DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.009
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
424 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0424-04

大鼠肠道缺血再灌注损伤后肠源性细菌/内毒素移位的初步研究

郑 江[1],郑瑞丹[2],屠伟峰[1],陈 军[1],肖光夏[1] ([1]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038;[2]解放军第175医院,漳州 363000)

提 要:目的 观察肠道I/R损伤对肠源性细菌/内毒素移位的影响。方法 采用夹闭肠系膜前动脉(时间60 min)技术复制肠道I/R损伤大鼠模型:①检测血浆内毒素水平(鲎试剂定量试验法)和肿瘤坏死因子(TNFα),②肠系膜淋巴结、肝、肺、肾组织匀浆进行细菌培养。结果 研究成功地复制了肠道I/R损伤大鼠模型,并观察到大鼠肠道I/R损伤可引起:①门、腔静脉血中内毒素水平明显升高(P均<0.01),门脉血浆内毒素显著高于腔静脉血($P<0.01$);②血浆TNFα在再灌注后3 h达峰值,明显高于缺血前水平(P均<0.01);③肠系膜各组淋巴结及肺、肝、肾组织匀浆均培养出细菌,且各组织中的细菌与回、盲肠腔内的优势菌分布相一致。结论 肠道I/R损伤可引起小肠、盲结肠的细菌/内毒素移位。

关键词:肠道;缺血再灌注损伤;细菌/内毒素移位
中图法分类号:R619.9 文献标识码:A

Preliminary study of enterogenous bacteria-endotoxin translocation after intestinal ischemia-reperfusion injury in rats

ZHEN Jiang, ZHENG Rui-dan, TU Wei-feng, CHEN Jun, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of intestinal ischemia-reperfusion injury on enterogenous bacteria and entotoxin translocation in rats. **Methods** Rat model of intestinal ischemis-reperfusion injury was estalished with the clamping of the superior mesenteric artery for 60 minutes and then the clamping was relieved. The plasma level of endotoxin and TNFα was determined with limulus amebocyte lysate test and redioimmunoassay respectively. Bacteria in the lumen of the ileum and cecum and in the mesenteric lymph nodes, lungs, liver and kidneys were cultured with different media. **Results** After ischemia-reperfusion injury, the plasma endotoxin level was significantly elevated in the caval and portal veins ($P<0.01$) and it was higher in the portal vein than in the caval veins ($P<0.01$). The plasma TNFα level reached the peak 72 hours after reperfusion and was significantly higher than the preischemic level ($P<0.01$). The culture of the homogenate of all the groups of mesenteric lymph nodes, the lungs, liver and kidneys was positive for bacteria which similar to the distribution of the dominant bacteria in the lumen of the ileum and cecum. **Conclusion** Intestinal ischemia-reperfusion can induce bacteria-endotoxin translocation from the ileum and cecum.

Key words: intestinal tract; ischemia-reperfusion injury; bacteria-endotoxin translocation

肠道血管收缩、血流低灌注在严重烧创伤的早期即可发生,是机体对重要脏器如心、脑、肾、肺的自我保护反应。由于肠道是体内最大的"储菌所"和"内毒素库",过度的血管收缩或长时间应用外源性缩血管物质、持续肠道低灌注可引起肠道严重缺血、缺氧性损害,导致肠道屏障功能降低,并因此使肠源性内毒素和

作者简介:郑 江(1961—),男,贵州省福泉市人,博士,副研究员,主要从事烧伤感染方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68753780

收稿日期:1999-12-17;修回日期:2000-03-07

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

细菌发生移位。本研究利用经典的夹闭肠系膜前动脉方法, 复制大鼠肠道缺血再灌注损伤(Ischemia-reperfusion injury, I/R)的模型[1], 以观察肠道 I/R 损伤对肠源性细菌/内毒素移位的影响。

1　材料与方法

1.1　实验动物

36 只健康 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 体重(320±30) g, 由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2　分组

36 只大鼠随机分为缺血前 30 min、缺血再灌注后 3、6、24、48 h 和 72 h 共 6 组(每组 6 只)。

1.3　模型制作

大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水。备皮后常规麻醉、消毒、铺巾, 上腹部沿正中线切口, 暴露并在根部游离肠系膜前动脉, 用小动脉夹夹闭 60 min, 松开肠系膜前动脉夹。在肠系膜前动脉夹闭期间, 间断地向腹腔内注射约 15～20 ml/kg 生理盐水, 以预防松开动脉夹后出现的一过性低血容量反应。关腹后再向腹腔内追加 25～30 ml/mg 生理盐水(内含 32 万 U 庆大霉素/L), 以达到扩容和预防腹腔手术时可能的污染。术毕放回饲养笼观察, 一鼠一笼, 自由进食、饮水。

