DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.007

放射损伤合并烧伤肠源性感染发生特点的实验研究*

艾国平** 粟永萍 刘晓宏 王军平 程天民 (第三军医大学预防医学系防原教研室全军复合伤研究所)重庆, 400038

提 要 目的: 探讨放射损伤合并烧伤肠源性感染的特点及其复合效应。方法: 采用小鼠15% Ⅲ度烧伤、8 Gy放射损伤及两伤复合的动物模型,用^{3}H-TdR标记大肠杆菌,喂饲小鼠,分别于伤后1~96 h,9个时相点检测肝、脾、肠系膜淋巴结的dpm值△。结果:① 三类损伤后均发生了肠道细菌移居,但定植于肠道的标记菌进入组织的量和达峰值的时间不尽一致。单烧、复合伤肠道细菌移居发生早(4 h),单放稍晚(6 h),说明烧伤在早期肠道细菌移居中占主要地位;伤后6 h,单烧和复合伤达峰值,而单放于伤后12 h细菌移居达峰值;随后细菌移居逐渐减少,到96 h单烧肠道细菌移居已不明显,而此时单放和复合伤仍很严重。② 单放和复合伤细菌移居的程度重,以复合伤最重,dpm值大于单一伤,但小于两伤之和,即"1<1+1<2"。结论: 复合伤动物与两单伤比较,肠道细菌移居具有发生早、程度重、恢复慢的特点,防治时应予重视。

关键词 灼伤;辐射损伤;放烧复合伤;肠道细菌移居

中图法分类号 R818.7

肠道是一个有菌的环境。大量研究证实[1~4],烧伤后肠腔面有细菌粘附,小肠绒毛上皮细胞灶性变性坏死,细胞间紧密连接松懈,通透性增加,肠道粘液中IgA含量降低等改变,继发肠源性感染,并认为其中肠上皮机械屏障和粘膜免疫屏障损害在烧伤后肠源性感染发生中占主要地位。肠上皮细胞和肠道淋巴细胞均对辐射高度敏感,在放射损伤合并烧伤这样一个特定的损伤条件下,肠道细菌移居又有什么特点?复合效应怎样?为阐明上述问题我们进行了以下实验。

1 材料与方法

1.1 动物分组及致伤方法

共选用昆明种健康雄性小鼠168只(本校动物所提供),体重20~25g,观察确认健康后方进行实验。随机分设以下组:① 单纯放射损伤组(单放组,R):钴-60-γ射线8 Gy全身一次性照射,照射距离1.5 cm,照射剂量率为56.3~58.2 cGy/min;② 单纯烧伤组(单烧组,B):动物背部剪毛,按公式S=0.0913×T(kg)(2/3)计算体表面积[5],用3%凝固汽油燃烧7 s致15% Ⅲ度烧伤(经病理检查证实),伤后立即腹腔注射1 ml无菌生理盐水抗休克;③ 放烧复合伤组(放烧组,C):以上两伤复合,于30 min内先烧后照;④ 正常对照组(对照组,N)。

1.2 动物分布及检测时相

各组动物数的分布及时相点的检测见表1。

表1 实验动物分布及检测时相

Tab 1 The number of animals in different times

Groups	Time post-injury(t/h)								
	1	4	6	12	18	24	48	72	96
N	7								
B	5	5	5	5	6	7	8	7	5
R	5	5	5	6	6	8	8	7	5
C	6	5	5	6	6	6	8	6	5

1.3 观察指标和方法

1.3.1 大肠杆菌来源及^{3}H-TdR标记方法 小鼠8 Gy全身一次性照射后6 h,无菌取肠系膜淋巴结匀浆约0.1μl,在麦康凯培养基划板,37℃培养24 h,挑取单个红色菌落,经生化反应鉴定为肠道移居的大肠杆菌。置100 ml LB培养基中,加入^{3}H-TdR 20μCi(终浓度为0.2μCi/ml),37℃,200 r/min,培养至D值为1时,收集细菌,用生理盐水反复洗涤,尽量洗去未标记上的^{3}H-TdR,并用液闪仪分别检测每次洗后上清的dpm值△,证实上清的dpm值接近本底后,用生理盐水稀释至1×10^9个细菌/ml,放射活度约为215630 dpm,放置4℃冰箱备用(24 h内使用)。

1.3.2 标记菌在肠道定植的检测 将标记菌0.5 ml/只灌胃,灌胃后3、6、12、24、48、72、96 h收集粪便,研磨后用液闪法(详下)测dpm值,了解标记菌何时进入肠道,在肠道中是否能定植。

1.3.3 取材制样及液闪测定方法 小鼠致伤后于不同时相

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670289

** 艾国平,女,27岁,助教,硕士

△ dpm现已不用,1 dpm=60 Bq

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

分批放血活杀,取肝、脾、肠系膜淋巴结测定 dpm 值,具体方法如下[6]:

