

· 论 著 ·

肺隐球菌病超微结构观察

张 纓¹, 李祥周¹, 乐美兆¹, 姜少军², 周晓军²

[摘要] 目的 观察肺隐球菌病的超微结构特征。方法 对 17 例肺隐球菌病患者的病变组织进行光镜和透射电镜观察。结果 光镜下, 见非干酪性肉芽肿形成, 多核巨细胞和巨噬细胞胞质内及间质中可见薄壁圆形或卵圆形空泡状小体, 黏液卡红和 PAS 染色呈阳性。透射电镜下, 隐球菌无菌丝, 单细胞芽生, 孢子无子囊, 有荚膜形成, 荚膜与细胞壁之间有明显透明带, 结构较简单, 细胞器不发达。结论 肺隐球菌病是由新型隐球菌感染引起的一种非常少见的肺部真菌病, 其临床及影像学表现缺乏特异性, 超微结构形态学特征可反映其独有的生物学特点, 具有协助临床诊断的意义。

[关键词] 肺疾病; 隐球菌病; 超微结构

中图分类号: R563; R519.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)01-0024-03

Ultrastructural observation of pulmonary cryptococcosis

ZHANG Ying¹, LI Xiang-zhou¹, LE Mei-zhao¹, JIANG Shao-jun², ZHOU Xiao-jun². 1. Department of Pathology, 81 Hospital of PLA; 2. Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] Objective To study the ultrastructural characteristics of pulmonary cryptococcosis (PC). Methods Tissues obtained from 17 patients with PC were observed by light microscope and electron microscope. Results Microscopically, the cryptococcosis granuloma formation was observed. Vacuolar cryptococcus spore could be seen in plasma of multinuclear giant cell, macrophage and mesenchyma, which stained in red color with PAS and mucicarmine. Electron microscopy revealed that most of cryptococcus neoformans (CN) had a simple structure with a few organelles. The capsule was seen in all organisms. Gemmation of CN could be observed. Conclusion PC is an infrequent fungal disease in lung. The clinical manifestation and imaging of PC are nonspecific. It can be differentiated from other diseases based on histopathological features and ultrastructural observation.

[Key words] lung disease; cryptococcosis; ultrastructure

肺隐球菌病 (pulmonary cryptococcosis, PC) 是由新型隐球菌 (cryptococcus neoformans, CN) 感染引起的一种非常少见的肺部真菌病, 由于其临床表现和影像学缺乏特异性, 在 HE 染色的切片上隐球菌孢子常着色不佳难以识别, 极易漏诊或误诊。本文应用光镜和电镜观察 17 例肺隐球菌病的组织结构和超微结构病变特征, 为其临床病理诊断提供形态学依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 1980 年至 2008 年, 我院经病理检查确诊肺隐球菌病 17 例, 8 例为肺穿刺活检组织, 5

例为手术切除标本, 2 例为胸腔镜肺活检组织, 1 例为纤支镜活检组织, 1 例为胸椎穿刺活检组织。17 例中男 12 例, 女 5 例, 男女比例为 2.4:1。患者发病年龄为 5~67 岁, 平均 40.2 岁。3 例临床无症状, 体检时发现肺内病灶; 余 14 例均因自觉不适就诊, 临床症状主要表现为咳嗽, 咳痰, 痰血, 发热, 胸痛, 头痛等, 少部分人亦伴有气促, 盗汗, 恶心呕吐, 食欲不振, X 线及 CT 示肺内异常影。影像学检查示肺部孤立性病灶 5 例, 肺部多发性结节 8 例, 两肺弥漫性病变 4 例, 病灶边缘欠清, 部分可见毛刺或空洞。5 例有慢性病史, 1 例有与饲养鸽环境接触史。入院初诊仅有 1 例考虑为播散性肺隐球菌病, 余均误诊为肺癌、肺结核、肺脓肿或其他类型肺炎。3 例并发隐球菌性脑膜炎, 其中 1 例合并败血症。

1.2 方法

1.2.1 光镜样品制备 送检标本经 10% 中性福尔

作者简介: 张 纓 (1971-), 女, 湖南冷水江人, 硕士, 副主任医师, 从事肿瘤病理专业研究

作者单位: 1. 210002 江苏南京, 解放军 81 医院病理科; 2. 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院病理科

马林固定,石蜡包埋,常规切片 $4\mu\text{m}$,HE 染色,同时进行过碘酸雪夫(PAS)染色,光镜观察。

1.2.2 透射电镜样品制备 17 例常规石蜡包埋组织,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱洗二甲苯,水化后经 2.5% 戊二醛固定,1% 锇酸后固定,梯度乙醇及丙酮脱水,Epon-812 树脂包埋,半薄切片定位后 LKB-V 超薄切片机超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅双重电子染色,JEM1200 型透射电镜下观察摄片。

