

# 肺孢子虫肺炎大鼠支气管肺泡灌洗液酶含量变化及大蒜素治疗对其影响

卢致民<sup>1</sup>, 张有成<sup>2</sup>, 张进顺<sup>1\*</sup>, 史宝林<sup>3</sup>, 贾天军<sup>3</sup>, 唐红炜<sup>1</sup>, 刘金花<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 研究卡氏肺孢子虫肺炎(PCP)大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)酶含量变化以及大蒜素治疗对其影响。方法 用地塞米松连续肌肉注射 Wistar 大鼠, 诱导建立 PCP 大鼠模型。诱导第 3、6、9 周分别于后腿肌肉深部注射大蒜素治疗(10 mg/kg, 1 次/d, 连续 5 d)。同时设甲氧苄氨嘧啶(TMP)-磺胺甲基异噁唑(SMZ)治疗对照组(SMZ/TMP 组)、PCP 模型对照组和空白对照组。于最后 1 次治疗 3 d 后处死大鼠, 无菌收集 BALF, 测定谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、胆碱酯酶(CHE)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)及其同工酶(CKMB)、 $\alpha$ -羟丁酸脱氢酶(HBDH)、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶(AFU)、5'-核苷酸酶(5'NT)及腺苷脱氨酶(ADA)含量。结果 PCP 模型组 ALP 含量[(573.41 ± 350.63) U/L]显著高于空白对照组[(210.56 ± 114.41) U/L]( $q=4.682, P<0.01$ )、大蒜素治疗组[(392.07 ± 217.57) U/L]( $q=3.851, P<0.05$ )以及 SMZ/TMP 组[(325.21 ± 180.65) U/L]( $q=4.380, P<0.01$ )。CK、CKMB 及 5'NT 含量, PCP 模型对照组[依次为 948.94 ± 403.43、489.47 ± 254.46 及 (6.76 ± 3.11) U/L]显著高于空白对照组[426.22 ± 319.00、213.33 ± 144.54 及 (3.22 ± 1.20) U/L]( $q=4.696, 3.784, 3.812, P<0.05$ )。AST、ALT、CHE、LDH、HBDH、AFU 及 ADA 含量, 4 组之间差异均无统计学意义( $F=1.852, 0.958, 2.470, 1.423, 1.178, 1.342, 0.611, P>0.05$ )。结论 PCP 大鼠 BALF 中 ALP、CK、CKMB 及 5'NT 含量显著升高, 大蒜素治疗可使 ALP 含量显著降低。

**【关键词】** 肺孢子虫肺炎; 支气管肺泡灌洗液; 酶; 大鼠

中图分类号: R531.5 文献标识码: A

## Enzyme Change in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Pneumocystis Pneumonia Rats and the Effect of Garlicin Treatment

LU Zhi-min<sup>1</sup>, ZHANG You-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Jin-shun<sup>1\*</sup>, SHI Bao-lin<sup>3</sup>,  
JIA Tian-jun<sup>3</sup>, TANG Hong-wei<sup>1</sup>, LIU Jin-hua<sup>1</sup>

(1 Department of Parasitology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2 Department of Clinical Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3 Faculty of Laboratory Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**【Abstract】 Objective** To study the change of enzymes and effect of garlicin treatment on the change in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP). **Methods** Wistar rats were injected intramuscularly continually with dexamethasone to establish the rat model of PCP. The experimental rats (group A) were injected intramuscularly with garlicin at a dose of 10 mg/(kg·d) for 5 days in the 3rd, 6th and 9th week respectively, and SMZ/TMP therapy group (B), PCP infected group (C) and normal group (D) were established as controls. Three days after the last treatment, the rats of all groups were killed and BALF was collected without contamination and enzymes AST, ALF, CHE, ALP, LDH, CK, CKMB, HBDH, AFU, 5'NT, ADA were examined. **Results** The ALP level in group C [(573.41 ± 350.63)U/L] was significantly higher than that in group D [(210.56 ± 114.41)U/L] ( $q=4.682, P<0.01$ ), group A [(392.07 ± 217.57)U/L] ( $q=3.851, P<0.05$ ), and group B [(325.21 ± 180.65)U/L] ( $q=4.380, P<0.01$ ); the level of CK, CKMB and 5'NT in group C [948.94 ± 403.43, 489.47 ± 254.46 and (6.76 ± 3.11)U/L respectively] was higher than those in group D [426.22 ± 319.00, 213.33 ± 144.54 and (3.22 ± 1.20)U/L] ( $q=4.696, 3.784, 3.812, P<0.05$ ); there was no significant difference in the level of AST, ALT, CHE, LDH, HBDH, AFU and ADA among the four groups( $F=1.852, 0.958, 2.470, 1.423, 1.178, 1.342, 0.611, P>0.05$ ). **Conclusions** The level of ALP, CK, CKMB

