DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.028
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
1084 2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1084-03

小鼠脾切除对肠源性感染影响的实验研究

韩殿冰,陈维佩,郭光金,张天飞,张集建 (第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究小鼠脾脏在肠源性感染中的作用。方法 对脾切除或假脾切除的139只小鼠进行了以下观察:①小肠粘膜的病理变化;②组织的细菌培养和荧光标记菌的检测;③血浆内毒素、肠粘膜IgA与肠源性感染的关系。结果 脾切除动物近60 d内,小肠组织的细菌培养和荧光标记菌检测的阳性率极低,无统计学意义。90 d后,小肠组织的细菌培养和荧光标记菌检测的阳性率显著高于对照组,小肠粘膜出现了明显的病理变化,血浆内毒素水平升高,肠粘液IgA降低。结论 脾切除的后期引起了明显的肠道肠源性感染。因此,脾创伤时,应尽可能施行保留脾脏功能的手术。

关键词:脾脏;脾切除;内毒素;肠源性感染
中图法分类号:R574.03;R657.6 文献标识码:A

Study of enterogenic infection after splenectomy in mice

HAN Dian-bing, CHEN Wei-pei, GUO Guang-jin, ZHANG Tian-fei, ZHANG Ji-jian (Department of Applied Surgercal Anatomy and Operative Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the role of spleen in enterogenic infection in mice. Methods One hundred and thirty-nine Kunming-strain mice were splenectomized or sham-operated on. Then the following items were studied: ①pathologic changes of ileal mucosa. ②culture for bacteria and detection of the bacteria labeled with fluorescein in different organs. ③relationship of plasma level of endotoxin and IgA in intestinal mucus with enterogenic infection in different organs. Results Sixty days after splenectomy, the positive rate of the cultured bacteria and detection of fluorescein-labeled bacteria showed no statistical difference between the experimental group and the control. Ninety days after splenectomy, the positive rate of cultured for bacteria and detection of fluorescein-labeled bacteria was increased, the plasma level of endotoxin elevated, IgA in intestinal mucus decreased and detachment of intestinal epithelium and damage of intestinal villi were found. Conclusion The results suggest that significant intestinal bacteria translocation occurs 90 days after splenectomy. It is considered that a surgeon should try his best to preserve the spleen when he deals with patients with injured spleen.

Key words: spleen; splenectomy; endotoxin; intestinal infection

脾脏是人体最大周围淋巴器官,具有重要的抗感染功能,脾切除患者易患凶险性感染(Overwhelming postsplenectomy infection, OPSI)。脾脏对肝和肺(抗感染能力)的调控作用已有研究,脾切除后肺脏的清除细菌功能[1]和肝脏的杀菌功能[2]降低。脾脏是否对肠道也存在调控作用?文献上研究很少。为此,本课题通过观察脾切除对肠源性感染的影响,以探讨脾脏与肠道的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

昆明株健康小白鼠139只,体重20~30 g,随机分为以下2组,见表1。脾切或假脾切的动物活杀取材前8 h,于清醒状态

作者简介:韩殿冰(1969—),男,山东省临沂市人,硕士,医师,主要从事脾脏方面的研究,现在解放军89医院普外科工作,潍坊 261200。电话:(0536)8358989-34072

收稿日期:1999-12-21;修回日期:2000-07-26

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

下将胃管经口插入胃内, 注入 1.5% $NaHCO_3$ 0.25 ml, 1 min 后每 100 g 体重注入荧光标记的大肠杆菌菌液 1 ml(1×10^9 个/ml), 8 h 后活杀取材。

表 1　动物分组及各组动物数

Tab 1　General data of animal grouping

Group	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
Sham-Splenectomy(SS)	16	10	10	10	10	10
Splenectomy(S)	17	12	12	10	12	10

1.2　荧光标记大肠杆菌

普通琼脂平板上培养大肠杆菌, 无菌条件下用等渗盐水洗下, 加入异硫氰酸荧光黄, 搅拌、洗涤, 荧光显微镜下证实标记成功后, 稀释为浓度 1.0×10^9 个/ml, 备用。

1.3　小肠组织学观察

1.3.1　光镜　　石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.3.2　电镜　　采用常规透射电镜观察。

1.4　细菌转移率的观察

1.4.1　组织匀浆液的培养　　取肝、脾、肠系膜淋巴结无菌匀浆管中匀浆。0.1 ml 匀浆液接种到基础培养基, 37 ℃孵育 72 h 后观察, 有菌生长者为阳性, 无菌生长者为阴性。

