DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.05.002

脂质过氧化在严重烫伤后肠源性感染发病机制中的作用

彭毅志 肖光夏 王德旺 张雅萍 秦孝建 （西南医院 烧伤研究所）

提 要 本实验共用大鼠186只（体重180～220g）随机分为5组：正常对照，单纯肠道给菌，单纯烫伤，烫伤加肠道给菌，烫伤加肠道给菌并给予超氧化物歧化酶（SOD）治疗。管饲细菌为绿脓杆菌，均以异硫氰荧光素标记以便示踪，同时观察烫伤后回肠粘膜内脂质过氧化产物丙二醛（MDA）含量，回肠粘膜病理改变和肠道内细菌移位的动态变化。结果表明：给菌烫伤组和单烫组肠粘膜MDA含量显著高于单菌组和正常组，伤后12h达高峰；光镜和电镜观察发现，伤后24和48h病理改变较严重；给菌烫伤组肝脏和血流中标记绿脓杆菌检出数或检出率显著高于单菌组。应用超氧化物歧化酶（SOD）后，回肠粘膜MDA显著下降，病理改变明显减轻，肝脏内标记绿脓杆菌的检出数和检出率均降低，血培养未发现标记绿脓杆菌。本研究提示：严重烫伤后，回肠粘膜产生大量氧自由基，发生脂质过氧化作用与回肠粘膜屏障破坏有关，是引起肠道内细菌向深部器官播散的原因之一。应用SOD对保护肠粘膜屏障，减轻肠源性感染有一定作用。

关键词 烧伤；肠源性感染；脂质过氧化；丙二醛；超氧化物歧化酶

近年来，有学者证实了小肠缺血后再灌流时，产生大量氧自由基，引起脂质过氧化，可导致肠粘膜损伤和血管通透性增高[1]。但脂质过氧化在烫伤后肠粘膜病理变化和肠源性感染中的作用，未见报道。本实验采用直接标记的绿脓杆菌作为示踪，管饲大鼠。观察烫伤后回肠粘膜内脂质过氧化产物丙二醛（MDA）含量，回肠粘膜的病理和肠道内细菌移位的动态变化；然后应用超氧化物歧化酶（SOD），观察SOD在肠粘膜损伤和肠道细菌移位方面，有无保护作用。结果提示严重烫伤后肠道脂质过氧化产物MDA增高，肠粘膜屏障破坏明显，SOD在肠源性感染中具有一定的保护作用。

材 料 与 方 法

健康（Wistar）大白鼠，体重180～220g，共186只，雌雄各半，随机分为5组（见表1）。

表1 动物分组及各时相点动物数

分 组	伤后（h） 4	12	24	48	72
给菌烫伤组（BP）	10	10	10	10	9
单菌组（SP）	9	10	10	10	9
单烫组（SB）	10	10	10	10	9
SOD用药组（BPT）		10	10	10	
正常组（N）			10		

SOD用药组（BPT）：烫伤前10min肌注SOD（上海生物化学研究所产）15000u/kg，伤后1次/6h。

标记细菌

将IX型绿脓杆菌接种于血平板37℃24h，无菌生理盐水洗脱，测得菌液浓度为10^9cfu/ml，等量加入磷酸氢二钠－柠檬酸缓冲液（pH 5），异硫氰荧光素（德国产）20μg/ml，4℃搅拌12h。无菌生理盐水清洗，菌液浓度为10^9cfu/ml，4℃保存，使用1周。

动物模型

单笼饲养1周，禁食8h，清醒状态下将胃管经口插入胃内，注入1.5%$NaHCO_3$ 1ml，1min后再注入菌液（1ml/100g），自由进食，8h后，1%戊巴比妥钠（3mg/100g）腹腔麻醉，背部电推剃毛，置剃毛区于92℃水中18s，造成30%TBSA II度烫伤，立即腹腔注入无菌生理盐水（3ml/100g）。单笼饲养，自由进食。

观察指标

1. 回肠粘膜MDA测定：刮取回肠粘膜，制成10%组织匀浆，按Ohkama氏法[2]测定回肠粘膜MDA含量，用nmol/mg蛋白表示；2. 光镜和电镜观察：取回肠分别处理后，进行光镜和透射电镜观察；3. 标记IX型绿脓杆菌在肝脏的检出：取肝脏制成10%组织匀浆，铂环（6μl）取样于玻片上，在荧光显微镜（×1000）下观察10个视野计