1.4　样本采集和处理

取若干重肠系膜淋巴结和肺、肝、肾组织匀浆后进行需氧菌、厌氧菌真菌的培养。将肠系淋巴结分为 3 组: MLN1 主要收集来自盲结肠的淋巴液; MLN2 主要收集来自回肠的淋巴液; MLN3 主要收人订来自空肠的淋巴液。同时留取部分回肠、盲肠作腔菌群培养。

1.5　观察指标

1.5.1　一般观察　　包括大鼠的活动、饮食、饮水和精神状况, 以及大便颜色、性状等。

1.5.2　血浆内毒素测定　　鲎试剂定量试剂盒(上海医化所产品), 按操作说明书进行。

1.5.3　血浆 TNFα 测定　　放免试剂盒(北京福瑞生物有限公司产品), 按操作说明书进行。

1.5.4　组织细菌培养　　进行菌落记数和细菌分类。

1.6　统计学分析

所有计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 数据应用统计软件包 STATISTICA/W5.0 作方差分析、t 检验等。

2　结果

2.1　一般观察

GIR 模型大鼠第 1 天有轻微血便, 其余活动、饮食、饮水和精神状况未见异常, 实验全过程无一只大鼠死亡。

2.2　血浆内毒素的变化

大鼠肠道缺血 60 min 再灌注后, 门静脉、腔静脉血浆中内毒素即明显升高, 各时相点均明显高于缺血前水平; 门静脉血浆中内毒素水平又明显高于腔静脉血内毒素水平(P 均$<$ 0.01), 见图 1。门、腔静脉血的内毒素水平变化呈显著正相关($r=0.8925$, $P<0.001$)。

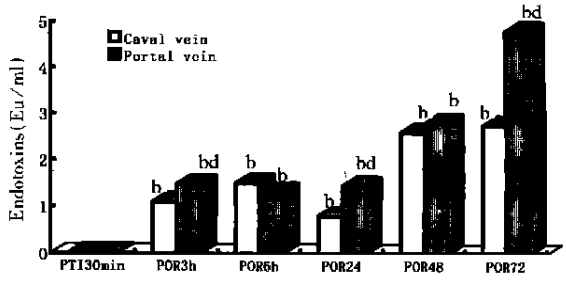


图 1　大鼠肠道 I/R 损伤对腔、门脉血血浆内毒素水平的影响

Fig 1　Influence of ischemia-reperfusion injury on plasma endotoxin concentration in vena cava and portal vein ($^{b}P<0.01$ *vs* PTI 30 min; $^{d}P<0.01$ *vs* GIR; PTI: before ischemic; POR: after reperfusion)

2.3　血浆肿瘤坏死因子(TNFα)的变化

大鼠肠道缺血 60 min 再灌注 3 h 后血浆 TNFα 水平明显升高, 持续到再灌注后 72 h, 见图 2。且与门、腔静脉血中的内毒素变化有显著相关性(r 值分别为 0.4107 和 0.4391, P 均$<$ 0.05)。

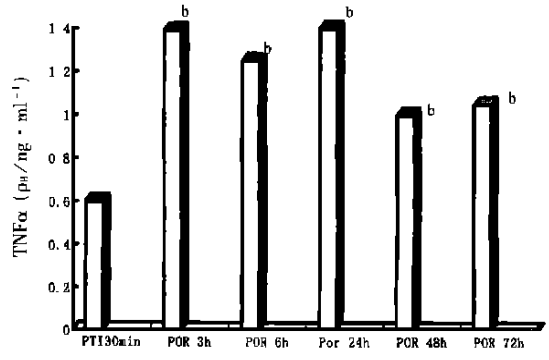


图 2　大鼠肠道 I/R 损伤对腔静脉血血浆 TNF-α 水平的影响

Fig 2　Influence of ischemia-reperfusion injury on plasma endotoxin concentration in vena cava and portal vein ($^{b}P<0.01$ *vs* PTI 30 min; PTI: before ischemic; POR: after reperfusion)

2.4　不同组织的细菌移位率

大鼠肠道缺血 60 min, 再灌注 3 h 后, MLNs 和肠道外脏器如肺、肝、肾即可培养出细菌, 与缺血前比较均有显著的统计学差异, 但未培养出厌氧菌和真菌, 见表 1。

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

表 1 大鼠肠道缺血再灌注损伤后组织细菌培养阳性率(%)

Tab 1 Bacteria culture positive rates in rats' intestines after ischemia-reperfusion injury(%)