基金项目: 河北省卫生厅资助项目(No. 05094)

作者单位: 1 河北北方学院寄生虫学教研室, 张家口 075000; 2 河北北方学院附属第一医院检验科, 张家口 075000; 3 河北北方学院检验系, 张家口 075000

\* 通讯作者, E-mail: wdzjs@yahoo.com.cn

and 5'NT increases evidently in BALF of PCP infected rats, but the ALP level decreases distinctly after the garlicin treatment.

**[Key words]** *Pneumocystis carinii* pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Enzyme; Rat

Supported by the Health Department of Hebei Province (No. 05094)

\* Corresponding author, E-mail: wdzjs@yahoo.com.cn

卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*, Pc)是一种机会性致病病原体,感染肺孢子虫后可引起肺孢子虫肺炎(*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP)。PCP已成为免疫功能低下患者[如:艾滋病(AIDS)、化疗及放疗后的肿瘤患者、器官移植术后长期服用免疫抑制剂者]重要并发症和主要致死病因之一。目前,主要采用甲氧苄氨嘧啶(TMP)/磺胺甲基异噁唑(SMZ)和戊烷咪等治疗,但用药时间长、毒副作用大、停药后易复发。因此,寻找高效、低毒和廉价的抗 PCP 新药成为重要研究课题。

大蒜素是百合科多年生宿根草本植物大蒜提取物,主要有效成分为三硫二丙烯(Trisulfide di-2-propnyl)。卢致民等<sup>[1]</sup>用大蒜素治疗 PCP 大鼠,结果显示大蒜素可减少 PCP 大鼠肺组织 Pc 包囊数,减轻肺部炎症。本研究检测 PCP 大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)酶含量变化以及大蒜素治疗对酶含量的影响,为进一步阐明大蒜素治疗作用机制及临床诊断 PCP 提供参考资料。

## 材料与方法

### 1 实验动物

正常雌性 Wistar 大鼠 70 只,清洁级,体重 183~256 g,购于中国科学院遗传与发育生物研究所动物中心。实验前,饲养大鼠用具均经高压消毒,鼠笼经 2%过氧乙酸消毒。分笼饲养,每笼 5 只。普通商品饲料喂饲,饮水量不限。

### 2 药物、试剂及仪器

地塞米松磷酸钠注射液(批号: 040402)为海南制药厂有限公司生产,大蒜素注射液(批号: 031001)为上海禾丰制药有限公司生产,磺胺甲基异噁唑(SMZ)/甲氧苄氨嘧啶(TMP)(批号: 040203)为石家庄市华新制药厂生产,四环素(批号: 030906)为张家口云峰制药厂生产。酶测定试剂盒(批号: 04092537)为日本第一化学药品株式会社生产,全自动生化分析仪(型号: Aeroset-2000)为美国 Abbott(雅培)公司生产。

### 3 分组与建立模型

70 只大鼠随机分为 4 组。A 组为大蒜素治疗组, B

组为 SMZ/TMP 治疗对照组, C 组为 PCP 模型对照组, 3 组各 18 只, D 组 16 只为空白对照组。A、B、C 3 组按文献[2]方法建立 PCP 模型,肌肉注射地塞米松每次 1 mg/只,每周 2 次,间隔 2 或 3 d,共 9 周,饮水中加入 1 g/L 四环素预防继发性细菌感染。D 组肌肉注射等量灭菌生理盐水,其他条件同前 3 组。

### 4 治疗

A、B 两组于模型诱导第 3、6、9 周分别给予大蒜素或 SMZ/TMP。A 组后腿肌肉深部注射大蒜素,剂量为 10 mg/kg,1 次/d,连续 5 d。B 组给予 SMZ/TMP 灌胃,剂量为 SMZ 250 mg/(kg·d)及 TMP 50 mg/(kg·d),分 2 次给药,连续 5 d。C、D 两组不给任何药物。

