

• 基础实验研究 •

肝脏组织 S-腺苷甲硫氨酸酶与卡氏肺孢子虫肺炎的相关性研究

张金花^{1,2}, 杨霞霞¹, 万启惠^{1△}

(1. 遵义医学院寄生虫学教研室, 贵州 563003; 2. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨卡氏肺孢子虫肺炎大鼠模型肝脏组织 S-腺苷甲硫氨酸酶的变化。方法 给 SD 大鼠皮下注射地塞米松建立肺孢子虫肺炎动物模型, 采用改良的六亚甲基四胺银染色法检测获得肺组织中的肺孢子虫包囊, 利用组织 S-腺苷甲硫氨酸酶检测试剂盒测定肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量。结果 感染组大鼠全部感染了卡氏肺孢子虫, 感染率为 100%; 肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量为(0.254 5±0.067 9)μmol/mg, 正常对照组大鼠卡氏肺孢子虫包囊的检出率为 0%, 肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量为(0.401 4±0.087 8)μmol/mg, 感染组与正常对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.05)。结论 卡氏肺孢子虫肺炎大鼠肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量明显降低, 提示测定肝脏组织 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量可以辅助诊断卡氏肺孢子虫肺炎。

关键词:肺炎, 肺囊虫性; 甲硫氨酸腺苷转移酶; 肺组织

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)18-2082-02

Research on the correlation between S-adenosylmethionine enzyme in liver tissue and Pneumocystis carinii pneumonia

Zhang Jinhua^{1,2}, Yang Xiaxia¹, Wan Qihui^{1△}

(1. Teaching and Research Section of Parasitology, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China;

2. Department of Clinical Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To study the changes of S-adenosylmethionine enzyme in liver tissues of rats with Pneumocystis carinii pneumonia. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were subcutaneously injected with dexamethasone sodium phosphate to establish animal model of Pneumocystis carinii (P. carinii) pneumonia. The cysts of P. carinii in the lung tissues were observed by staining with the improvement gormori methenamine silver (GMS), and the content of liver S-adenosylmethionine enzyme was detected by using AdoMet kit. **Results** All rats of infection group were infected with P. carinii, the content of liver S-adenosylmethionine enzyme of which was 0.254 5±0.067 9 μmol. No rat of control group was infected with P. carinii, and the content of liver S-adenosylmethionine enzyme in control group was 0.401 4±0.087 8 μmol. There was statistical difference of the content of liver S-adenosylmethionine enzyme between the two groups (P<0.05). **Conclusion** The content of liver S-adenosylmethionine enzyme in rats with P. carinii pneumonia reduced obviously, indicating that detecting the content of liver S-adenosylmethionine enzyme could be used for the auxiliary diagnosis of P. carinii pneumonia.

Key words: pneumonia, pneumocystis; methionine adenosyltransferase; lung tissues

卡氏肺孢子虫肺炎(pneumocystis carinii pneumonia PCP)是由卡氏肺孢子虫(Pneumocystis carinii, Pc)引起的一种呼吸系统感染疾病, 多见于免疫功能低下的患者, 是艾滋病(HIV)首要的并发症和重要的致死原因, 故对卡氏肺孢子虫肺炎的诊断和治疗就显得尤为重要。现通过检测实验大鼠肝脏组织中的 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量来探讨一种辅助诊断卡氏肺孢子虫肺炎的方法, 并为治疗卡氏肺孢子虫提供一种可能的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 30 只清洁级 SD 大鼠由第三军医大学大坪医院动物中心提供, 动物许可证号为 SCXK(军)2002008, 体质量为 180~220 g, 均为雌性。实验动物随机分为正常对照组(8 只)和感染组(22 只)。

1.2 实验试剂 GENMED 组织 S-腺苷甲硫氨酸酶连续循环比色法定量检测试剂盒由上海杰美基因生物公司提供, BCA 法蛋白定量试剂盒由 Generay 生产。

1.3 实验方法

1.3.1 建立动物模型^[1] 感染组大鼠于腹股沟处皮下注射地塞米松磷酸钠注射液 3.5 mg/只/次, 2 次/周(每周测体质量 1 次, 根据体质量变化而适当调整用药剂量), 并给予含 1 mg/mL 四环素的冷开水以预防继发性细菌感染。正常对照组大鼠饮用冷开水中不加四环素。实验大鼠均自由饮水和摄食, 普通混合颗粒饲料喂养。定期用紫外灯消毒动物室, 用消毒水拖地, 更换鼠笼垫料, 通风设施良好。感染组大鼠与正常对照组大鼠分别饲养在不同动物室内, 防止交叉感染。

1.3.2 标本采集 实验动物均于实验第 8 周末采用乙醚麻醉后断颈处死, 无菌取出肺脏和肝脏组织, 用肺组织切面在洁净载玻片上印片, 室温干燥后 10% 甲醛溶液固定 3 min, 流水冲洗后晾干备用。肝脏组织放入青霉素小瓶中-140℃液氮保存备用。

1.3.3 肺印片染色 按参考文献[2-3]采用改良的六亚甲基四胺银染色法染色。

1.3.4 S-腺苷甲硫氨酸酶测定 严格按照组织中 SAM 酶检

△ 通讯作者, E-mail: qhwan@sina.com。

测试剂盒操作说明进行,裂解液中蛋白含量测定严格按总蛋白含量操作说明书进行。

1.4 统计学处理 所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件包处理,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病原学检测结果 GMS 染色油镜下观察,发现肺印片有清晰可见的 Pc 包裹,呈圆形、椭圆形或不规则形,囊壁呈黑褐色,部分包裹可见括弧样结构,或可见核状物及条索状结构,囊内小体不着色。正常对照组大鼠均未感染卡氏肺孢子虫,感染率 0%;感染组除 1 只死亡外其余 21 只全部感染了卡氏肺孢子虫,感染率 100%,见图 1。



