DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.016
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1418 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1418-03

# 自发性细菌性腹膜炎腹水中大肠杆菌潜生体增殖方式的研究

王瑞玲[1],梁后杰[1],刘俊康[2],徐启旺[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院肿瘤血液科;[2]生物波研究中心;重庆 400038)

提 要:目的 研究自发性细菌性腹膜炎腹水中大肠杆菌潜生体的增殖方式,探讨大肠杆菌潜生体对肠道粘膜的侵袭性。方法 在生物波理论的基础上,建立大肠杆菌的波动生长模型,观察大肠杆菌潜生体在不同pH、温度、湿度、渗透压、抗生素状态下的生长变化。制备肝硬化鼠动物模型观察大肠杆菌潜生体对肠道粘膜的损害。结果 经波动培养后,可见肠道潜生体呈现多种生长方式。自发性细菌性腹膜炎腹水中大肠杆菌潜生体形成率和群集率可显著增高。自发性细菌性腹膜炎腹水中潜生体具有较强的繁殖能力运动能力和抗生素耐受能力,从而具有较强的侵袭力,而且具有一定的逃逸巨噬细胞吞噬的能力。结论 潜生体在自发性细菌性腹膜炎发生发展中有一定的相关性。

关键词:潜生体;自发性细菌性腹膜炎
中图法分类号:R378.21;R572.2 文献标识码:A

# Proliferative manners of *E. coli* cryptic growth cells in ascites from patients with spontaneous bacterial peritonitis

WANG Rui-ling, LIANG Hou-jie, LIU Jun-kang, XU Qi-wang (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To study the proliferative manner of *E. coli* cryptic growth cells (CGC) from the ascites of spontaneous bacterial patients and their invasiveness in the intestinal tract tissue. Methods Based on bio-wave theory and bacterial micro-cultured technology, bacterial genetic stability test and minimal inhibitory concentration (MIC) were used to observe the biological characteristics of CGC in pH, temperature, humidity, osmotic pressure. The therapeutic effect of antibiotic on CGC and invasiveness were evaluated. Results In the wave motion cultivation, the CGC of *E. coli* had great development and proliferation. Bacterial genetic stability and aggregation of the intestinal flora were significantly increased. Its tolerance towards antibiotic was increased, and CGC adapt itself to many disadvantage environments, such as in certain pH values and humidity. The invasiveness of the CGC was significantly increased in the intestinal mucosa and the formation of opportunity bacterial infections. Conclusion CGC have stable species genetic, powerful reproduce, motion and nvasiveness ability, and intensive tolerance towards antibiotic. CGC may play an important role in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis.

**Key words:** cryptic growth cell; spontaneous bacterial peritonitis

自发性细菌性腹膜炎(Spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化常见的严重并发症之一,但对其发病机制尚未完全阐明,肠道是人体最大的细菌贮存库,而SBP的病原菌主要为肠道常居菌如大肠杆菌,克雷伯氏菌等。近年来应用某些抗生素进行消化道选择性净化确能减少SBP的发病率,目前普遍认为肠道菌是引起SBP的主要来源[1,2],但至今尚缺乏肠道细菌进入腹膜腔引起SBP的直接证据。徐启旺等[3]在生物波理论研究中,观察到细菌在一定条件下可以出现短小杆菌和纤细状菌两种形态交替而至的宏观波动生长,呈现潜一生序变化,后者称为潜生体(Cryptic growth cell, CGC),自发性细菌性腹膜炎是肝硬化的严重并发症,可导致胃肠淤血和组织水肿,加之临床上抗生素应用的普遍性和不规范性,必然导致肠道内环境和微生态的变化。本研究目的在于:①观察自发性细菌性腹膜炎腹水中大肠杆菌CGC形成和群集情况;②观察CGC对肠道粘膜的损伤作用及在自发性细菌性腹膜炎发生中的相关性。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870346)

作者简介:王瑞玲(1963—),女,甘肃省兰州市人,硕士,主治医师,主要从事肝病方面的研究,发表论文9篇,现在解放军473医院消化内科,兰州 730070。电话(0931)7669073

