

文章编号:1000-7423(2007)-02-0129-05

【实验研究】

从大鼠肺灌洗液中分离纯化培养卡氏肺孢子虫

黄敏君¹, 安亦军¹, 李淑珍¹, 卢思奇^{2*}, 郭增柱^{1*}

【摘要】 目的 建立卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*, *P.c*)纯培养株。方法 从肺孢子虫肺炎(PCP)大鼠模型离体肺脏的灌洗液中分离 *P.c*, 用改良 IMDM 培养基进行体外培养; 以四胺银染色计数法观察虫体增殖情况; 用 PCR 扩增培养物中 *P.c* 线粒体大亚基 rRNA 基因, 进行基因鉴定; 用透射电镜观察培养虫体的超微结构。结果 用添加 s-腺苷甲硫氨酸(SAM)等辅助剂的 IMDM 培养基从 8 只 PCP 大鼠的肺灌洗液中分离出 5 个 *P.c* 纯培养株(*P.c* Rat1~5)。分离培养的 *P.c* 可进行冷冻保存和复苏培养。培养 72 h 的 *P.c* 包裹可增殖 19~22 倍。形态、超微结构及基因序列分析证实从大鼠肺灌洗液中分离出的培养物是大鼠源性肺孢子虫。结论 从大鼠肺灌洗液中分离培养出 5 株大鼠源卡氏肺孢子虫。

【关键词】 卡氏肺孢子虫; 培养; 分离株

中图分类号:R382.33 文献标识码:A

Continuous Axenic Cultivation of *Pneumocystis carinii* Isolated from the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Infected Rat

HUANG Min-jun¹, AN Yi-jun¹, LI Shu-zhen¹, LU Si-qi^{2*}, GUO Zeng-zhu^{1*}

(1 Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050, China; 2 Department of Parasitology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100089, China)

【Abstract】 Objective To establish axenic cultivation of *Pneumocystis carinii* (*P.c*). **Methods** The organisms of *P.c* were isolated from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) and cultured in a medium which was based on IMDM(GIBCO) supplemented with S-adenosyl-L-methionine, putrescine, N-acetyl glucosamine, putrescine, L-cysteine and L-glutamine, and newborn calf serum. The organisms cultured in the system were identified by observing the morphology of cysts in smears stained with Gomori's methenamine silver nitrate stain (GMS). Ultrastructure of the cysts/trophozoites was examined by transmission electron microscopy. The sequences of mitochondrial large ribosomal DNA subunit of the cultured organisms were compared with the *Pneumocystis carinii* f.sp. ratti variant isolate (GenBank No U20173) and *Pneumocystis carinii* f.sp.hominis (GenBank No M58605). **Results** Five isolates of *P.carinii* received from BALF of 8 rats with PCP were cultured axenically and continuously in the system. The cultured organisms could be stored in frozen condition and used to reinitiate culture, and were amplified by 19~22 times within 72 h. The morphology, ultrastructure and gene sequencing of the cultured organisms confirmed that the isolated organisms were *P.carinii*. **Conclusion** Five continuously and axenically cultured isolates of *P.carinii* have been received.

【Key words】 *Pneumocystis carinii*; Culture; Isolate

Supported by the Natural Science Foundation of Beijing, China (No.7052009)

Corresponding author, E-mail: zengzhug@sohu.com; lusiqi@cpums.edu.cn

肺孢子虫是一种机会性病原体, 由它引起的肺孢子虫肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) 是免疫功能低下人群最常见、最严重的合并症^[1]。

肺孢子虫的体外培养始于 1953 年。早年采用细

胞系培养, 如鸡胚肺上皮细胞系(CEL)、非洲绿猴肾细胞系(Vero)、人胚肺成纤维细胞系(MRC 5)、人 II 型肺泡细胞系(A549)等, 均未能实现连续培养的目标^[2]。1989 年首次报道肺孢子虫纯培养取得突破^[3], 1999 年实现了可以连续传代的肺孢子虫纯培养^[4]。国内倪小毅等^[5]曾在 8 种细胞系中培养肺孢子虫, 郑玉强等^[6]从卡氏肺孢子虫肺炎大鼠模型的肺组织中分离培养卡氏肺孢子虫。国内外肺孢子虫的培养技术虽取得

