论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0580-04

急性脊髓损伤后家兔肠道菌群移位和内毒血症的肠道病理生理机制

白春宏[1],王莎莉[2],安 洪[1],蒋电明[1],聂 海[1],李雷雷[3] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院骨科[1],神经科学研究中心[2],妇幼与儿童少年卫生学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨家兔脊髓损伤后肠道菌群移位和内毒血症的肠道病理生理机制。**方法** 建立兔脊髓损伤性截瘫模型,12只家兔行脊髓损伤前后胃肠道电生理和压力测定。另外24只家兔分为:正常对照组(6只)和实验组(18只),在无菌条件下,采集门静脉血进行内毒素定量测定和细菌培养,肠系膜淋巴结作细菌培养并鉴定。取实验组和对照组各动物的小肠、结肠行HE染色检查观察肠黏膜病理变化,小肠行电镜检查观察肠黏膜上皮细胞病理变化。**结果** 脊髓损伤后,发现胃肠道生物电改变明显,以结肠为重。中远段结肠的蠕动明显减少,部分时段甚至消失。早期小肠和结肠黏膜下充血和黏膜上皮细胞水肿,随后,黏膜上皮间隙增宽,细胞崩解,导致肠黏膜屏障破坏。血清内毒素含量从24 h就开始增高,到72 h差异显著($P<0.05$)。门静脉血与肠系膜淋巴结各阶段细菌培养阳性率均较高,无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 急性脊髓损伤后,中远段结肠的蠕动功能障碍导致排便障碍、细菌过度增长与入侵、影响血运等一系列破坏因素而加速肠黏膜屏障破坏为肠道菌群移位和内毒血症的主要病理生理机制。

[关键词] 脊髓损伤;肠道功能障碍;细菌移位;内毒素血症;病理生理机制

[中图法分类号] R333.3;R561.2;R363.21 **[文献标志码]** A

Intestinal pathophysiological mechanism of bacterial translocation and endotoxemia in rabbits with acute spinal cord injury

Bai Chunhong[1], Wang Shali[2], An Hong[1], Jiang Dianming[1], Nie Hai[1], Li Leilei[3] ([1]Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital; [2]Neuroscience Research Center, [3]Department of Maternal & Child Care and Adolescents Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the intestinal pathophysiological mechanism of bacterial translocation and endotoxemia in rabbits with acute spinal cord injury (SCI). **Methods** Paraplegia was induced by injuring the spinal cord of 30 rabbits by the method of Fehlings. Twelve rabbits were used for recording the changes of gastrointestinal (GI) electrophysiology and colon pressure. The left 18 rabbits were experimental group and were killed in 24, 48 and 72 h after injury. The other 6 rabbits served as normal group. Under aseptic condition, samples of blood and mesenteric lymph node were collected for bacterial cultures and endotoxin detection. The small intestines were observed by light and electron microscopy. The colons were inspected by light microscopy. **Results** After SCI, the electrophysiology of the GI tract was changed especially at the middle and distal colon. The peristalsis of the middle and distal colon was reduced and sometimes even disappeared. In the early stage, the main pathology was hyperemia of blood vessel and infiltration of inflammatory cells. The interepithelial tight junctions became wider and the columnar epithelium was disintegrated. All of the pathological changes may lead to the destruction of the intestinal barrier. The endotoxin level were increased since 24 h after SCI and had statistically significant difference compared with that at 72 h ($P<0.05$). The positive rates in blood and mesenteric lymph nodes at 24, 48 and 72 h were very high, but there was no significant difference among them ($P>0.05$). **Conclusion** After SCI, the middle and distal colon dysfunction induces constipation, bacterial overgrowth, and blood flow congestion. These factors may accelerate the destruction of the intestinal barrier and lead to bacterial translocation and endotoxemia.

[Key words] spinal cord injury; intestinal tract dysfunction; bacterial translocation; endotoxemia; pathophysiological mechanism

Corresponding author: An Hong, Tel: 86-23-89011202, E-mail: Anhong1106@sohu.com

[通信作者] 安 洪,电话:(023)89011202,E-mail:Anhong1106@sohu.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后机体多个器官可受累及出现功能障碍,尤其是肠道蠕动功能障碍更加明显[1]。结肠、直肠功能障碍在损伤后可立即出现[2]。大多数患者SCI后会出现便秘,腹痛和便秘相关综合征,随着时间的推移而逐渐加重[3]。目前有几种病生理机制报道[4]:①胃肠传递时间延迟;②SCI平面决定(颈椎:腰椎=5.6:1)症状;③直肠内括约肌抑制反射消失。Liu等[5]研究报道SCI后,因肠道功能障碍可发生菌群移位、内毒素血症。当细菌和内毒素进入血循环后,对多个脏器产生严重的打击,出现全身炎症反应综合征或多器官功能衰竭。然而,SCI后,肠道病理生理改变如何及其对肠源性菌群移位和内毒血症的发生到底有什么作用?目前还不很清楚。为此,我们进行了如下研究。