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数，以个/视野表示；4．血培养：37℃培养7天，无菌生长为阴性；有菌生长，经鉴定为IX型绿脓杆菌，并在荧光显微镜下观察到标记菌方为阳性。

采用本校数学教研室的医用数理统计程序包中的单因素及双因素方差分析程序计算。

结　　果

一、大鼠回肠MDA含量变化

给菌烫伤组和单烫组伤后4 h肠粘膜MDA就高于正常组，12h达高峰，72h仍高于正常对照组；单菌组各时相点也高于正常组，但无统计学意义；SOD用药组各时相点与正常组无显著差异（表2、3）。

给菌烫伤组与单菌组之间有显著差异（$P<0.001$），在伤后4、12、24、48h均显著高于单菌组（$P<0.05\sim0.001$）（表2）。

表2　大鼠回肠MDA含量变化（nmol/mg蛋白）

伤后（h）	给菌烫伤组（BP）	单菌组（SP）	单烫组（SB）
4	$1.736\pm0.361^{*}_{\Delta}$	1.208 ± 0.191	$1.502\pm0.210^{**}$
12	$5.175\pm1.077^{***}_{\Delta\Delta\Delta}{}^{+++}$	1.091 ± 0.255	$3.905\pm0.526^{***}_{\Delta\Delta\Delta}$
24	$4.165\pm0.818^{***}_{\Delta\Delta\Delta}{}^{+++}$	1.185 ± 0.258	$2.403\pm0.578^{***}_{\Delta\Delta\Delta}$
48	$1.634\pm0.350^{*}{}^{+}$	1.053 ± 0.222	1.067 ± 0.363
72	1.203 ± 0.191	1.287 ± 0.348	1.205 ± 0.173
正常组	1.002 ± 0.213		

$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$与正常组比

$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$与单菌组比

$^{+}P<0.05$，$^{+++}P<0.001$与单烫组比

单烫组伤后4 h高于单菌组，伤后12、24h显著高于单菌组（$P<0.001$），两组之间有显著差异（$P<0.001$）（表2）。

给菌烫伤组伤后12、24、48h显著高于单烫组（$P<0.001$）；两组之间有显著差异（$P<0.001$）（表2）。

SOD用药组各时相点均显著低于给菌烫伤组（$P<0.01\sim0.001$）；两组之间有显著差异（$P<0.001$）（表3）。

表3　BP组和BPT组回肠MDA含量变化（nmol/mg蛋白）

伤后(h)	给菌烫伤组(BP)	SOD用药组(BPT)
12	$5.175\pm1.077^{***}_{\Delta\Delta\Delta}$	0.904 ± 0.210
24	$4.165\pm0.818^{***}_{\Delta\Delta\Delta}$	0.854 ± 0.211
48	$1.634\pm0.350^{\Delta*}$	0.869 ± 0.198
正常组	1.002 ± 0.213	

$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$与正常组比

$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$与SOD用药组比

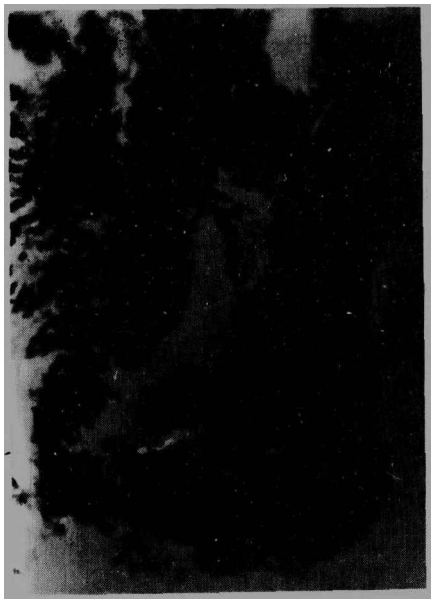
给菌烫伤组的高峰在伤后12h，单菌组4～72h无明显高峰，而单烫组的高峰也在12h，说明烫伤是回肠MDA上升的主要原因。