1.3.3.1 取肝、脾、肠系膜淋巴结称重,置 5 ml试管内。

1.3.3.2 按 0.1 g组织加入 60% 过氯酸 0.2 ml, 30% 过氧化氢 0.4 ml,混匀。

1.3.3.3 置 70℃~ 80℃水浴锅消化 40~ 60 min,致样本为无色透明或淡黄色。

1.3.3.4 取样品 100μl加入闪烁液 10 ml(每个样品作复管),采用均相法,用 Bekman液体闪烁计数器测 dpm值。

1.3.3.5 闪烁液配方: 0.5% PPO, 0.05% POPOP溶于二甲苯中,再加入 60: 1的乙二醇乙醚。

1.4 统计学处理

采用双因素方差分析和均数间的显著性差异检验。

2 实验结果

2.1 灌胃后肠道细菌定植情况

灌胃后 3 h每克粪便的 dpm 值为 99321.5, 6 h为 136044.2, 12 h 为 125860.7, 24 h 为 133522.8, 48 h 为 155249.7, 72 h为 128507.8 分析认为,灌胃后 6~ 72 h标记菌通过粪便排出量差异不显著,表明在 72 h内标记菌已在肠道定植; 6 h标记菌在肠道已达相对稳定数量,故正式实验定为动物活杀前 6 g灌给标记菌。

2.2 单放、单烧及放烧后标记菌经肠道进入组织情况

三种损伤后,定植于肠道的标记大肠杆菌进入组织的量和达峰值的时间不尽一致。如图 1、2、3所示,伤后 4 h单烧和放烧肠道细菌移居已发生,放烧细菌移居累及肠系膜淋巴结和脾脏,单烧仅局限于肠系膜淋巴结,此时单放肠道细菌移居还不明显。伤后 6 h,三伤组肠道细菌移居均明显,单烧和放烧达峰值,其中以放烧最为严重,标记菌的 ^{3}H-TdR dpm 值大于单一伤,小于两伤之和,即"1 < 1+ 1 < 2",单放细菌移居达峰值时间为伤后 12 h;到 96 h,单烧细菌移居明显减轻,单放和放烧虽有所减轻,但与正常对照比较差异仍非常明显 (P < 0.01)。损伤后各脏器的肠道细菌移居量也不尽一致,肠系膜淋巴结首当其冲,其次为脾脏、肝脏。

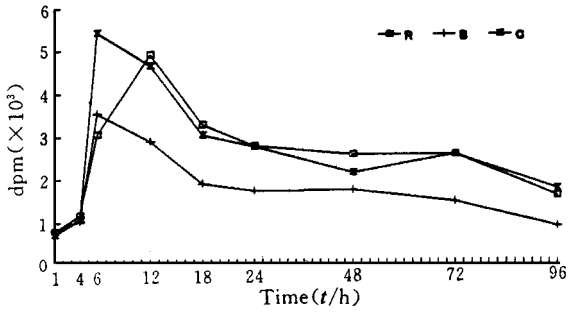


图 1 伤后标记菌在肝脏的 dpm值

Fig 1 Change of the labeled bacteria dpm values in liver postinjury

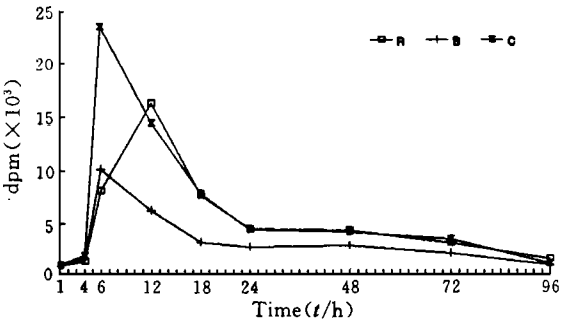


图 2 伤后标记菌在肠系膜淋巴结的 dpm值

Fig 2 Change of the labeled bacteria dpm values in MLN postinjury

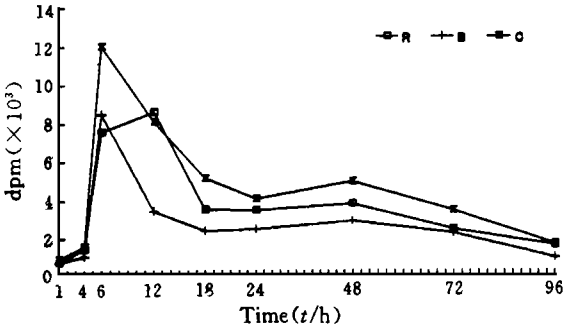


图 3 伤后标记菌在脾脏的 dpm值

Fig 3 Change of the labeled bacteria dpm values in spleen postinjury

3 讨论

3.1 ^{3}H-TdR标记大肠杆菌及在肠道定植

3.1.1 关于 ^{3}H-TdR标记大肠杆菌 用 ^{14}C标记大肠杆菌已有报道[7],是碳元素掺入细菌含碳分子而使细菌带上同位素标记。设想取放射损伤后肠系膜淋巴结培养的大肠杆菌菌落进行体外培养,在培养体系中加入 ^{3}H-TdR,细菌分裂增殖前必然有 DNA的合成, TdR又是合成 DNA的必需物质,因此分裂后的细菌必然会摄入 ^{3}H-TdR,也即是带上了同位素标记。检测 15× 10^9个细菌,放射活度达 215630 dpm,表明用 ^{3}H-TdR标记大肠杆菌是成功的。