1 材料与方法

1.1 动物分组

新西兰成年白兔36只,体质量2.0~2.5 kg(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘。按随机数字表法进行分组,分为:行电生理分析12只、对照组6只和实验组18只。实验组分别在截瘫后24、48和72 h(各6只)取标本。实验前置22~25 ℃,每笼1只,普通饲料喂养1周。损伤前12 h禁食、水。

1.2 截瘫模型建立

速眠新Ⅱ0.2 ml/kg体质量肌内注射于兔后肢肌肉丰厚处,3 min左右,家兔处于制动状态,置俯卧位,定位T_6棘突,脱毛,消毒,手术暴露脊髓,用神经剥离器轻轻挑起后,采用Fehlings法[6],用98 g动脉瘤血管夹横行钳夹约1 min,见双下肢抽搐停止,通过监测SCI前、后体感诱发电位和运动诱发电位证实脊髓已经横断。去除动脉瘤血管夹,冲洗伤口后缝合,无菌包扎。

1.3 电生理分析

12只家兔分别在SCI前后行胃和多段肠道生物电和结肠内压同步记录,信号的采集和分析均在成都仪器厂的RM6420B多导生理信号采集处理系统上进行。无菌条件下,打开动物腹腔,其中6只将电极分别置于胃窦、回肠、空肠、盲肠、3袋结肠、单袋结肠和远端结肠的肌层中,缝合固定,连接仪器,记录生物电。另6只动物行结肠内压记录。将自制的水囊缝合固定于上述结肠中的黏膜下,连接仪器,记录分析生物信号。

1.4 细菌培养及鉴定

无菌条件下采取肝门静脉血1 ml和肠系膜淋巴结。标本采集后经肉汤培养基增菌后再接种于血琼脂培养基,经37 ℃,18~24 h培养后观察菌落形态,革兰染色后镜检,根据镜检结果分别接种于各鉴定系统。

1.5 内毒素测定

无热源注射器取门静脉血适量,取掉针头贴壁注入EP管,静置30 min,3 500 r/min 4 ℃离心5 min,取血清0.1 ml,加入鲎试剂盒中的实验用水0.9 ml,混匀后置75 ℃水浴加热10 min,冷至室温备用。利用鲎试剂盒(广州安度斯生物有限公司产品)定量测定血清内毒素。EDS-99细菌内毒素测定系统测定报告,采用动态浊度法。

1.6 病理及超微病理

取小肠、结肠,10%多聚甲醛固定,梯度酒精系列脱水,常规石蜡包埋,HE染色,光学显微镜观察。取小肠组织常规处理后,电镜观察。

1.7 统计学分析

SPSS 13.0统计软件进行分析。两组数据之间的比较采用t检验;如数据不成正态分布则行秩和检验。不同率之间的比较采用χ^2检验。

2 结果

2.1 胃肠道生理改变

兔SCI前胃肠消化间期出现规律、明显的消化间期移动性复合电。SCI后,各段胃肠道生物电活动明显障碍。虽然盲肠以上肠段的消化间期移动性复合电存在,但放电频率明显减少,波幅明显降低,而单袋结肠及远端结肠的生物电几乎消失。对SCI前后生物电进行分析,参数分别为:最大峰值、最小峰值、平均峰值、放电次数、频率、周期、总放电面积,采用秩和检验(每100 s为一个统计单位,正常$n=25$,SCI $n=47$)结果:1~7导联SCI前后生物电各参数均有不同程度的变化,但以6、7导联最为明显(表1)。

表1 脊髓损伤前后各导联生物电比较(P)

导联	最大峰值	最小峰值	平均峰值	放电次数	频率	周期	总放电面积
1	0.000	0.000	0.000	0.068	0.070	0.485	0.000
2	0.531	0.000	0.000	0.005	0.001	0.010	0.000
3	0.117	0.012	0.091	0.138	0.264	0.519	0.599
4	0.391	0.204	0.068	0.045	0.012	0.083	0.911
5	0.000	0.366	0.000	0.001	0.007	0.925	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.008	0.000	0.001	0.006	0.000	0.000