基金项目:北京市自然科学基金项目(No.7052009)

作者单位:1 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京热带医学研究所, 北京 100050; 2 首都医科大学寄生虫学教研室, 北京 100089

* 通讯作者;E-mail: zengzhug@sohu.com; lusiqi@cpums.edu.cn

了一定的进展,但所报道的培养技术复杂,各种培养方法的重复性较差,给研究工作带来诸多不便,因此仍有必要进一步研究简便可靠的肺孢子虫培养技术,以求建立长期稳定的培养体系。本文报告从肺孢子虫肺炎大鼠模型离体肺脏的灌洗液中分离纯化培养卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii* Delane, 1912, *P.c*) 的方法及结果。

材料与方法

1 实验动物

10 只 180 g 左右清洁级 Wistar 雌性大鼠购于中国医学科学院实验动物所。

2 培养基制备

Iscove改良的最低基础培养基(Iscove Dulbecco Eagle's minimum essential medium, IMDM) 购于美国GIBCO BRL公司。参照文献[4]在IMDM中添加如下抗菌素和辅助剂,制备*P.c*培养基:①抗菌素:青霉素1000 U/ml、链霉素1000 U/ml、庆大霉素400 U/ml、两性霉素B 2 μg/ml;②辅助剂:硫酸-S-腺苷-L-蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine sulfate, SAM)100 μg/ml、腐胺(putrescine, 四甲烯二胺)80 μg/ml、N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)80 μg/ml、L-半胱氨酸(L-cysteine)80 μg/ml、L-谷氨酰胺(L-glutamine)80 μg/ml;③15%新生小牛血清。用7.5%NaHCO₃调节pH至8.0,正压过滤除菌,4℃保存备用。SAM很不稳定,需保存在pH 5.0醋酸盐缓冲液中,使用时直接把SAM加入培养孔。以上抗菌素和辅助剂均为分析纯。

3 *P.c* 虫株的分离

10 只 Wistar 雌性大鼠,经腹股沟皮下注射醋酸泼尼松龙 2.5~5 mg,每周 2 次,连续 6 周。每周测体重 1 次,根据体重变化,适当调整醋酸泼尼松龙用量。饮水中加四环素 0.5 mg/ml 以预防继发性细菌感染。密切观察受试动物,满 6 周后随机抽取 2 只做病原学和病理学检查。将剩余 8 只出现消瘦、弓背耸毛、呼吸困难的病鼠断颈处死,无菌取出完整肺脏;从气管插入头皮针导管,注入无菌磷酸盐缓冲液(2.68 mmol/L KCl、1.47 mmol/L KH₂PO₄、51.1 mmol/L Na₂HPO₄、7.43 mmol/L NaH₂PO₄、62 mmol/L NaCl、0.05 mmol/L CaCl₂、0.05 mmol/L MgCl₂,含青霉素 5000U/ml、链霉素5000U/ml、庆大霉素 2000U/ml、两性霉素 B 10 μg/ml) 5 ml 至双肺膨胀,用注射器抽吸灌洗液,至少回收 3 ml 灌洗液;重复灌洗一次;将收集到的灌洗液 7 000×g 离心 10 min,用含 0.85%NH₄Cl 的无菌磷酸盐缓冲液洗涤沉

淀物 2 次;最后用培养基定量混悬,用改良六亚甲基四胺银染色法(Gomori's methenamine-silver nitrate stain, GMS)计数灌洗液中的*P.c*包囊。

4 *P.c* 虫株的培养

用 0.5%的胶原蛋白包被 24 孔培养板后,每孔加培养基 1.5 ml,接种 1.0×10⁴ 个分离出的*P.c*包囊,置 5% CO₂ 孵箱 37℃培养;每个分离株接种 4 孔;每 24 h 更换 1/3 培养液,换液时小心吸出上清,不搅动沉于孔底的虫体;用增菌培养基和真菌培养基检查更换液中是否有细菌和(或)真菌生长;换液后将每孔的培养物用吸管吹匀,吸取 10 μl 用于*P.c*包囊计数,然后给每孔添加浓度为 50 μg/ml 的 SAM 10 μl。GMS 染色进行包囊计数。以 10 d 为 1 个培养周期绘制*P.c*包囊增殖曲线。10 d 后进行传代培养。收集原代培养 10 d 的虫体保存于-196℃(液氮),2 个月后进行复苏传代培养。