### 5 BALF 标本收集

于末次治疗 3 d 后,各组大鼠用乙醚麻醉,四肢固定于特制木板上。用新洁尔灭(批号 0511031,德州瑞泰洗涤消毒制品有限公司生产)消毒颈、胸部。置于超净工作台,无菌条件下暴露气管,结扎左主支气管,右主支气管插入导管并固定。用一次性注射器将 5 ml 无菌生理盐水灌入肺内,抽吸 3 次,收集 BALF,663×g 离心 15 min,分离上清液,保存于 4℃冰箱,24 h 内测定酶含量。取 BALF 沉渣 2 滴,制作约 1 cm<sup>2</sup>涂片 2 张, Giemsa 染色后油镜观察肺孢子虫包囊。

### 6 BALF 酶含量测定

用购置的试剂盒在全自动生化分析仪上采用速率法<sup>[3]</sup>测定 BALF 中的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、胆碱酯酶(CHE)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)及其同工酶(CKMB)、α-羟丁酸脱氢酶(HBDH)、α-L-岩藻糖苷酶(AFU)、5'-核苷酸酶(5'NT)及腺苷脱氨酶(ADA)含量。每次测定前,先检测质控物,确保仪器在质控状态。

### 7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行数据分析,测定结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验。

## 结 果

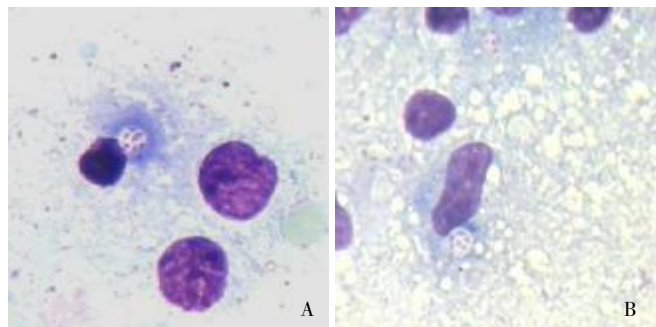
### 1 BALF 病原学检查

油镜观察 A、B、C 等 3 组大鼠 BALF 涂片 Pc 包囊数, A 组每 100 个油镜视野(29.65 ± 17.55)个, B 组(26.12 ± 19.19)个, C 组(87.30 ± 24.18)个, C 组显著高于 A 及 B 组,差异均有统计学意义( $F_A=4.912, P<0.01; F_B=5.087, P<0.01$ )。Pc 包囊呈圆形或椭圆形,囊壁较薄,不着色。成熟的 Pc 包囊含 8 个囊内小体,每个囊内小体有一紫红色细胞核,大多沿囊壁排成一圈,也有的散在排列(图 1)。D 组未见 Pc 包囊。

### 2 BALF 酶含量

结果见表 1、表 2。C 组(PCP 模型)ALP 含量显著高于 D 组(空白对照组)( $q=4.682, P<0.01$ )、A 组(大蒜素治疗组)( $q=3.851, P<0.05$ )及 B 组(SMZ/TMP 治疗组)( $q=4.380, P<0.01$ ), 差异均有统计学意义( $F=$

4.892,  $P<0.01$ )。CK、CKMB 及 5'NT 含量, C 组显著高于 D 组( $q=4.696, 3.784, 3.812, P<0.05$ )。AST、ALT、CHE、LDH、HBDH、AFU 及 ADA 含量, 4 组之间差异均无统计学意义( $F=1.852, 0.958, 2.470, 1.423, 1.178, 1.342, 0.611, P>0.05$ )。



A: 大蒜素治疗组, B: PCP 模型组。  
A: Garlicin-treated group, B: PCP infected control group.

图 1 大鼠 BALF 中 Pc 包囊 (×1 000)

Fig. 1 Cysts of *Pneumocystis carinii* in BALF of rats (×1 000)

表 1 BALF 酶含量 ( $\bar{x}\pm s$ ) (U/L)  
Table 1 Enzyme level in bronchoalveolar lavage fluid ( $\bar{x}\pm s$ ) (U/L)

组别 Group	大鼠数 No.rats	谷草转氨酶 AST	谷丙转氨酶 ALT	胆碱脂酶 CHE	碱性磷酸酶 ALP	乳酸脱氢酶 LDH	肌酸激酶 CK
A	14	65.36 ± 45.07	43.86 ± 48.74	5.40 ± 5.32	392.07 ± 217.57 <sup>a</sup>	355.14 ± 306.51	450.14 ± 629.82
B	14	47.64 ± 36.16	31.14 ± 32.39	2.88 ± 2.19	325.21 ± 180.65 <sup>ab</sup>	293.00 ± 260.28	420.71 ± 420.43 <sup>ab</sup>
C	17	121.76 ± 174.00	49.47 ± 39.60	6.48 ± 4.72	573.41 ± 350.63 <sup>**</sup>	653.35 ± 1014.56	948.94 ± 403.43 <sup>**</sup>
D	15	41.44 ± 22.34	27.89 ± 17.83	3.27 ± 2.76	210.56 ± 114.41	211.22 ± 123.40	426.22 ± 319.00
F 值 F value		1.852	0.958	2.470	4.892	1.423	4.873
P 值 P value		0.150	0.420	0.073	0.005	0.247	0.005