收稿日期:2001-02-10;修回日期:2001-07-20

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

临床大肠杆菌从自发性细菌性腹膜炎患者腹水中分离;波动Ⅲ号培养基按刘俊康等[4]的方法制备;昆明种小鼠由本校实验动物中心提供,体重(20±2)g;显微摄-录像系统由Capton相差荧光显微镜,Panasonic HP100录像机,Sharp监视器,Pentium Ⅱ微机及图像处理软件组成。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌波动生长CGC形成实验 采用生物波中心建立的波动培养方法[4]培养大肠杆菌,可形成同心环菌落,在最外层一道菌落环外形成的薄层菌苔中挑取细菌,即为细菌CGC,用生理盐水制备成10%菌液备用。在波动培养中加有2,3-氯化三苯基四氮唑(TTC),可用于显示CGC的代谢状态。如有CGC,将上述混悬液进行10倍系列稀释,分别取$10^{-3}$、$10^{-6}$、$10^{-9}$的稀释管中液涂布于营养琼脂平板上培养,在Opton相差显微镜下定位后每隔5 h观察1次,确定其是否能够生长以确

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定 CGC 的存活情况。

1.2.2　显微培养　　在 Shapiro[5] 方法基础上加以改良。盖玻片中央铺上厚 1 mm, 面积为 1 $cm^2$ 的培养基, 加 10 μl 菌悬液($1\times10^{-1}$)反扣于特别凹型波片的凹槽中, 凹型槽中预先加一层 10 $g\cdot L^{-1}$ 琼脂糖, 37 ℃湿盒培养并在相差显微镜下动态观察细菌生长情况。

1.2.3　CGC 传代及遗传稳定性试验　　采用显微培养方法分离 CGC, 分别进行需氧、厌氧培养, 37 ℃、24 h 后观察其生长情况。

1.2.4　对子代个体的菌落进行定性鉴定　　鉴定方法采用需氧菌、厌氧菌常规鉴定法进行。CGC 运动实验观察方法: 将细菌 CGC 悬液按刘俊康等的方法进行显微培养, 以显微摄-录系统动态观察和记录 CGC 的生长及运动方式。

1.2.5　抗生素诱导法　　采用 MIC 法和纸片法进行药敏试验, 结合进行形态观察, 可见氨卞青霉素、先锋必、氟哌酸、羟氨卞青霉素、妥布霉素、多粘菌素 B 原液等各种抗生素可诱导出大量的细菌潜生体形成。

1.2.6　不同 pH 值诱导法　测定 PH 值持续改变时对 CGC 诱导作用, 实验将营养肉汤配制成不同 PH 值的系列肉汤管: 包括 pH 4、5、6、7、8 接种大肠杆菌菌株, 进行培养后观察。

1.2.7　体内 CGC 定植的体外稳定传代鉴定试验　　将腹水中分离的标本稀释后涂于营养平板上, 在显微镜下定位 CGC, 待其形成波动菌落后, 挑取其中的 CGC 放在营养平板上, 37 ℃连续观察这些 CGC 是否可形成子代 CGC 组成的菌落。将肝硬化鼠肠粘膜标本, 用无菌 PBS 轻轻漂洗 5~6 次, 然后剥离粘膜层, 粘膜向上平铺于波片上。经 1 ml/ L 美蓝(2 min), 高锰酸钾染色后, 于室温晾干, 油镜下观察 CGC 定植情况。

1.2.8　抗生素诱导形成及定植局部肠粘膜病变观察　　随机选取 10 只昆明种小鼠, 羟氨卞青霉素(0.1 g/ L) 1 ml, ip, 喂养 7 d, 观察小鼠的体重改变、进食量、粪便情况并分离粪便中的大肠杆菌进行波动培养观察 CGC 的生长情况。7 d 后解剖观察小鼠回盲部和结肠部位 CGC 的定植情况。切取定植局部肠道组织、固定、行常规病理学检查。

## 2　结果

### 2.1　肠道菌丛 CGC 的生物学性状

大肠杆菌 CGC 呈纤细状形态, 革兰染色阴性, 核物质数量增多, 表面多糖丰富, 在培养系统中 CGC 个体和群体表现出定向运动、藕合运动、自旋运动特殊运动方式。CGC 自旋小体中心一端常可因自旋穿入培养基中。在培养 2 h 后, 波动 CGC 断裂, 断裂细菌开始大量繁殖, 培养 8 h 后, 完全断裂成多个短菌形成一个群集小体。CGC 增殖方式包括: ① 断裂增殖: CGC 可沿长轴方向出现等部位断裂, 生成多个子代个体, 均可发育成为繁殖体; ②出芽增殖: 这一增殖过程中可见 CGC 多个部位出芽, 新生芽不断延长, 最后也可多处断芽。以这种方式, 一个 CGC 往往增殖成一个群体; ③ 自旋脱落: 在相差显微镜下, 可看到部分 CGC 能够进行特殊的运动, 一端形成“S”型弯曲, 其余部分围绕弯曲多圈缠绕, 稳定地自旋运动; ④大肠杆菌 CGC 对各种抗生素的 MIC 较其回复生长形成的繁殖体及原代培养繁殖体均高 6~8 倍, 两种繁殖体 MIC 基本相同; ⑤在一定的 pH 值范围内, 随着培养时间的延长, 试管中除 pH 4、8 以外, 各管内逐渐产生 CGC, 并在 5 d 以后逐渐自溶, 表明在一定的 pH 值范围内也可诱导 CGC 生长。大量 CGC 可诱导产生, 体外培养 5 d 后逐渐自溶。表明 CGC 对不利环境有一定适宜能力。