2 结果

2.1 肉眼观察 5 例手术切除标本,病灶大小不等,形状不规则,边界欠清,无包膜,切面灰白色或淡红色半透明。实性病灶质地较韧,胶样病灶似黏液瘤样外观,伴囊性变,病灶邻近胸膜处增厚粘连;余 12 例均为活检的微小组织块。

2.2 光镜结果 组织病理反应主要为胶质性和肉芽肿性病变两种。胶质性病变中可见大量隐球菌,还可见其被纤维组织包裹而形成的囊肿;肉芽肿性病变主要由组织细胞、淋巴细胞、成纤维细胞及巨噬细胞组成,病变中隐球菌较少,病灶内中性粒细胞较少,周围组织充血、水肿等炎症反应轻微,出血、坏死及钙化少见。在多核巨细胞和巨噬细胞胞质内及间质中隐约可见圆形或卵圆形呈空泡状的隐球菌,HE 染色呈无色或淡粉红色,大小不一,其周围有 $3\sim 5\mu\text{m}$ 的空隙,为未着色之菌体荚膜,具有折光性。黏液卡红染色荚膜和细胞壁呈红色;PAS 染色菌体和细胞壁呈红色。

2.3 电镜结果 由于组织经福尔马林液固定后再做电镜检查,所以组织固定欠佳。病灶内主要细胞为巨噬细胞和多核巨细胞,细胞形状不规则,体积巨大有突起,细胞质内有发达的线粒体、内质网和溶酶体等细胞器,部分细胞胞质内可见一至多个隐球菌孢子,部分孢子游离于细胞外(图 1、图 2)。隐球菌无菌丝,单细胞芽生,孢子无子囊,有宽厚的荚膜,一般比菌体大 $1\sim 3$ 倍,中等电子密度,外周有疏电子密度微纤维,呈放射状盘绕,荚膜与菌体之间有明显透明带。大部分隐球菌结构较简单,细胞器不发达,偶可见内质网、线粒体、高尔基体、糖原和空泡等细胞器。胞体内有卵形核,为单核、有双层核膜和清楚的核膜孔,染色质淡而均匀(图 3、图 4)。部分细胞发生退变,除隐约可见荚膜和菌体外,细胞器缺如,核消失,在寄生的宿主细胞内常常留下低电子密度腔隙(隐球菌噬斑)。此外,部分病例中还可见到正处于孢子生芽繁殖的菌体(图 5、图 6)。

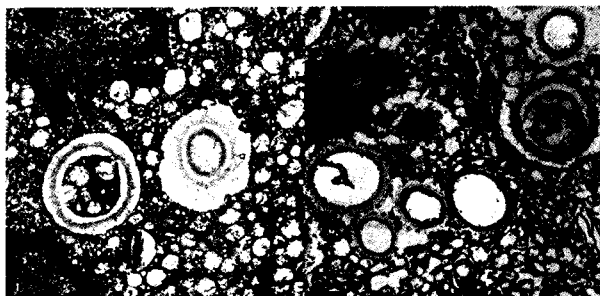


图 1、图 2 多核巨细胞核呈不规则形,核仁明显,胞质内可见大小不等的隐球菌孢子(Bar = $1\mu\text{m}$)

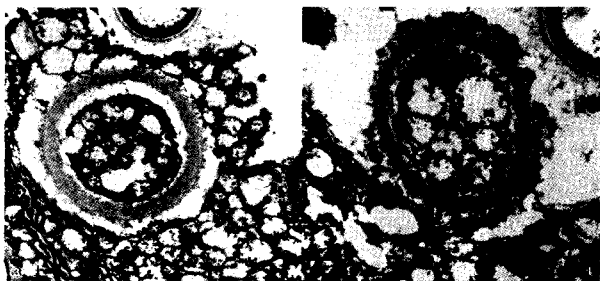


图 3、图 4 巨噬细胞胞质中可见隐球菌孢子,有宽厚的荚膜及少量细胞器(Bar = $0.5\mu\text{m}$)



图 5、图 6 可见处于生芽繁殖的菌体(Bar = $1\mu\text{m}$)

2.4 随访资料 17 例患者随访 15 例,12 例临床治愈后无复发,3 例并发隐球菌性脑膜炎,其中 2 例症状好转,1 例合并败血症治疗无效死亡,2 例未治失访。