注: 与 D 组比较, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ ; 与 C 组比较,  $\Delta$ :  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P<0.01$ 。

Note: vs. group D, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ ; vs. group C,  $\Delta$ :  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P<0.01$ 。

表 2 BALF 酶含量 ( $\bar{x}\pm s$ ) (U/L)  
Table 2 Enzyme level in bronchoalveolar lavage fluid ( $\bar{x}\pm s$ ) (U/L)

组别 Group	大鼠数 No.rats	肌酸激酶同工 CKMB	a-羟丁酸脱氢酶 HBDH	a-L-岩藻糖苷酶 AFU	5'-核苷酸酶 5'NT	腺苷脱氨酶 ADA
A	14	444.07 ± 397.43	217.07 ± 204.11	0.94 ± 1.87	5.57 ± 4.05	13.46 ± 16.81
B	14	232.57 ± 212.82 <sup>a</sup>	169.43 ± 204.11	0.16 ± 0.26	3.93 ± 2.20 <sup>a</sup>	12.78 ± 21.86
C	17	489.47 ± 254.46 <sup>*</sup>	252.71 ± 186.13	0.59 ± 0.77	6.76 ± 3.11 <sup>**</sup>	9.36 ± 5.24
D	15	213.33 ± 144.54	116.67 ± 73.24	0.34 ± 0.44	3.22 ± 1.20	6.16 ± 4.05
F 值 F value		3.482	1.178	1.342	3.805	0.611
P 值 P value		0.022	0.327	0.272	0.016	0.611

注: 与 D 组比较, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ ; 与 C 组比较,  $\Delta$ :  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P<0.01$ 。

Note: vs. group D, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ ; vs. group C,  $\Delta$ :  $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$ :  $P<0.01$ 。

## 讨 论

肺孢子虫通常寄生于宿主肺泡内,粘附于 I 型肺泡上皮细胞表面,肺泡微环境是肺孢子虫与宿主细胞

相互作用的场所<sup>[4]</sup>。文献报道,宿主患 PCP 时,虫体与宿主细胞相互作用,使肺泡微环境(包括组织结构和生化代谢)发生一系列复杂的变化,如肺泡壁明显增厚, I 型、II 型肺泡上皮细胞脱落和增生,炎症细

胞浸润<sup>[5]</sup>, 肺泡腔有大量泡沫状渗出物, 其中血清蛋白、粘蛋白及表面活性蛋白增加, 表面活性磷脂及  $\alpha$  肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 减少等<sup>[6,7]</sup>。

ALP 是膜结合酶, 存在于各种组织中, 血清中 ALP 主要来源于肝和骨<sup>[8]</sup>。肺内 I 型上皮细胞几乎无 ALP 表达, 而立方状的 II 型上皮细胞、无纤毛的细支气管上皮细胞、大血管内皮细胞和支气管腺上皮细胞以及基底膜都有 ALP 表达<sup>[9]</sup>, 特别是 II 型上皮细胞被认为是肺内 ALP 的主要来源<sup>[10]</sup>。本研究用地塞米松诱导建立 PCP 大鼠模型, 结果显示, PCP 模型组 ALP 含量显著高于空白对照组, 该结果与容朝晖等<sup>[6]</sup>报道结果相似, 推测 ALP 升高与肺泡 II 型上皮细胞损伤和增生有关。大蒜素治疗组及 SMZ/TMP 治疗组 ALP 含量显著低于 PCP 模型对照组, 可能是治疗后, 大鼠肺组织炎性病变减轻, I 型上皮细胞损伤及 II 型上皮细胞增生减轻所致, 表明大蒜素及 SMZ/TMP 对 PCP 大鼠有一定的治疗作用。