5 培养物的基因鉴定

按文献方法 [7]扩增培养物线粒体大亚基 rRNA 的目的片段,引物为*P.c*线粒体大亚基 rRNA 中的 2 个片段,其碱基序列为,5'-正义引物 pAZ102-E: 5'-GAT-GGCTGTTTCCAAGCCCA-3'; 3'-反义引物 pAZ102-H: 5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3'。用 TaKaRa 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物,送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,与大鼠源肺孢子虫变异型(*Pneumocystis carinii* f.sp. ratti variant isolate, GenBank 序列号 U20173)和人源肺孢子虫(*Pneumocystis carinii* f.sp.hominis, GenBank 序列号 M58605)线粒体 rRNA 基因大亚基序列比对,进行虫种基因鉴定。

6 培养物的电镜观察

收集培养 10 d 的*P.c*标本,3 000×g 离心 10 min,迅速以 4%多聚甲醛-2.5%戊二醛固定沉淀物 2 h,换 PBS 保存,包埋后做超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,H-600 型透射电镜观察培养物的超微结构。

结 果

1 *P.c* 虫株的分离培养结果

从 8 只 PCP 大鼠的肺灌洗液标本中共分离出 5 个*P.c*虫株,分别命名为*P.c* Rat1、Rat2、Rat3、Rat4 和 Rat5,分离成功率为 62.5%。*P.c* Rat1 株原代及冷冻复苏后传代培养的包囊增殖良好。新分离的*P.c*原代培养,每孔接种 10⁴ 个包囊,24 h 平均增殖 9.3 倍,

48 h 增殖 16 倍, 72 h 增殖 19 倍, 10 d 后增殖 45.3 倍。冻存复苏后进行的传代培养, 每孔接种 1.5×10^3 个包裹; 前 48 h 之内增殖速度较慢, 24 h 平均增殖仅 3.3 倍, 48 h 增殖 8 倍; 72 h 后增殖速度得以恢复到 22 倍; 10 d 后增殖达 50 倍 (图 1)。用增菌培养基和真菌培养基未从更换液中检出细菌和真菌生长。

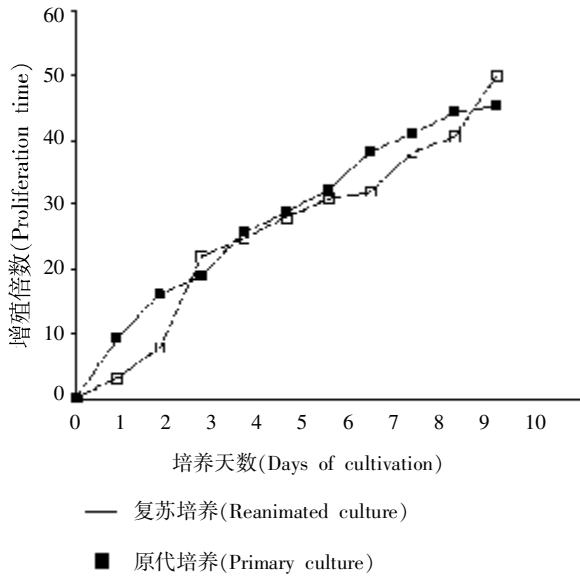
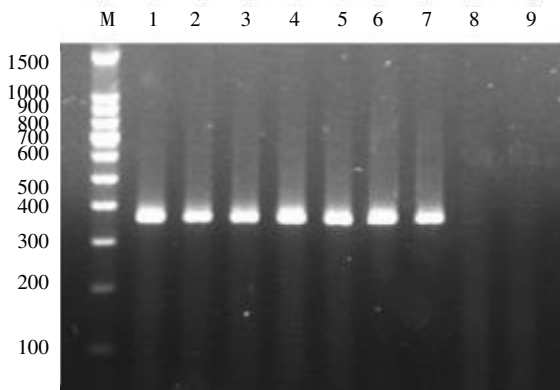