二、回肠粘膜的病理变化

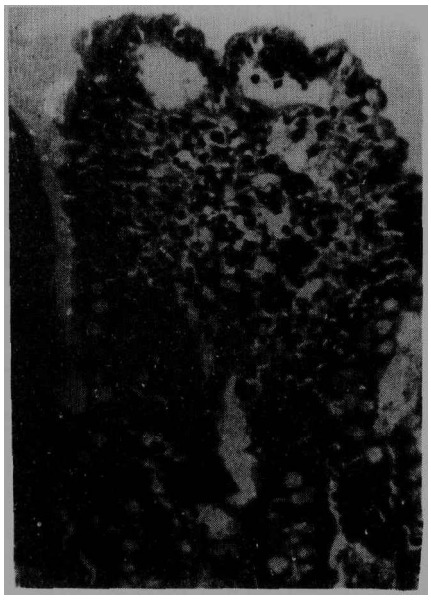
1．光镜观察所见

正常对照组动物回肠粘膜的组织学未见明显变化。给菌烫伤组伤后4 h回肠粘膜上皮细胞与固有层分离，出现上皮下（Gruenhagen氏）间隙，中性粒细胞（PMN）浸润，乳糜管和毛细血管扩张，瘀血，固有层水肿；伤后12h肠上皮纹状缘排列紊乱，上皮下间隙明显扩大，PMN浸润增加，有核碎片，瘀血，乳糜管极度扩张，部分绒毛顶部坏死，细胞结构消失，呈均质红染网状；伤后24和48h分离的绒毛上皮细胞层剥脱，固有层裸露，坏死缺损，形成溃疡（图1），并有大量PMN浸润，乳糜管扩张；伤后72h，仍可见上皮下间隙，PMN浸润，毛细血管和乳糜管扩张，但病变较前减轻，无绒毛上皮层剥脱。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1 BP组伤后48h回肠绒毛固有层坏死缺损，形成溃疡。大量PMN浸润，乳糜管扩张。HE×600



2 BPT组伤后24h 回肠粘膜绒毛上皮下间隙局限上绒毛顶部。HE×600

单烫组伤后4h也出现了上皮下间隙，乳糜管与毛细血管扩张，瘀血，病变以伤后24、48h为重，上皮细胞剥脱，固有层缺损，但PMN浸润比BP组少，病变较BP组轻。

单菌组各时相点均不同程度的上皮细胞与固有层分离，固有层显水肿、PMN浸润、乳糜管扩张、瘀血，但无缺损，病变明显比给菌烫伤组轻。

SOD用药组，上皮下间隙局限上绒毛顶部（图2），PMN浸润减少，乳糜管扩张和毛细血管瘀血明显减轻，无上皮细胞层剥脱和坏死。

2．电镜观察所见

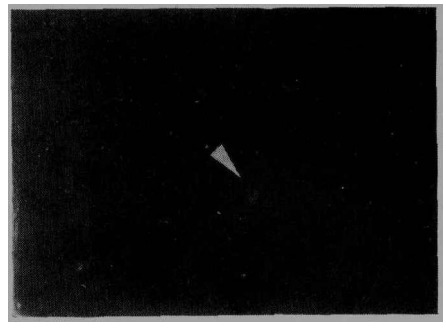
正常对照组动物回肠粘膜的超微结构未见明显



图3 BP组伤后24h回肠粘膜上皮细胞连接分离(→)，内有髓样体。×7000

变化。给菌烫伤组，单烫组，单菌组和SOD用药组回肠绒毛上皮细胞均有程度不同的内质网和高尔基氏体扩张，线粒体肿胀或固缩，核周间隙轻度扩张，以给菌烫伤组为重，细胞核染色质未发现明显病理改变。

给菌烫伤组和单烫组伤后1h至48h回肠粘膜屏障的病理改变进行加重，微绒毛电子密度减低、变短、松散、出现裂隙、溶损和溶解，肠上皮细胞间连接分离，内有髓样体（图3）。给菌烫伤组伤后24h出现上皮细胞坏死，所形成的上皮屏障缺损，与上皮下血管相通，给菌烫伤组伤后48小时毛细血管内皮细胞胞浆空泡样变明显增大，致使毛细血管腔几乎闭塞，伤后72h病理改变较前减轻。



4 BP组伤后24h肝门浆中检出抗IgG型及脱白蛋（→）。×3000

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单菌组可见微绒毛电子密度减低，上皮细胞间连接轻度分离，病理变化明显比给菌烫伤组和单烫组轻。

