in esophageal cancer was significantly higher than that of normal esophageal mucosa ($P < 0.05$). VEGF positive expression rate had no significant correlation with the patient's age, sex, and histological type ($P > 0.05$), but was correlation with degree of the differentiation, tumors invade depth, clinical stage, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). nm23 positive expression in esophageal cancer significantly lower than that of normal esophageal mucosa ($P < 0.05$). nm23 positive expression had no significant correlation with the patient's age, sex, histological type, degree of the differentiation, and tumors invade depth ($P > 0.05$), but it was correlation with lymph node metastasis and clinical stage ($P < 0.05$). VEGF had negative correlation with nm23 ($r = 0. -0.520, P < 0.05$). **Conclusion** The over-expression of VEGF and The