图 1 *P.c* Rat1 株原代和冷冻复苏培养时包裹的增殖情况
Fig.1 Growth curves of cysts of *P.carinii* Rat1 in primary and reanimated axenic culture

2 培养物的基因鉴定结果

从 PCP 大鼠的肺匀浆、肺灌洗液及 5 株分离培养物中均检测出长 346 bp 的 *P.c* 线粒体大亚基 rRNA 基因片段 (图 2)。



M: DNA 标志物, 1: PCP 大鼠肺匀浆标本, 2: PCP 大鼠肺灌洗液标本, 3~7: 5 株分离培养物标本 (rat1~5), 8: 空白对照, 9: 正常大鼠肺灌洗液。

M: DNA Marker, 1: Lung homogenate sample of PCP rat, 2: BALF sample of PCP rat, 3~7: Samples from 5 isolates of cultured organisms (rat1~5), 8: Negative control, 9: BALF sample of normal rat.

图 2 PCR 检测培养物中的 *P.c* 线粒体大亚基 rRNA 的电泳结果
Fig.2 Electrophoresis of mitochondrial large-subunit's rRNA of cultured *P.carinii* amplified by PCR

Rat1 和 Rat2 分离株线粒体大亚基 rRNA 序列与 GenBank 中的大鼠源肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii* f.sp. ratti variant isolate, U20173) 及人源肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii* f.sp.hominis, M58605) 相应基因序列的比对结果显示, Rat1 和 Rat2 两个分离株的同源性为 99.3%, 与 GenBank 中大鼠源肺孢子虫的同源性分别为 93.0% 和 96.5%, 与 GenBank 中人源肺孢子虫的同源性分别为 69.5% 和 72.9%; 而 GenBank 中大鼠源与人源肺孢子虫的同源性为 71.7% (图 3)。

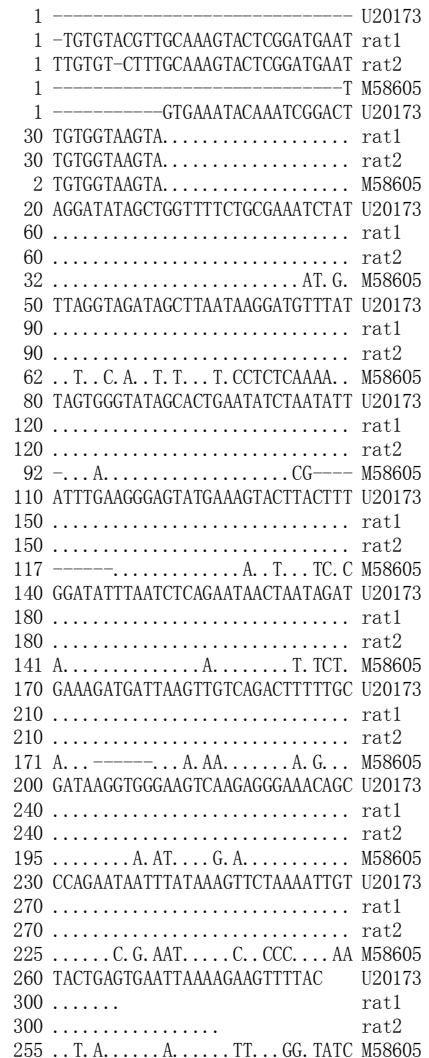


图 3 *P.c* Rat1 和 Rat2 分离株与基因库中鼠源性 (U20173) 及人源性 (M58605) 肺孢子虫线粒体大亚基 rRNA 基因比较
Fig.3 Sequence comparison of mitochondrial large-subunit's rRNA among the cultured *P.carinii* Rat1, Rat2, *Pneumocystis carinii* f.sp. ratti variant isolate (GenBank No.U20173) and *Pneumocystis carinii* f.sp.hominis (GenBank No. M58605)