	PTI 30 min	POR 3 h	POR 6 h	POR 24 h	POR 48 h	POR 72 h
MLN1	0/6(0.0%)	3/5(60.0%)[a]	4/6(66.7%)[a]	4/6(66.7%)[a]	4/6(66.7%)[a]	6/6(100.0%)[b]
MLN2	0/6(0.0%)	4/5(80.0%)[b]	6/6(100.0%)[b]	5/6(83.3%)[b]	4/6(66.7%)[a]	6/6(100.0%)[b]
MLN3	0.6(0.0%)	3/5(60.0%)[a]	3/6(50.0%)[a]	4/6(66.7%)[a]	4/6(66.7%)[a]	6/6(100.0%)[b]
Lung	0/6(0.0%)	3/5(60.0%)[a]	3/6(50.0%)[a]	4/6(66.7%)[a]	5/6(83.3%)[b]	6/6(100.0%)[b]
Liver	0/6(0.0%)	1/5(20.0%)	2/6(33.3%)	4/6(66.7%)[a]	4/6(66.7%)[a]	6/6(100.0%)[b]
Kidney	0/6(0.0%)	1/5(20.0%)	1/6(16.7%)	2/6(33.3%)	4/6(66.7%)[a]	6/6(100.0%)[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$ *vs* PTI 30 min, PTI: before ischemia; POR: after reperfusion; MLN: mesenteric lymph node

2.5 不同组织、回肠、盲肠腔菌群培养阳性的细菌分布 大鼠回、盲肠肠腔菌群谱基本一致;且从 GIR 模型大鼠的肠系膜淋巴结、肺、肝和肾组织中培养出的细菌与回、盲肠肠腔菌群的优势菌分布相一致,见表 2。

表 2 回肠和盲肠腔菌群及不同组织细菌培养阳性的细菌分布

Tab 2 Cavity flora of ileum and appendix and distribution of different tissue bacteria culture

	LFI (n=30)	LFC (n=25)	MLN1 (n=39)	MLN2 (n=39)	MLN3 (n=39)	Lung (n=30)	Liver (n=30)	Kidney (n=30)
Escherichia Coli	19	18	17	23	15	15	18	15
Other's Enterobacter	4	4	4	3	1	3	0	0
Corynebacterium	1	1	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus	13	13	3	4	4	4	4	2
B. Melaminogenicus	15	15	0	0	0	0	0	0
Veillonella	4	8	0	0	0	0	0	0
Other's Aanaerobic	4	4	0	0	0	0	0	0
Bacillus	0	1	0	0	0	0	0	0
Proteus	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeast	13	14	0	0	0	0	0	0
Hemolytic Streptococci	0	0	1	1	1	0	0	1
P. Aeruginosa	0	1	0	0	0	0	0	0

LFI: Flora in ileum; LFC: Flora in appendix; MLN1, MLN2 and MLN3 means 1st, 2nd and 3rd group mesenteric lymph node

3 讨论

本研究结果表明,利用经典的夹闭肠系膜前动脉方法,复制大鼠肠道缺血再灌注损伤 GIR 模型是成功的。

肠道作为体内最大的"储菌所"和"内毒素库",在肠道屏障功能(包括机械屏障、生物屏障以及免疫屏障)一旦损伤的前提下,内毒素和细菌即可大量侵入,导致多种炎症介质的过度释放,引发或加重失控性炎症反应综合征(Systemic inflammatory respones syndrome. SIRS),而 SIRS 的发生更加重肠道的损伤,形成一种恶性循环,最终导致 MODS 甚至死亡。

本实验结果显示肠道缺血再灌注损伤后血液中的 TNFα 水平与门、腔静脉血血浆中的内毒素变化有显著正相关性,进一步证明肠道缺血再灌注损伤可使肠腔内的内毒素经门静脉向肠道外组织和器官移位,而进入血液中的内毒素则刺激单核-吞噬细胞系统释放细胞因子如 TNFα 等。

细菌学检查发现,回、盲肠肠腔内菌群谱大致相似;在肠道缺血再灌注损伤后各组肠系膜淋巴结和肠道外脏器如肺、肝、肾组织培养出的细菌主要为大肠杆菌和球菌类,与回肠、盲肠肠腔内群菌中优势菌基本一

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

致; 这些结果提示肠道缺血再灌注损伤后肠系膜淋巴结和肠外脏器组织中移位的细菌主要来源于肠道, 且通过肠系膜淋巴结可能是肠源性细菌移位的重要途径, 与以往的研究结果相符[3,4]。

值得一提的是, 我们采集来自不同肠段的淋巴结标本, 进行细菌培养结果表明肠道缺血灌注损伤后, 组织中的移位细菌除可来源于回肠外, 尚可来源于盲结肠, 而不是如以往认为的仅来源于小肠, 拓宽了肠源性感染病原菌来源的范围。

参考文献:

[1] Horton J W, White D J. Cardiac contractile injury after intestinal ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol, 1991, 261(4 Pt 2): 1 164—1 170.