图 1 感染组大鼠肺印片显示的大量 Pc 包裹(GMS $\times 1\ 000$)

2.2 肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶含量 感染组大鼠肝脏组织中的 S-腺苷甲硫氨酸酶与正常对照组比较明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 两组大鼠肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶含量结果比较

组别	感染率(%)	SAM 酶含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
正常对照组	0	0.401 4 \pm 0.087 8
感染组	100	0.254 5 \pm 0.067 9 \blacktriangle

\blacktriangle :与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine; SAM 或 AdoMet)是参与甲基转移的辅酶和多胺合成的前体,通过甲硫氨酸腺苷转移酶催化腺苷三磷酸和甲硫氨酸结合而成。作为供体,参与转甲基、转硫和转氨丙基代谢以及多胺合成。大约 40 多个反应转甲基反应,由 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基到核酸、蛋白质和脂类分子上,主要反应场所在肝脏。S-腺苷甲硫氨酸异常改变与多种临床疾病密切相关(如 S-腺苷甲硫氨酸异常增高与肿瘤等的发生有关),S-腺苷甲硫氨酸可用于临床疾病的治疗和辅助诊断。

卡氏肺孢子虫是免疫不全并发症患者最重要的肺部病原体,随着艾滋病的流行,卡氏肺孢子虫肺炎(PCP)的发病率逐年上升,故其诊断和防治就显得尤为重要。Perez 等^[4]研究发现肺囊虫真菌依赖其宿主的 S-腺苷甲硫氨酸酶,肺囊虫具有 S-腺苷甲硫氨酸 ATP 转移酶和蛋白表达的基因编码,但缺乏 S-腺苷甲硫氨酸转移酶活性和感染性而导致卡氏肺孢子虫肺炎患者血浆 S-腺苷甲硫氨酸酶消耗。Salim 等^[5]的研究发现 S-腺苷甲硫氨酸在卡氏肺孢子虫体外培养中是一种绝对的需求,通过放射性核素发现在卡氏肺孢子虫肺炎大鼠肝脏组织中的 S-腺苷甲硫氨酸酶活性仅为正常大鼠的 0.1%。另外,感染

卡氏肺孢子虫肺炎的大鼠血清 S-腺苷甲硫氨酸含量与肺中卡氏肺孢子虫包裹的数量呈负相关。本组实验结果显示,感染卡氏肺孢子虫肺炎的大鼠肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量为(0.254 5 \pm 0.067 9) $\mu\text{mol}/\text{mg}$,正常对照组中大鼠为(0.401 4 \pm 0.087 8) $\mu\text{mol}/\text{mg}$,表明感染卡氏肺孢子虫肺炎大鼠肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶含量明显降低,这与 Salim 的研究结果相符,说明卡氏肺孢子虫在生长的过程中消耗肝脏组织中的 S-腺苷甲硫氨酸酶,这也证实了卡氏肺孢子虫肺炎是 S-腺苷甲硫氨酸营养缺陷型的说法。有学者在对艾滋合并卡氏肺孢子虫肺炎患者的研究中发现,与合并卡氏肺孢子虫感染的患者相比,恢复期患者血清中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量显著升高,S-腺苷甲硫氨酸可用于艾滋合并 PCP 疾病的一种诊断剂,血清中 S-腺苷甲硫氨酸水平可鉴定 HIV 患者是否感染卡氏肺孢子虫肺炎^[6-7]。郑玉强等^[8]在研究卡氏肺孢子虫体外无细胞培养时发现,要在培养基中加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ S-腺苷甲硫氨酸等辅助剂后卡氏肺孢子虫包裹(Pc)才能持续稳定生长,而在对尼古丁所致卡氏肺孢子虫肺炎豚鼠的研究中发现,肺组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶的含量明显降低,再次证明 Pc 的生长必需 S-腺苷甲硫氨酸的存在^[9]。综上所述,测定肝脏组织中 S-腺苷甲硫氨酸酶可用于辅助诊断卡氏肺孢子虫肺炎。

参考文献

- [1] 唐小葵,倪小毅,陈雅堂,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.
- [2] 倪小毅,陈雅堂.快速鉴定卡氏肺孢子虫[J].重庆医科大学学报,1999,24(3):283-285.
- [3] 安春丽,王本颖,魏金荣.检测卡氏肺孢子虫的快速银染法[J].中国寄生虫病防治杂志,1999,12(1):24-25.
- [4] Perez LO, Moncada C, Clarkson AB, et al. Pnenmocystis S-Adenosylmethionine transport: A potential dyug target[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 6(3):91-93.
- [5] Salim M, Diana V, Matthew F, et al. S-Adenosylmethionine and Pnenmocystis carlnii[J]. J Biol Chem, 2000, 20(275):14958-14963.
- [6] Wang P, Huang L, Davis JL, et al. A hydrophilic-interaction chromatography tandem mass spectrometry method for quantitation of serum S-Adenosylmethionine in patients infected with human immunodeficiency virus[J]. Clin Chim Acta, 2008, 396(2):86-88.
- [7] Skelly MJ, Holzman RS, Merali S, et al. S-Adenosylmethionine levels in the diagnosis of Pnenmocystis carlnii pneumonia in patients with HIV infection[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(3):467-471.
- [8] 郑玉强,叶彬,武卫华,等.卡氏肺孢子虫体外无细胞培养的建立[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(7):569-572.
- [9] Moncada CA, Clarkson A, Perezl O, et al. Mechanism and tissue specificity of nicotine-mediated lung S-Adenosylmethionine reduction[J]. J Biol Chem, 2008, 283(12):7690-7696.

(收稿日期:2011-04-28)