CK、CKMB 属于胞浆酶, 主要存在于心肌、骨骼肌和脑组织, 其水平可反映心肌细胞的完整性<sup>[11]</sup>。本实验, CK 及 CKMB 含量, PCP 模型组明显高于空白对照组, 提示 PCP 大鼠心肌细胞可能损伤。分析其原因, 可能是当肺组织处于炎症状态时, 由于缺氧与感染, 一些病原体和毒素侵袭, 使心肌受损伤, 继而引起心肌炎及心力衰竭, 这时细胞膜通透性增强, 心肌酶即释放入血。由于 PCP 大鼠肺泡毛细血管通透性增加, 血浆中的 CK 渗出到肺泡腔, 致使肺泡腔中 CK 含量升高。提示, PCP 患者应注意预防和治疗心肌病变。

一般认为, 患 PCP, LDH 多明显升高<sup>[12]</sup>。本研究 LDH 虽呈升高趋势, 但无统计学意义。实验中 AST、ALT、CHE、LDH、HBDH、AFU 及 ADA 的含量, 4 组间差异无统计学意义, 说明这些酶在肺泡微环境中的含量与 PCP 发病关系不大, 不能反映 PCP 的病理生理变化。

#### 参 考 文 献

[ 1 ] Lu ZM, Tang HW, Zhang ZM, *et al.* The experimental study of garlicin in treating *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats [J].

Chin J Parasitol Parasit Dis, 2004, 22: 357-360. (in Chinese)  
(卢致民, 唐宏炜, 张振明, 等. 大蒜素治疗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22: 357-360.)

[ 2 ] Tong XY, Ji WH, Wu ZQ. Experimental studies on animal model of *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1997, 10: 201-203. (in Chinese)  
(佟小莺, 纪伟华, 吴增强, 等. 卡氏肺孢子虫肺炎动物模型的实验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997, 10: 201-203.)

[ 3 ] Liu KQ, Yin WD, Xue GP, *et al.* Analysis of ten enzymes in the serum of rats infected with *Pneumocystis carinii*[J]. J Hebei North Univer, 2005, 22(1): 19-22. (in Chinese)  
(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, 2005, 22(1): 19-22.)

[ 4 ] Limpers AH, Staning JE, Leot EB. *Pneumocystis carinii* adherence to alveolar epithelial cells promotes organisms proliferation [J]. J Invest Med, 1995, 43: 466.

[ 5 ] Zhang WD, Xie LX, Zhang ZG, *et al.* Study on the experimental pathology on the rat pneumonia induced by *Pneumocystis carinii* [J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20: 786-789. (in Chinese)  
(张卫东, 谢立新, 张志刚, 等. 大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验病理学研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20: 786-789.)

[ 6 ] Rong ZH, He LX, Qu JM, *et al.* Study on inflammatory response and alteration of biochemical components in BALF from *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. J Tuberc Respir Dis, 1999, 22: 548-551. (in Chinese)  
(容朝晖, 何礼贤, 瞿介明, 等. 卡氏肺孢子虫肺炎肺灌洗液细胞和生化成分变化的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22: 548-551.)

[ 7 ] Rong ZH. The microenvironment change of alveoli in *Pneumocystis carinii* pneumonia and its effect in pathogenesis[J]. Foreign Med Sci, Section of Respiratory System, 1999, 19: 10-14. (in Chinese)  
(容朝晖. 卡氏肺孢子虫肺炎肺泡微环境的改变及其在发病中的作用[J]. 国外医学呼吸系统分册, 1999, 19: 10-14.)

[ 8 ] Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, *et al.* Early NF-kappa B activation is associated with hormone-induced pancreatitis [J]. Am J Physiol, 1998, 275: 1402-1414.

[ 9 ] Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, *et al.* NF- $\kappa$ B/Rel activation in cerulein pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1999, 116: 420-430.

[ 10 ] Al-Mufti RA, Williamson RCN, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis[J]. Gut, 1998, 43: 564-570.

[ 11 ] Cao CY, Yuan HY. Analysis on the change of 9 serum enzymes and their clinical significance in children with pneumonia[J]. J Qiqihar Med College, 2005, 26: 876-877. (in Chinese)  
(曹传勇, 袁汉尧. 肺炎患儿血清酶改变的分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26: 876-877.)

[ 12 ] Qu JM, Rong ZH, Pan J, *et al.* The study on relationship between the burden of *Pneumocystis carinii* and lung injury[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2000, 13: 174-180. (in Chinese)  
(瞿介明, 容朝晖, 潘珏, 等. 卡氏肺孢子虫虫体负荷与肺损伤的关系研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13: 174-180.)

(收稿日期: 2007-03-09 编辑: 富秀兰)