对SCI前后结肠3个部位进行结肠压力测试,结果发现脊髓损伤前消化间期移动性复合波明显、规律,而SCI后,只有3袋结肠有巨大的蠕动推进波,而单袋结肠和远端结肠只有自主微小蠕动,巨大的蠕动推进波消失。3袋结肠的压力波面积及压力波持续时间没有差异,但压力波波峰高度显著高于损伤前。而单袋结肠和远端结肠的压力波面积、压力波持续时间有统计学意义,压力波波峰高度没有统计学差异(表2)。

表2 家兔脊髓损伤前后结肠不同部位压力波面积、压力波持续时间和压力波波峰高度 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	压力波面积(cmH_2Os)	压力波持续时间(s)	压力波波峰高度(cmH_2O)
三袋结肠				
对照组	12	9 365.11±8 340.44	189.49±128.26	9.13±3.31
实验组	9	17 045.43±10 144.91	129.73±77.56	93.29±143.35[b]
单袋结肠				
对照组	9	13 928.56±7 782.29	159.51±56.25	23.95±9.78
实验组	10	973.67±1 097.28[a]	19.66±18.47[b]	8.24±6.04
远端结肠				
对照组	13	17 674.67±6 785.16	118.28±86.41	18.92±6.34
实验组	16	1 644.32±1 493.23[a]	26.45±20.02[b]	17.27±4.97

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

2.2 血清内毒素含量

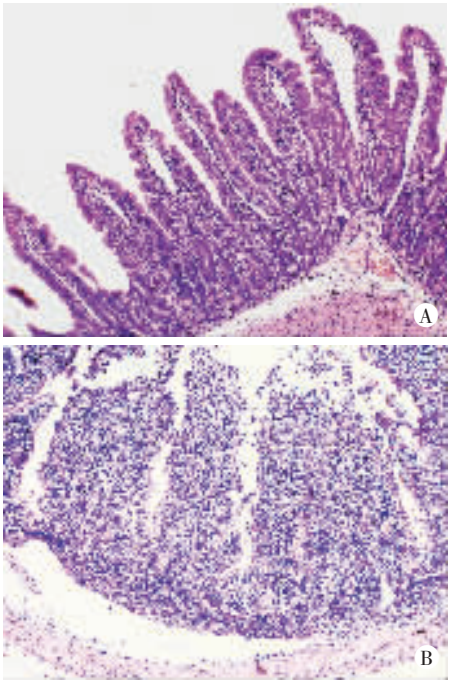
正常对照组血清内毒素为[(0.194 0±0.163 1) EU/L],实验组血清内毒含量从24 h[(0.235 2±0.248 7) EU/L]就开始增高,到72 h[(1.143 8±0.703 4) EU/L,$P<0.05$]其差异非常显著。

2.3 菌培养结果

肝门静脉血与肠系膜淋巴结各阶段细菌培养阳性率差异均不具备统计学意义(24 h:$P=0.439$;48h: $P=0.439$; 72 h: $P=1.000$)。培养菌种以大肠杆菌、肠粪球菌、大肠埃希氏菌、普通变形杆菌、阴沟杆菌等为主。