### 2.2　CGC 的致病性

采用分层剥离将小鼠肠粘膜分离出制成病理组织切片的试验表明, CGC 在被覆粘液上, 能形成簇集。CGC 一端穿过粘液层, 并排扎在肠粘膜细胞上, 另一端悬在粘液中。结果表明有大量 CGC 在肠道定植, 显示了 CGC 的肠道侵袭损伤作用。病理学观察定植 CGC 能引起局部组织损伤, 见图 1。



图 1　定植 CGC 导致肠道组织损伤的病理切片　(HE× 200)

**Fig 1　Damage of intestinal tract induced by CGC homing**　(HE× 200)

## 3　讨论

### 3.1　CGC 维持种系稳定

由于细菌 CGC 与繁殖体的交替出现形成不同的同心环状菌落, 促进波动生长, 使细菌对外界环境的适宜能力增加。CGC 代谢减低, 运动活泼, 也增强了其适宜能力。CGC 运动在合适条件下, 可以多种方式增殖(如断裂、梳状、出芽等方式)。导致数量增加而发生群集。这些能力使其适宜环境, 在维持种系稳定中发挥着重要作用。潜生体的生长与繁殖体的二分裂方式有明显的区别[6], 对生物的种系保存具有重要意义。进化论认为生物种系存在要克服各种不利的环境除了需要具备特殊结构以外, 还应有高度适应的生理功能。一个细菌细胞在不利环境中容易死亡, 而多个细菌细胞堆积在一起就有一定的抵抗力, 这种抵抗力来自细菌的迅速增殖, 称之为群集抵抗, 群集抵抗的持久还有赖于新结构的稳定性。Costerton[7] 观察到群集细菌周围和细菌之间存在着厚的一层胞外糖, 称为 Glycocalyx, 这种胞外糖对细菌群集的结构稳定及对组织粘附都有重要作用, 大肠杆菌的自旋脱落增殖方式、使子代个体可以迅速地播散, 尤其是使用抗生素之后, 潜生体细菌有一些奇妙的生物学特性, 如自旋、群选择作用、耐药作用等, 在微生物感染及维持生存上同样具有重要作用。

### 3.2　CGC 的致病性

在动物试验中, 我们找到 CGC 致动物结肠非特异损伤的证据。抗生素反复注射小鼠的腹腔, 人为地诱导动物肠道细菌形成 CGC 定植。实验组中发生体重

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

下降,进食量减少,大便改变的动物,其粪便中出现较多的CGC,有一部分出现定植。解剖后取结肠组织、行常规病理切片,在光镜下见肠粘膜大多有非特异改变,有WBC浸润,少部分甚至出现粘膜溃疡,严重者有渗出性坏死。小鼠结肠粘膜病理切片的试验表明,CGC在被覆粘液的肠粘膜上能形成簇集,CGC一端穿过粘液层,并排扎在肠粘膜细胞上,另一端悬在粘液中。CGC在以断裂方式进入生长状态,断裂成繁殖体的过程中多数断裂后的菌体发生自溶,同时释放出多种水解酶类。少部分成为存活的繁殖体而旺盛生长。这是一个群选择的过程[8,9]。实验证明,CGC属于饥饿细胞,其定植较繁殖体强。如果机体因为某种长期的原因使肠道生境发生不利于细菌生长的改变,这时候细菌CGC就会因细菌群选择作用而形成。由于其定植力强,故可持续存在于肠粘膜表面。但细菌要继续存活,要求细菌和粘膜细胞间发生有规律的相互作用。发炎或渗出提供了这样一种相互作用,使CGC获得营养物质。所以,CGC可能引起粘膜的渗出变化或发炎,这可能靠CGC断裂在局部释放高浓度水解酶或炎性物质实现的。当使用抗生素治疗后,细菌又以CGC的形式粘附于粘膜细胞进入静息状态,如此反复造成了慢性过程。由此,我们认为大肠杆菌CGC形成了致病菌发病动态过程,肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎与CGC有关。