SOD用药组也可见微绒毛电子密度减低和上皮细胞间连接分离，未见微绒毛缺损，溶解，上皮细胞间裂隙和毛细血管微绒毛，病变明显比给菌烫伤组减轻。

病理观察表明：给菌烫伤组的病变高峰在伤后24～48h，单菌组无明显高峰，单烫组也在24～48h，说明烫伤是引起肉肠粘膜损害的主要原因。

三、肝脏匀浆中标记IX型绿脓杆菌的检出（图4）

给菌烫伤组各时相点肝脏标记绿脓杆菌的检出数均高于单菌组，两组相比有显著差异（$P<0.001$），在伤后12、24、48、72h相差显著（$P<0.05\sim0.01$）；检出率均高于单菌组，在伤后24、48、72h相差显著（$P<0.05\sim0.01$）（表4）。

表4　肝脏荧光标记IX型绿脓杆菌检出情况

伤后（h）	给菌烫伤组		单菌组		SOD用药组	
	检出数	检出率（%）	检出数	检出率（%）	检出数	检出率（%）
4	0.2	50	0.1	33		
12	$1.4^{*\Delta\Delta}$	100	0.6	60	0.3	70
24	$2.1^{\Delta\Delta**}$	100^{*}	0.1	40	0.3	60
48	$2.5^{**\Delta\Delta}$	$100^{\Delta*}$	0.1	40	0.4	40
72	2.4^{**}	100^{**}	0.1	30		

$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$　与单菌组比　　$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$　与SOD用药组比

从表4也说明：1.SOD用药组各时相点肝脏标记绿脓杆菌的检出数均低于给菌烫伤组，并相差显著（$P<0.01$），两组相比有显著差异（$P<0.001$）；2.检出率均低于给菌烫伤组，在伤后48h相差显著（$P<0.05$），也可说明高峰所在。

单烫组在肝脏检出雷极氏变形杆菌和绿脓杆菌，未发现标记的IX型绿脓杆菌。

四、血培养

给菌烫伤组伤后12h10只动物1例阳性，伤后48h10只动物5例阳性（$P<0.05$），72h10只动物1例阳性；单菌组共48只动物仅在24h出现1例阳性；SOD用药组30只动物未培养出标记的IX型绿脓杆菌（表5）。从血培养的高峰出现在伤后48h，说明血培养的阳性数与烫伤后肠粘膜损害的严重程度基本是一致的。

表5　血培养检出标记IX型绿脓杆菌阳性数

组别	伤后 h					共计
	4	12	24	48	72	
给菌烫伤组	0	1	3	5*	1	10
单菌组	0	0	1	0	0	10
SOD用药组		0	0	0		

* $P<0.05$同一时相点比较

给菌烫伤组血培养还检出其它细菌，如：产碱杆菌、嗜血杆菌等。单烫组在血流中也曾检出莫根氏变形杆菌、雷极氏变形杆菌和大肠杆菌等，只是未检出标记的绿脓杆菌，再次说明烫伤后存在肠道细菌移位的可能。

讨　论

一、异硫氰荧光素直接标记活菌

本实验在国内首次成功地应用异硫氰荧光素直接标记活菌，这对于在普通动物体内示踪细菌，具有实用价值。其特点有：1.标记菌荧光强，在荧光显微镜下，菌体游动清楚可见；2.荧光持续时间长，在4℃保存1月，仍可见带有荧光的菌体；3.攻击动物后能引起全身感染；4.标记方法较简便。

二、严重烫伤与肠道内细菌移位的关系

一般认为烧伤感染由于外来菌感染创面所致，很少注意到烧伤病人肠道的细菌是菌血症的一个来源。健康成年动物由于有1.完整的肠上皮屏障；2.宿主免疫防御系统；3.维

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

持生态平衡的正常肠道菌群，所以不易发生肠道内细菌播散。但严重烧伤后肠道这些保护机制遭到破坏，肠道内细菌可能通过肠粘膜，向其它脏器播散，导致危及生命的全身感染[3]。