1.4.2　荧光标记菌的检测　　取上述的组织匀浆液 1 滴涂于载玻片上, 荧光显微镜下观察, 有荧光标记菌者为阳性, 无荧光标记菌者为阴性。

1.5　血浆内毒素的测定

取心脏血约 0.3 ml 置于无热源肝素离心管中, 1 500 r/min 离心 15 min, 取 0.1 ml 血浆。采用动态凝胶浊度法, 根据凝胶形成的速度求得细菌内毒素的值。

1.6　粘液 IgA 的测定

取靠近回盲部长为 15 cm 的肠段, 等渗盐水反复冲净肠腔内容物, 用载玻片轻刮粘膜表面粘液至 Eppendorf 管, 加入 0.5 ml 0.01 mol/L PBS 充分混匀, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 采用夹心 ELISA 测定法测得肠粘液 IgA 的 D_λ 值。

1.7　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验, 并进行相关分析。

2　结果

2.1　回肠粘膜的病理变化

光镜、电镜观察结果: SS 组各时相点动物肠壁各层组织结构正常。S 组的动物, 在脾切除的早期肠壁组织结构大体与 SS 组的相似, 但随着时间的推移, 至脾切的后期(60 d 后), 肠粘膜病理改变已较明显, 见图 1、2。

2.2　组织的细菌培养情况

S 组在脾切除的早期组织偶培养出细菌, 但与对照组比较无统计学意义, 脾切除后期组织的细菌培养阳性率已显著高出对照组($P<0.01$), 见表 2。

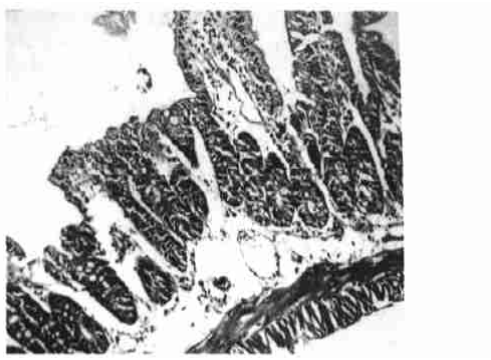


图 1　S组脾切后 90 d 小肠粘膜变化

上皮肿胀, 杯状细胞减少, 固有层内有散在炎性细胞　(HE× 210)

Fig 1　Changes of intestinal mucosa 90 d after splenectomy in S group

Epithelium swollened, goblet cells decreasd and inflammatory cells scatted in lamina propria　(HE× 210)

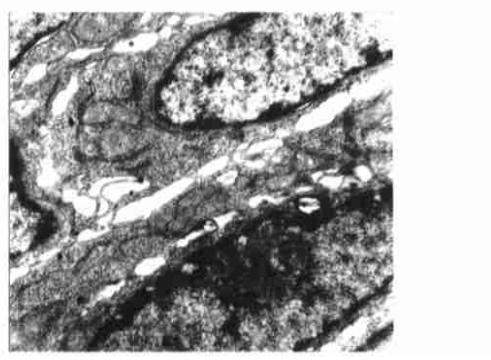


图 2　S组脾切后 120 d 肠粘膜柱状上皮间出现裂隙　(TEM× 10 000)

Fig 2　120 d after splenectomy, fissures appeared in columnar epithelium of intestinal mucosa in group S　(TEM× 10 000)

表 2　组织培养的细菌转移率(%)

Tab 2　Incidence of bacterial translocation detected by culture(%)

Group	Tissue	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
S	L	11.8	9.1	0	10	33.3△	30△
	MLN	5.58	8.33	0	20	41.7△	41.7△
SS	L	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
	MLN	0	0	0	0	0	0

L: Liver; S: Spleen; MLN: mesenteric lymph node; △: $P<0.01$ *vs* SS

2.3　荧光标记菌的检测

为了进一步验证肠道的移居, 以荧光标记的细菌喂饲小鼠, 检测组织中的荧光标记菌, 结果与组织培养的结果近似, 见表 3。

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

表3 荧光标记菌检测的细菌转移率(%)
Tab 3 Incidence of bacterial translocation detected by labeled bacteria(%)

Group	Tissue	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
S	L	17.6	16.7	9.1	20	33.3	33.3
	MIN	11.8	16.7	9.1	40	50△	50△
SS	L	0	0	0	10	0	0
	S	6.25	10	0	20	0	0
	MIN	12.5	10	10	10	10△	10△