3 讨论

肺隐球菌病于 1924 年由 sheppe 首先报道,在我国已将其与病毒性肝炎等同列为乙类传染性疾病^[1]。主要侵犯肺脏,也可累及中枢神经系统、皮肤、黏膜、骨骼及肝脏等组织。隐球菌属于无菌丝的单细胞芽生的酵母型真菌,孢子无子囊。包括 17 个种和 7 个变种,其中仅新型隐球菌及其变种有致病性。CN 系环境腐生菌,广泛存在于土壤和鸽粪中,直径一般为 $5\sim 10\mu\text{m}$,少数为 $3\sim 20\mu\text{m}$ 。菌体为宽厚透明的荚膜所包裹,荚膜可比菌体大 $1\sim 3$ 倍。它对中枢神经系统的亲和力较高,易播散侵犯脑部,一旦合并隐球菌性脑膜炎,病死率可达 $20\%\sim$

30%^[2-3]。肺隐球菌病的发病率不高,且好发于细胞免疫功能低下患者,如艾滋病、恶性肿瘤、糖尿病、大剂量使用糖皮质激素、器官移植等患者^[4]。近年来,由于免疫缺陷患者的增多及对该病认识的提高,病例报道有所增加,但临床诊断仍很困难。

光镜下病变类型与患者的免疫状态以及病程有关,早期或者免疫力低下者常形成胶质性病变,晚期或者免疫力正常者常形成非干酪性肉芽肿性病变^[5-6]。病理改变程度和分布范围,与机体的反应性及菌量有相当密切的关系,且呈现出临床症状和体征的显著差异性。诊断本病的主要依据是在病变组织中查见圆形或卵圆形的隐球菌孢子。隐球菌孢子在 HE 染色标本中无色或稍呈红色,不易观察和确认,经验不足往往漏诊或误诊。PAS、Alcain blue、黏液卡红等特殊染色可使菌体形态更清晰,但所有的真菌孢子这些方法都可以呈阳性反应,并且干性隐球菌在特殊染色中常着色不佳,因此不能单独作用于隐球菌与其他真菌孢子和霉菌的鉴别。

电镜下,隐球菌有明确的超微结构特点,菌体呈圆形或卵圆形,单细胞,无菌丝,孢子无子囊,生芽繁殖,可见清晰的荚膜及细胞壁。荚膜中等电子密度,外周有疏电子密度微纤维,呈放射状盘绕,荚膜与菌体之间有明显透明带。胞体内有卵形核,线粒体稀少、呈条索状,可见双层膜的内质网、糖原颗粒和大小不等的空泡,结构较简单,可见处于生芽繁殖的菌体及隐球菌噬斑。电镜下具有独特的超微病理形态学特征,可反映其独有的生物学特点,能准确的与其他真菌孢子和霉菌鉴别,具有重要的辅助石蜡切片

诊断的价值。

隐球菌病的治疗需根据免疫功能的不同而区别对待。对于免疫功能正常者,内科保守治疗预后一般较好^[7-8]。对于难治性孤立性结节患者,可实施手术治疗,但有引发隐球菌性脑膜炎的倾向。尤其是免疫功能异常者,必须在术前术后给予 2 周以上的系统抗真菌药物治疗,以尽可能防止隐球菌播散引发败血症而导致死亡。

【参考文献】

- [1] 易祥华,孔洁,朱美芳,等. 原发性肺隐球菌病的病理诊断和超微结构观察[J]. 中华病理学杂志,2004,33(5):424-428.
- [2] Shibuya K, Hirata A, Omuta J, et al. Granuloma and cryptococcosis [J]. J Infect Chemother, 2005, 11(3):115-122.
- [3] Lortholary O, Nunez H, Brauner MW, et al. Pulmonary cryptococcosis [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2004, 25(2):145-157.
- [4] Yang CJ, Hwang JJ, Wang T H, et al. Clinical and radiographic presentations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients [J]. Scand J Infect Dis, 2006, 38(9):788-793.
- [5] Hung MS, Tsai YH, Lee CH, et al. Pulmonary cryptococcosis: Clinical, radiographical and serological markers of dissemination [J]. Respirology, 2008, 13(2):247-251.
- [6] 张 纓,宗晓福,李祥周,等. 肺隐球菌病 17 例临床病理分析 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(5):485-488.
- [7] Shirley R, Baddley JW. Cryptococcal lung disease [J]. Curr Opin Pulm Med, 2009, 15(3):254-260.
- [8] Chu HQ, Li HP, He GJ, et al. Analysis of 23 cases of pulmonary cryptococcosis [J]. Chin Med J, 2004, 117(9):1425-1427.

(收稿日期:2009-10-23;修回日期:2009-11-26)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

· 简 讯 ·

《东南国防医药》年度审读会在宁召开

2010 年 1 月 6 日,本刊年度审读会在宁召开,会议对本刊 2009 年发表的部分文章进行了重点审读,对编辑排版方面存在的问题和不足提出了意见及建议,并围绕如何进一步提高本刊质量水平进行了认真研讨。来自军地医学期刊编辑部的负责人和有关专家参加了会议,本刊的主管单位——南京军区联勤部卫生部有关领导也到会并讲话。

(叶华珍 供稿)