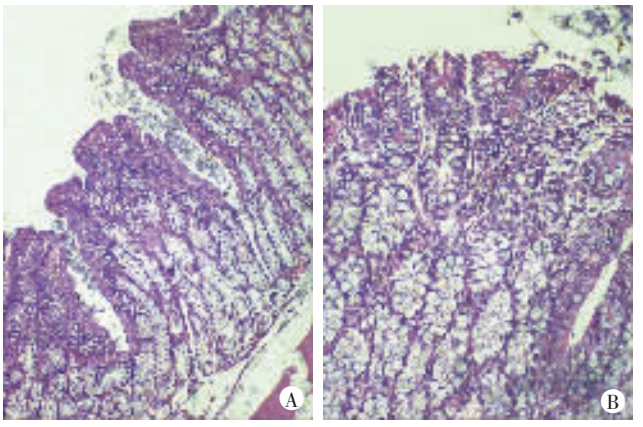
2.4 肠道病理改变

小肠:SCI后24 h,黏膜下严重淤血,黏膜下层、固有层有大量炎性细胞侵润;48 h,黏膜下水肿,黏膜下层、固有层有大量炎性细胞侵润,肠绒毛尖端上皮细胞脱落,结构破坏;72 h,小肠黏膜层内及肠管壁大量的炎症细胞侵润,黏膜结构完全破坏,仅有腺体轮廓仍保留,绒毛萎缩、变性,甚至崩解,上皮细胞脱落,有大量渗出的纤维蛋白与坏死组织、中性粒细胞、红细胞混杂在一起(图1)。结肠病理观察,正常结肠黏膜上皮细胞排列整齐,腺体丰富,黏膜下层结构良好。SCI后,黏膜下严重瘀血,黏膜下层、固有层有大量炎性细胞侵润。随着病情发展,黏膜下水肿,炎性细胞聚集,黏膜上皮细胞脱落(图2)。回肠超微结构观察发现:对照组,细胞器结构良好,细胞间连接紧密,微绒毛排列整齐。实验组24 h,黏膜上皮细胞水肿,微绒毛稀疏、萎缩;48 h,黏膜上皮细胞严重水肿,细胞器结构改变,黏膜上皮细胞坏死,细胞间紧密连接破坏,细胞间隙明显增宽,微绒毛脱落;72 h,黏膜上皮细胞崩解,微绒毛脱落,脱落的微绒毛水肿明显(图3)。



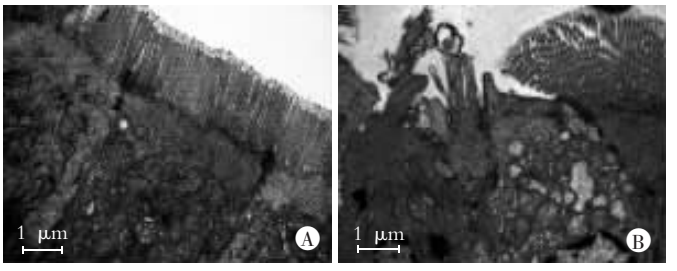
A:对照组; B:实验组72 h

图1 两组家兔SCI前后小肠光镜观察 (HE ×200)



A:对照组(HE ×200); B:实验组72 h(HE ×400)

图2 两组家兔SCI前后结肠光镜观察



A:对照组; B:实验组72 h

图3 两组家兔回肠超微结构观察 (EM)

3 讨论

移行性复合波加速胃肠运动,推进食糜,防止结肠内细菌逆行。其减弱常伴食物推进减慢和小肠细菌过度繁殖。Gondim等[7]报道:脊髓横断可导致胃排空延迟和胃肠道液体传递减慢。Valles等[8]证明神经病变的患者中有不同程度的结肠传输时间延迟、腹内压增加不能和肛管松弛消失等功能障碍。我们发现兔截瘫后腹胀、排便困难。剖腹发现肠道充气明显,大量粪便积聚,肠壁变薄、缺血。正常兔移动性复合电明显且规律,SCI后明显减弱和不规律。全胃肠各参数中均有部分有显著性差异,由近到远逐渐加重。三袋结肠的压力波波峰高于SCI前的,单袋和远端结肠的收缩波面积、压力波持续时间低于SCI前。我们认为截瘫后肠道功能障碍主要位于中、远段结肠,并影响近端功能。迷走神经支配右结肠,神经核位于大脑,而支配左结肠和肛管直肠的神经来自骶副交感神经中枢,调节结肠动力,但也受近端脊髓神经结构的影响。当远端结肠活动减弱、排空障碍,近端结肠的扩张刺激增强,通过迷走-迷走神经反射加强近端肠道的活动。残留的结肠放电在排便时仍能记录到,但明显减弱。残留的活动可能与肠固有神经和体液因素有关。