3.1.2 关于标记菌在肠道定植 以此标记菌灌胃,进入肠道的标记菌,如果不能在肠道定植,则在短期内 (1~ 2 d内)随粪便排除。本实验证实,灌胃后 6~ 72 h,粪便中的标记菌持续量多且稳定,取肠腔内容物测定的标记率也很高,说明经灌胃后的标记菌可在肠道定植 (本实验条件下 72 h内),测定各脏器中的同位素值可反映肠道细菌移居情况。

3.1.3 关于误差的控制 从理论上分析,正常情况

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

下,由于肠道特有的屏障功能[8],肠腔的标记菌不会到达组织中,但实际测得,对照组的 dpm值也较高,这很可能是由于标记菌经灌胃后,在胃酸作用下,小部分标记菌被杀灭,菌体分解,小分子的^{3}H-TdR游离而被肠上皮吸收进入组织脏器中,故显示一定的同位素量,因此本实验仍测定了正常对照组的 dpm值作参照,以减少实验误差。

3.2 肠道细菌移居的特点及复合效应

单烧和放烧肠道细菌移居发生早(4 h),单放稍晚(6 h),说明烧伤在早期肠源性感染中占重要地位。但单放和放烧肠道细菌移居的程度比单烧重,恢复慢,到96 h单烧肠道细菌移居已不明显,而此时,单放和复合伤细菌移居仍很严重,复合伤的肠道细菌移居大于单一伤,但小于两伤之和。分析认为,8 Gy照射复合15%Ⅲ度烧伤的复合伤与两单伤比较,肠源性感染具有发生早、程度重、恢复慢的特点,防治时应予重视。

肠上皮及肠道淋巴组织均对辐射高度敏感,与单纯烧伤比较,单放和相应放烧后肠上皮损伤更为严重,绒毛上皮坏死脱落后造成上皮屏障"缺口",细菌易于入侵;细菌粘附后释放的蛋白水解酶及毒性物质,可溶解局部细胞器,加重肠上皮细胞的损伤;并且射线可抑制肠隐窝细胞增殖,这对肠上皮修复极为不利;加之射线对免疫功能的严重抑制,浆细胞数量明显减少,IgA含量分泌严重不足,肠源性感染非常严重。损伤后促进肠上皮修复和调控粘膜免疫,对恢复肠道功能和防治肠源性感染是有利而必需的。

参考文献

1 粟永萍,程天民.烧伤时小肠粘膜病变的实验研究.见:黎鳌 主编.烧伤研究.重庆:重庆出版社,1985.286~289

2 马　利,肖光夏.肠源性感染的实验研究.第三军医大学学报,1990,12(1):1

3 白晓东,粟永萍,刘贤华.严重烧伤后粘液成伤的改变及其与肠源性感染的关系.中华整形烧伤外科杂志,1996,12(2):90

4 Cappeler W A. Reduction in biliary IgA after burn injury. Am Surg,1992,25(4):338

5 施新猷.医学动物实验方法.北京:人民卫生出版社,1979.24~28

6 叶维新,程绍钧.实验核医学技术.长春:吉林科学技术出版社,1991.234~235

7 Wesley J. Distribution and survial of Escherichcia coil translocation from the intestine after thermal injury. Ann Surg,1991,213(6):558

8 于　勇.IgA在肠道免疫屏障中的作用及其创伤后的改变动.国外医学:创伤与外科基本问题,1994,15(1):15

(收稿:1997-05-26;修回:1997-09-17)

(编辑　冷怀明)

Characterization of enterogenous infection after combined irradiation-burn injury in mice*

Ai Guoping, Su Yongping, Liu Xiaohong, Wang Junping, Cheng Tianmin (Research Institute of Combined Injury, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the characteristics and combined effects of enterogenous infection after irradiation combined with burns. Methods: After the models of 15% TBSA full thickness skin burns (group A), 8Gy irradiation injury (group B) and combined irradiation-burn injury (group C) were established in mice, the ^{3}H-TdR-labeled E. coli was fed to the animals. The dpm values of the liver, spleen mesenteric lymph nodes were measured at 8 time phases from the 1st to 96th hour after the injuries. Results: 1) Bacterial translocation occurred after all the three kinds of injuries, but the volume of the bacteria entering the intestinal tissue and the time for it to reach the peak value were different among the three groups. The translocation occurred earlier in groups A and C than in group B. The time of bacteria entering the intestinal tissue reached its peak value at the 6th hour after injuries in groups A and C but at the 12th hour after injury in group B. At the 96th hour after injuries, the bacterial translocation was significantly decreased in group A but still severe in groups B and C. 2) Although the dpm value in group C was less than the sum of the two in groups A and B, it was significantly higher than the two separately. Conclusion: Bacterial translocation is characterized by early occurrence, severe damage and slow recovery.

Key words burns; irradiation; combined irradiation-burn injury; bacterial translocation; combined effect; mouse

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39670289

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