△: $P<0.01$ *vs* SS

2.4 血浆内毒素的水平

S组动物在脾切除的早期血浆内毒素水平与SS组比较差异不显著,但随后显著升高,见表4。

2.5 小肠粘液 IgA 的变化

S组动物在脾切除的早期肠粘液 IgA 含量与SS组比较二者差异无显著性,但后期与对照组比较已显著降低,见表5。

表4 血浆内毒素水平($\bar{x}\pm s$, U/ml)
Tab 4 Level of the plasma endotoxin($\bar{x}\pm s$, U/ml)

	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
S	0.340±0.041	0.348±0.091	0.391±0.026	0.445±0.039	0.577±0.023△	0.568±0.030△
SS	0.313±0.024	0.335±0.078	0.327±0.013	0.332±0.046	0.317±0.014△	0.327±0.021△

△: $P<0.01$ *vs* SS

表5 肠粘液 IgA 的 D_λ 值($\bar{x}\pm s$)
Tab 5 D_λ value of immunoglobulin A in intestinal mucus($\bar{x}\pm s$)

	7 d	15 d	30 d	60 d	90 d	120 d
S	0.069±0.118	1.068±0.015	1.082±0.149	1.029±0.130	0.874±0.086△	0.886±0.047△
SS	1.139±0.137	1.141±0.085	1.159±0.103	1.146±0.075	1.132±0.062△	1.136±0.061△

△: $P<0.01$ *vs* SS

3 讨论

细菌通过肠粘膜屏障侵入血循环形成感染的过程,为肠源性感染。完整的肠粘膜是阻止肠源性感染的有效屏障,肠粘膜损伤所造成的肠道屏障系统通透性增加是肠腔内细菌侵入体内的直接原因。内毒素血症时内毒素可作用于小肠,特别是回肠下段,使肠粘膜结构发生病变,造成肠粘膜对肠道细菌通透性增加,引起肠源性感染[3]。本实验可看出,脾切除的早期血浆内毒素水平不高,肠粘膜未见有明显的病理变化,尽管有一过性的菌血症出现,但与对照组比较无统计学意义,没有出现明显的肠源性感染,脾切除的后期血浆内毒素水平明显升高,肠粘膜损伤严重,这样肠道细菌就可越过受损的肠粘膜,形成了肠源性感染。

在肠道特异性免疫系统中,体液免疫起主要作用,而在构成肠道体液免疫的多种成分中最主要的是sIgA[4]。sIgA 可以和肠道细菌特别是革兰氏阴性杆菌特异结合。由于肠道中的细菌移居者多为革兰氏阴性杆菌[5]。因此,sIgA 在肠道屏障中有着特殊的重要性。Albanese 等[6]应用大肠杆菌作为探针,在体外检查其穿越完整肠粘膜的情况,发现 sIgA 结合大肠杆菌后,可抑制大肠杆菌穿越肠粘膜组织。

本实验可看出,脾脏切除的后期,肠粘液 IgA 水平下降,肠道免疫屏障不能有效阻止肠道的细菌转移,结果形成了肠道细菌移居。这可能是由于脾脏通过其释放的免疫因子直接或间接影响、调节着肠道的免疫功能,当脾切除的早期,这种对肠道免疫功能的影响并未立即消失,肠道的免疫功能未明显的改变。所以,此时未引起明显的肠源性感染。随着时间的推移,脾脏对肠道免疫功能的影响逐步消失,肠道的免疫功能有所降低。所以,在脾切除的后期,肠道细菌转移率逐步升高。

综上所述,脾脏对肠道的肠源性感染确实有一定的影响,正如脾脏对肺、肝(抗感染能力)有调控作用一样,但其确切的调节机制尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 冷建军,陈维佩. 脾切除对肺内细菌清除和移位的影响[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(5): 294—295.

[2] Grapver G J, Loegering D J. Role of the liver in host defense to pneumococcus following splenectomy[J]. J Surg Res, 1984, 37(8): 448—452.

[3] Deich E A, Ma L, Ma J, *et al*. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice[J]. J Clin Invest, 1989, 84(1): 36—42.

[4] Alverdy J. The effect of glucocorticord administration on bacterial translocation[J]. Ann Surgy, 1991, 214(6): 719—723.

[5] 于 勇. 肠道屏障功能及其创伤后的变化[J]. 国外医学:军事医学分册, 1993, 10(4): 156—158.

[6] Albanese C T, Smith S D, Wakins S, *et al*. Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum *in vitro*[J]. J Am Coll Surg, 1994, 179(6): 679—682.

(编辑 薛国文)

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