[2] Gautreaux M D, Deitch E A, Berg R D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex[J]. Infect Immun, 1994, 62(5): 2 132—2 134.

[3] Koike K, Moore E E, Moore F A, *et al*. Phospholipase A2 inhibition decouples lung injury from gut ischemia-reperfusion[J]. Surgery, 1992, 112(2): 173—180.

[4] Rossman J E, Caty M G, Zheng S, *et al*. Mucosal protection from intestinal ischemia-reperfusion reduces oxidant injury to the lung[J]. J Sury Res, 1997, 73(1): 41—46.

(编辑　王　红)

(上接 423 页)

血象: HGB 70 g/L, WBC 2.8× 10^9/L, N 0.48, L 0.52, PLT 27× 10^9/L, 重新开始服用 CsA 300 mg/d, 30 周时血象 HGB 82 g/L, WBC 3.2× 10^9/L, PLT 78× 10^9/L。38 周时血象恢复正常, 维持用量一月后开始减量, 现已减至 100 mg/L。

例 2: 男性, 17 岁, 主诉乏力 2 月, 根据临床表现、血象、骨髓象及其它检查, 诊断: AA。给予再障生血片、康力龙、CsA300 mg/d, (6 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)。6 周后只服 CsA。8 周时不需输血及血小板。20 周时血象恢复正常, CsA 减量至 240 mg/d。28 周时在当地医院检查发现肝功(具体不详)异常, 自行停药。32 周时因受凉、劳累后出现咽痛和发热, 查血象: HGB 87 g/L, WBC 1.5× 10^9/L, PLT 66× 10^9/L, 提示: AA 复发。予以抗生素和 CsA 300 mg/L治疗。42 周时血象恢复正常, 现仍用 CsA 300 mg/d 治疗中。

2　讨论

此两例 AA 患者, 经用 CsA 与其它药物联合治疗后, 均取得血液学完全缓解, 停药后 4~6 周后又出现全血细胞减少, 之后单用 CsA 又取得血液学完全缓解, 均符合环孢菌素依赖型再生障碍性贫血诊断标准[1]。环孢菌素依赖型再生障碍性贫血占 CsA 治疗有效 AA 的 50%, 应引起重视。

这 2 例均为男性, Bern 报告的 1 例为女性[2], Nakao 的 13 例中有 10 例为男性[1], 似乎男性更为多见。此 2 例病人年龄分别是 14、17 岁, 文献报告的年龄 18~65 岁不等, 似乎与年龄无关。复发时以白细胞和血小板下降明显, 因此, 尤应注意减量或停用 CsA4 周后白细胞和血小板的波动。

引起 CsA 依赖的因素、机制尚不清楚。日本学者发现 CsA 依赖与患者 HLA-Ⅱ类 DRB *1501—DQA1 *0102—DQB1 *0602 基因有关[1]。有该基因且对 CsA 治疗有效的 AA 患者均为 CsA 依赖, 有此基因的患者对 CsA 治疗的有效率为 71%。能否避免引起 CsA 依赖, 如逐渐减量、慎重停药、延长 CsA 使用时间[3]、其它药物如糖皮质激素、ATG/ALG 等治疗方法仍有待研究。

CsA 对糖皮质激素、雄激素、ATG/ALG 治疗无效的 AA 患者仍有效。其作用机制是抑制 T 淋巴细胞 IL-2 的产生。再次应用 CsA 治疗仍有效, 支持 AA 患者的骨髓衰竭是由免疫机制介导的, 此类病人亦是研究 AA 发病免疫机制的理想模型。

关键词: 贫血; 再生障碍性; 环孢菌素依耐
中图法分类号: R556.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, *et al*. Identification of a specific HLA class Ⅱ haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia[J]. Blood, 1994, 84(12): 4 257—4 261.

[2] Bern M M, Roberts M S, Yoburn D. Cyclosporin treatment for aplastic anemai: A case report demonstrating a second response to second exposure to cyclosporin[J]. Am J Hematol, 1987, 24(3): 307—309.

[3] 张茂宏. 严重型再生障碍性贫血的药物治疗[J]. 中华血液学杂志, 1997, 18(4): 171—172.

[4] Nakao S. Immune mechanism of aplastic anemia[J]. Int J Hematol, 1997, 66(2): 127—134.

(编辑　张大春)

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