3 培养物的光镜及电镜观察结果

培养物涂片经 GMS 染色后镜检可见大量黑褐色 *P.c* 包裹, 呈括弧样特征性结构; 囊内小体及滋养体不着色 (图 4)。

培养物透射电镜显示：*P.c* 滋养体 2~4 μm，形态多样，细胞膜单层，胞质内有线粒体、内质网、高密度颗粒、细胞核（有核膜）(图 5-A)。*P.c* 包囊 3~6 μm，圆形或椭圆形，双层细胞膜，未成熟包囊含多个核，成熟包囊有 4~8 个囊内小体 (图 5-B)。

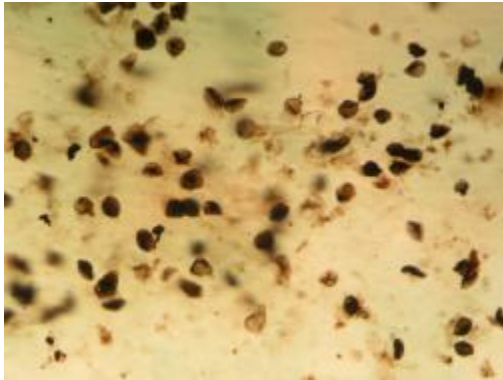
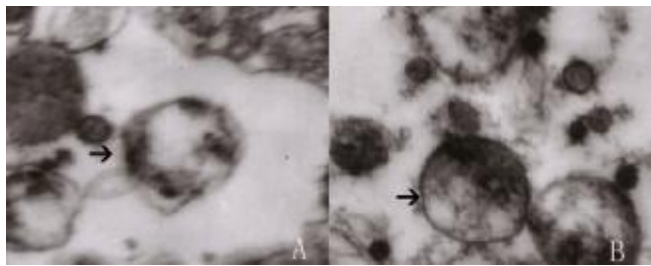


图 4 培养物的光镜观察结果 (GMS, ×1000)
Fig.4 GMS-stained smears of cultured *P.carinii* (GMS, ×1000)



A: 滋养体 Trophozoite, B 包囊 Cyst

图 5 培养物的电镜观察结果(×15000)
Fig.5 Transmission electron micrographs of cultured *P.carinii*(×15000)

讨 论

肺孢子虫的纯培养对肺孢子虫肺炎病原学、免疫学、药物筛选等研究具有重要意义，但由于以下原因肺孢子虫的纯培养研究进展非常缓慢：①肺孢子虫的自然宿主细胞为肺泡 I 型上皮细胞，在目前实验室条件下很难建立稳定的 I 型上皮细胞系。许多研究者筛选多种细胞系以代替 I 型上皮细胞作肺孢子虫的支持细胞，但并未实现连续培养的目标^[2]。②与 *P.c* 细胞系培养相比，无细胞培养对培养基的要求更高。肺孢子虫对两性霉素 B 等抗真菌药物耐药，原被认为是原虫；分析其基因及表达产物后，又被认为是真菌，但其细胞膜富含胆固醇而非普遍存在于真菌细胞膜的麦角固醇。众多研究者用传统分离培养细菌、真菌和寄生虫的多种培养基尝试培养肺孢子虫，均未成功。③肺孢子虫可能存在某些代谢缺陷，如文献报道肺孢

子虫为 SAM 营养缺陷型，自身不能合成所需的 SAM，其生长必须从外界摄取^[8]。④肺孢子虫不能贴壁生长，缺少简便实用的计数方法，给培养工作带来困难。始于 1953 年的肺孢子虫体外培养，直到 1999 年 Merali 等报道了一种可连续传代的 *P.c* 纯培养方法才有所突破^[4]。他们选用一种 GIBCO 公司生产的带 Earle 盐溶液的最低必需培养基 (IMDM)，添加硫酸-S-腺苷-L-蛋氨酸(SAM)、对氨基苯甲酸、腐胺(四甲烯二胺)、焦磷酸铁、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、N-乙酰葡萄糖胺等 7 种辅助剂，然后从 PCP 大鼠肺匀浆中分离 *P.c*，在带有转孔插入器的胶原膜多孔板中进行培养，用测定培养物 *P.c* 总 DNA 水平和 ATP 水平来评价 *P.c* 的增殖情况，获得了较为稳定的传代培养。Merali 等^[8] 采用的培养板价格昂贵，其优点是可以频繁更换培养基而不搅动肺孢子虫。