许多学者已从定量和定性临床资料证实肝硬化患者存在肠道菌群的改变及细菌过度生长,且可能与肝硬化的某些并发症有关,微生态学研究虽提出了肝硬化患者存在菌群失调的观点,但目前仍未摆脱诊断致病菌的郭霍法则,仍是以传统的方法,局限于对肠道有无致病菌的生长或某些细菌量的多少的评估上,而对肠道菌丛的存在形式或生存状态及其与致病性的关系尚缺乏研究。事实上,引起SBP的细菌也并非是肠道优势菌,从肝硬化肠淋巴结分离的细菌也并非总与肠道过度生长的细菌相一致[10]。从理论上讲,如果只是由于肝硬化时机体免疫力下降,肠屏障功能受损等而导致肠道细菌移位并引起SBP的话,那么引起SBP的病原菌应为多种细菌(肠道菌丛多样性)而非单一细菌,且应以占优势的肠道菌丛(厌氧菌和链球菌)为主,这显然与SBP多由单一细菌感染(大肠杆菌)引起,且极少能分离出厌氧菌和链球菌的事实不符。临床上也观察到SBP的发生并非总与肝硬化严重程度呈正相关,动物实验也发现如抑制巨噬细胞的杀菌功能,在肝硬化鼠可诱发SBP,而正常鼠则不能[11],以上均提示,肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎时宿主因素(免疫力下降,肠屏障功能受损,通透性增加等)可能只是SBP的诱发因素,而肠道细菌本身特性的改变(具更强的侵袭力或/和逃脱机体免疫清除)才是导致SBP发生的主要原因。

参考文献:


[1] Runyon B A, Borzio N, Young S, *et al*. Effect of selective bowel decontamination with norfolxacin on spontancous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis[J]. Hepatology, 1995, 21(6): 1 719—1 722.

[2] Novella M, Sola R, Soriano G, *et al*. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfolxacin[J]. Hepatology, 1997, 25(2): 532—536.

[3] 徐启旺, 刘俊康, 郭 刚, 等. 微生物生长的群体、周期和波[J]. 自然杂志, 1992, 15(3): 195.

[4] 刘俊康, 郭 刚, 张守印, 等. 生物波理论的研究[J]. 中华微生态学杂志, 1994, 6(6): 456.

[5] Shapiro J A. Pattern and control in bacterial colony development[J]. Science Progress Oxford, 1992, 76(1): 399—432.

[6] 刘俊康, 徐启旺. 显微技术的研究[J]. 中国医学检验杂志, 1999, 22(3): 239—241.

[7] Costerton J W. Bacterial biofilms in nature and disease[J]. Ann Rew Microbiol, 1987, 41(1): 435—440.

[8] 徐启旺. 肠易激综合征的细菌潜生体发病机制[J]. 科学, 1998, 10(1): 59—61.

[9] Goldberger A L, Rigney D R, West B J. Chaos and fractals in physiology[J]. Sci Am, 1990, 262(2): 42—49.

[10] Gramer C, Runyon B A, Young S, *et al*. Intestinal bacterial overgrowth and bacterialtranslocation in cirrhotic rats with ascites[J]. Hepatology, 1997, 26(10): 1 372—1 379.

[11] Morales-Ruiz M, Jimenen W, Ros J, *et al*. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: A host response against bacterial peritonitis[J]. Gastroenterollgy, 1997, 112(12): 2 056—2 061.


(编辑 陈聪连)

(上接1417页)

组有2例病人发生MOF,MOF中均涉及有肾功能衰竭,经腹膜透析或血液滤过治疗后病人仍然死亡。因此对创伤患者应及早处理原发性损伤,及早治疗休克,防止MOF的发生。

### 3.4 及时发现腹部外的创伤

由于救治创伤明显的部位或入院时腹部外器官受损的临床表现不明显或被其它临床症状掩盖,常常遗漏诊断。本组有8例除发生腹部闭合性损伤外,还合并有颅内血肿5例,肺挫伤、血气胸3例,因此对创伤病人要想到多发性损伤的可能。

关键词: 闭合性损伤; 外科护理

中图法分类号: R473.6 文献标识码: B

参考文献:


[1] 黎 鳌 主编. 现代创伤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 756.

[2] 黎介寿, 吴孟超. 手术学普通外科卷[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 188.

[3] Baue A E, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome, multiple organ dysfunction syndrome, multiple organ failure: are we winning the battle[J]? Shock, 1998, 10(2): 79—89.


(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net