完整的胃肠功能屏障可防止肠道内微生物移位和

内毒素吸收。包括:蠕动、机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障。首先,截瘫兔肠道蠕动功能遭到破坏;其次,黏膜缺血性损伤导致黏膜上皮细胞从绒毛顶端脱落,逐渐向基底部发展。黏膜下充血和黏膜上皮细胞水肿,黏膜上皮间隙增宽,细胞崩解,导致肠黏膜屏障破坏。曹卫红等[9]报道肠黏膜损伤和肠道蠕动、吸收和屏障功能障碍是由于缺血再灌注损伤的结果。以上病理变化在小肠和结肠均可发现,故它们可能同为细菌和内毒素的突破部位。内毒素和细菌可经细胞途径和细胞旁途径穿越肠黏膜屏障。超微病理发现,回肠黏膜上皮细胞损伤早于细胞间紧密连接的破坏。当细胞严重水肿、坏死变形时,细胞间隙也变宽。故二者是互相影响而形成恶性循环。肠道内专性厌氧菌可定植肠黏膜上皮并产生菌膜防止条件致病菌(如大肠杆菌)的黏附和定植。一旦失去功能,优势增殖菌可突破损伤的肠黏膜屏障并转移到其他器官[10]。本实验主要以大肠杆菌、肠粪球菌、大肠埃希氏菌、普通变形杆菌、阴沟杆菌等为主。急性肠黏膜炎症反应大量中性粒细胞聚集于固有层和黏膜下层,如被激活的中性粒细胞不能及时的迎击微生物目标,会产生大量的抗微生物物质[11]。浆细胞产生 IgA 聚合体和内分泌小体结合成分泌型 IgA,选择性的包裹革兰阴性杆菌以预防黏附和入侵。但当损伤、应急导致机体或肠道局部免疫力降低,加剧细菌移位和内毒素血症。当巨噬细胞和中性粒细胞被激活,它们将吞噬细菌进入肠系膜淋巴结并将其带到其他器官。周新泽等[12]报道阻断极度衰弱的鼠的淋巴回流可减轻内毒素血症的程度。我们再次证明肠系膜淋巴途径为肠道细菌移位的主要途径。

“肠道发病的中心器官学说”认为细菌移位与 SIRS 的关系是相互的[13]。根据 Deitch[14]“三次打击模型”,我们认为 SCI 后肠内容物储留、细菌过度增长,肠扩张缺血使肠壁结构在组织学和细胞学水平损害。在第一次打击基础上,大量的内毒素和细菌穿过黏膜屏障。内毒素血症和肠道菌群移位成为二次打击,再次作用到肠黏膜,致使肠黏膜损伤加重。大量进入循环的内毒素和移位细菌加重其他脏器或系统的损害(三次打击)。总之,菌群移位和内毒素血症的肠道病生理机制非常复杂。在传统机制的基础上,我们的实验结果提示中远段结肠的蠕动功能损害是导致排便障碍、细菌过度增长、为细菌定植提供条件和影响血运等一系列问题的重要因素。因此,早期预防第二次打击,解决排便问题、口服抗生素和肠内营养等综合治疗非常重要,其中恢复肠道的生理功能甚为关键。

参考文献:

[1] Alexander M S, Biering-Sorensen F, Bodner D, *et al*. International standards to document remaining autonomic function after spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 36-43.

[2] Korsten M A, Singal A K, Monga A, *et al*. Anorectal stimulation causes increased colonic motor activity in subjects with spinal cord injury [J]. J Spinal Cord Med, 2007, 30(1): 31-35.

[3] Faaborg P M, Christensen P, Finnerup N, *et al*. The pattern of colorectal dysfunction changes with time since spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2008, 46(3): 234-238.

[4] Media S, Christensen P, Lauge I, *et al*. Reproducibility and validity of radiographically determined gastrointestinal and segmental colonic transit times in spinal cord-injured patients[J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 72-75.

[5] Liu J, An H, Jiang D, *et al*. Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats[J]. Spine, 2004, 29(2): 164-169.

[6] Fehlings M G, Tator C H. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1995, 132(2): 220-228.

[7] Gondim F A, Rodrigues C L, da-Graca J R, *et al*. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transection in awake rats[J]. Auton Neurosci, 2001, 87(1): 52-58.

[8] Valles M, Vidal J, Clave P, *et al*. Bowel dysfunction in patients with motor complete spinal cord injury: clinical, neurological, and pathophysiological associations[J]. Am J Gastroenterol , 2006, 101(10): 2290-2299 .

[9] 曹卫红, 柴家科, 胡森, 等. 兔肠道部分缺血再灌注损伤对肠道功能的影响[J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(4): 355-358.

[10] Troeger H, Richter J F, Beutin L, *et al*. Escherichia coli alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation[J]. Cell Microbiol, 2007, 9(10): 2530-2540.

[11] Blikslager A T, Moeser A J, Gookin J L, *et al*. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa[J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 545-564.

[12] 周新泽, 毛勤生, 倪耀辉, 等. 阻断肠道淋巴通道对重症急性胰腺炎大鼠肠道细菌易位的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(1): 43-46.

[13] Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(1): 27-31.

[14] Deitch E A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? [J]. Surgery, 2002, 131(3): 241-244.

(**收稿**:2009-08-01;**修回**:2009-09-08)

(编辑 栗 嘉)