Merali 在 IMDM 基础培养基中添加了 7 种辅助剂用于培养 *P.c*。本文参照其方法在 IMDM 基础培养基中仅添加了其中的 5 种辅助剂，未添加对氨基苯甲酸和焦磷酸铁。预试验结果证实，这种基础培养基能支持 *P.c* 的增殖，这可能与 IMDM 中增加了各种维生素的含量及铯离子、转铁蛋白、羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 等有利于细胞生长的营养素有关。预试验结果也证实，SAM 对 *P.c* 的生长非常重要，不按时添加 SAM，*P.c* 就会停止增殖。本文从 PCP 大鼠的肺灌洗液中分离 *P.c*，在胶原蛋白包被的普通 24 孔培养板上培养，采用 GMS 包囊染色法计数绘制 *P.c* 的增殖曲线，比 Merali 的方法更简便实用，更适用于从临床 PCP 患者支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中分离培养人源肺孢子虫。

肺孢子虫虫种的分类标准尚未确定，习惯上采用三名制命名，即在 *Pneumocystis carinii* 之后加上宿主名称 (special form, f.sp) 来表示不同的肺孢子虫，如大鼠源肺孢子虫原型 (*Pneumocystis carinii* f.sp. *carinii*)、人源肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*) 等。但目前有越来越多的遗传学及动物实验资料显示，导致人类 PCP 的是一种新遗传型微生物，和其他动物源肺孢子虫存在明显差异，故有人建议将其定为独立种，由三名制改为二名制，命名为耶氏肺孢子虫^[9]。本文从 8 只 PCP 大鼠中共分离培养出 5 株大鼠源肺孢子虫，已冻存复苏及传代培养 8 个月，基因鉴定结果表明，所分离的虫株与大鼠源肺孢子虫变异型 (*Pneumocysti carinii* f.sp. *ratti* variant isolate) 有高度同源性，与人源肺孢子虫有较大差异。这些肺孢子虫纯培养株的建立有望促进肺孢子虫生物学、超微结构、分子生物学、抗原制备等方面的研究。

查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22: 305.)

[2] Meng YC, Li CP, Liang GG. Tick, Mite and Human Diseases [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1995. 261-279. (in Chinese)
(孟阳春, 李朝品, 梁国光主编. 蜱螨与人类疾病[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1995. 261-279.)

[3] Chen XB, Wu GL, Sun X, et al. Contemporary Parasitic Disease [M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2002. 895-902. (in Chinese)
(陈兴保, 吴观陵, 孙新, 等. 现代寄生虫病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 895-902.)

[4] Tian Y, Li CP. Pathogenicity of demodex infestation in human facial skin and treatment[J]. J Dis Control, 2004, 8: 355-357. (in Chinese)
(田晔, 李朝品. 人面部蠕形螨感染致病及其防治[J]. 疾病控制杂志, 2004, 8: 355-357.)

[5] Zomorodian K, Geramishoar M, Saadat F, et al. Facial demodicidosis[J]. Eur J Dermatol, 2004, 14: 121-122.

[6] Baima B, Sticherling M. Demodicidosis revisited[J]. Acta Derm Venereol, 2002, 82(1): 3-5.

[7] Yuan FS, Guo SL, Yu AK, et al. Experimental study on screening of Chinese traditional medicines with activities against human demodex[J]. Chin J Parasitic Dis Control, 1993, 6: 238-239. (in Chinese)
(袁方曙, 郭淑玲, 于安珂, 等. 杀人体蠕形螨中药筛选试验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6: 238-239.)

[8] Liang YF, Li H. Screening of Chinese traditional medicines with activities against human demodex[J]. Guangxi J Traditional Chin Med, 1999, 22(2): 40-41. (in Chinese)
(梁裕芬, 李辉. 杀灭人体蠕形螨的中药筛选[J]. 广西中医药, 1999, 22(2): 40-41.)

[9] Wu YL, Pu HS. Advances in pharmacological study on *Herba taraxaci*[J]. Lishizhen Med Materia Medica Res, 2004, 15: 519-520. (in Chinese)
(吴艳玲, 朴惠善. 蒲公英的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15: 519-520.)

[10] Zang WM, Wu GR, Ma SH, et al. Study on the skin protection function of *Taraxacum mongolicum*[J]. Chin Wild Plant Resour, 2001(3): 15-17. (in Chinese)
(张卫明, 吴国荣, 马世宏, 等. 蒲公英护肤作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2001(3): 15-17.)

[11] Yuan FS, Guo SL, Han YM, et al. Curative effect of the cream made from the volatile oil of Chinese prickly ash on demodicidosis[J]. Chin J Parasitic Dis Control, 2003, 16: 58-60. (in Chinese)
(袁方曙, 郭淑玲, 韩玉敏, 等. 花椒挥发油乳霜剂治疗蠕形螨病疗效观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16: 58-60.)

[12] Huang XQ. Treatment of dermatitis associated with demodex with *Radix stemonae*[J]. J Med Theory & Pract, 2002, 15: 396-396. (in Chinese)
(黄秀琼. 百部治疗蠕形螨性皮炎[J]. 医学理论与实践, 2002, 15(4): 396-396.)

[13] Cui CQ, Shen CH, Zheng SZ, et al. Study on miticidal effect of compound stamona ointment on *Demodex folliculorum in vitro* [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2004, 11: 352-352. (in Chinese)
(崔方权, 申成华, 郑善子, 等. 复方百部霜对毛囊蠕形螨的体外杀虫作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11: 352-352.)

[14] Hou YW, Su Y. Study on safety of cosmetic[J]. Chin J Pub Hlth Manag, 2002, 18: 412-413. (in Chinese)
(侯延文, 苏怡. 对化妆品安全性评价的探讨[J]. 中国公共卫生管理, 2002, 18: 412-413.)

[15] Lin C, Chen ZM. Application of acute skin irritation test on safety evaluation of cosmetic[J]. J Health Toxicol, 1999, 13(1): 60-61. (林仲, 陈明中. 急性皮肤刺激试验在化妆品安全性评价中的应用[J]. 卫生毒理学杂志, 1999, 13(1): 60-61.)

[16] Yu S. Skin Cosmetic Medicine[M]. Beijing: China Medical Science Technology Press, 1997: 78-81. (in Chinese)
(于淤. 皮肤医学美容学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997. 78-81.)

(收稿日期:2006-08-28 编辑:高石)

(上接第 132 页)

致谢 本文得到北京天坛医院电镜室孙异临主任协助, 谨表谢意。

参 考 文 献

[1] Iikuni N, Kitahama M, Ohta S, et al. Evaluation of pneumocystis pneumonia infection risk factors in patients with connective tissue disease[J]. Mod Rheumatol, 2006, 16: 282-288.

[2] Dei-Cas E, Cailliez JC. *In vitro* systems in *Pneumocystis* research. Parasitol Today, 1996, 12: 245-249.

[3] Cushion MT, Ebbets D. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28: 1385-1394.

[4] Merali S, Frevert U, Williams JH, et al. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 2402-2407.

[5] Ni XY, Chen YT. A comparative study on the growth of *Pneumocystis carinii* in 8 cell lines[J]. Chin J Infect Dis, 2002, 120: 233-236. (in Chinese)
(倪小毅, 陈雅棠. 肺孢子虫在八种细胞系上的增殖情况[J]. 中华传染病杂志, 2002, 20: 233-236.)

[6] Zheng YQ, Ye B, Wu WH, et al. Establishment of an axenic culture system for *Pneumocystis carinii*[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20: 569-571. (in Chinese)
(郑玉强, 叶彬, 武卫华, 等. 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: 569-571.)

[7] Wang JC, An YJ, Guo ZZ. The value of PCR for diagnosing PCP under different burden of *Pneumocystis carinii* in rat models [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2003, 16: 155-157. (in Chinese)
(王建成, 安亦军, 郭增柱. 用 PCR 诊断不同虫荷量的大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的价值[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16: 155-157.)

[8] Merali S, Vargas D, Franklin M, et al. S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 14958-14963.

[9] Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jereveci*) for *Pneumocystis* from humans[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8: 891-896.

(收稿日期:2006-07-12 编辑:高石)