完整肠粘膜的结构和功能是阻止肠道内细菌移位的一个重要防御系统[4]。肠粘膜上皮层是阻止细菌侵入的第一道物理屏障。本实验的结果表明大鼠烫伤后回肠粘膜屏障有严重损伤，以24和48h最严重，回肠绒毛上皮细胞大片脱落，固有层裸露，坏死溃疡；电镜发现微绒毛电子密度减低，部分缺损，肠上皮细胞间连接广泛分离。给菌烫伤组从烫伤后24h开始，标记绿脓杆菌在肝脏的检出数量明显增高，伤后48h血培养阳性率达高峰（$P<0.05$）；单烫组在肝脏和血流中也检出其它肠道细菌，但未检出标记的绿脓杆菌；给菌烫伤组在肝脏和血流中标记绿脓杆菌的检出数或检出率显著高于单菌组（$P<0.05\sim0.01$），提示烫伤后引起的肠粘膜屏障损伤是促进肠道内细菌向深部器官播散的主要原因。

三、烫伤后氧自由基升高与肠粘膜屏障破坏的关系

严重烫伤后组织器官处于低灌流和缺血缺氧状态。肠道氧自由基有两个主要来源：一个是黄嘌呤氧化酶（XO）；另一个是中性粒细胞（PMN）的还原型辅酶Ⅱ（NADPH）氧化酶[5][6]。

氧自由基清除剂，超氧化物歧化酶（SOD）在缺血时减少，机体抗氧化能力下降，使过量的氧自由基聚集于肠粘膜内。

本实验的结果表明大鼠烫伤后回肠粘膜脂质过氧化产物MDA增高，伤后12h达高峰，明显高于正常组和单菌组，伤后72h仍高于正常组；给菌烫伤组，单烫组与单菌组相比差异非常显著。病理改变以烫伤后24、48h病变较严重，光镜观察，绒毛固有层裸露和坏死；电镜观察，微绒毛断裂和溶解，上皮细胞间连接分离、出现裂隙。

烫伤后回肠粘膜MDA高峰与严重病变的出现存在时间差，可能是氧自由基引起的脂质过氧化损伤与形态学改变需要一定时间。

伤后48h回肠粘膜毛细血管内皮细胞胞浆肿胀呈指状突起，导致毛细血管腔内表面不光滑，可能使PMN更易附壁和红细胞凝集，出现PMN浸润和血管瘀血等病理改变。

给菌烫伤组MDA含量高于单烫组，病理改变较单烫组重；另外，单菌组回肠粘膜MDA含量也略高于正常组，出现了不同程度的病变。其原因可能是：1.外袭的绿脓杆菌胞壁内毒素可激活PMN膜上NADPH氧化酶，产生氧自由基；2.N-甲酰基-甲硫-氨酰基-亮氨酰基苯丙氨酸（FMLP，它是肠腔内细菌释放的产物）可吸引和活化PMN产生氧自由基；3.加之绿脓杆菌内毒素本身，均可引起病理形态学改变。

SOD用药组回肠粘膜MDA含量明显低于给菌烫伤组，病理改变明显减轻，没有肠粘膜裸露。说明烫伤后回肠粘膜产生了大量的氧自由基，它所引起的脂质过氧化产物MDA增高是肠粘膜屏障发生病理改变的重要原因；应用SOD对肠粘膜屏障具有保护作用。

烫伤后SOD用药组中标记绿脓杆菌在肝脏的检出数显著低于给菌烫伤未用药组；血流中未发现标记的Ⅸ型绿脓杆菌。表明：由于烫伤后SOD对肠粘膜屏障具有保护作用，从而明显地减轻了肠道内细菌向深部脏器扩散。

应当指出：SOD有抗损伤作用，不是直接抗感染作用。

综上所述，严重烫伤后，回肠粘膜氧自由基增高，发生脂质过氧化，引起回肠粘膜屏障损坏，可以导致肠道内细菌向全身深部器官播散。氧自由基在这一病理过程中是重要原因之一，但不是唯一的原因。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(本文病理部份受到校病理解剖学教研室史景泉教授和陈意生教授的帮助指导，特此致谢。)

参 考 文 献

1. Parks DA, et al. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation .Am J Physiol 1986; 250:G749～G753
2. Ohkawa H,et al.Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 1979; 95 (2) :351～358
3. Deitch EA, et al.Effect of oral antibotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. J Trauma 1985; 25:385～392
4. Deitch EA, et al.Bacterial translocation from the gut: A mechanism of infectjon JBCR 1987; 8 (6) :475～482
5. Roy RS, et al. Ischemia—induced conversion of XD to XO. Fed Proc 1982; 41 :767
6. Rossi F. The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes:nature,mechanisms of activation and function. Biochim Biophys Acta 1986; 853:65～89

(收稿：1988.12.1;修回：1989.9.6)

Role of Lipid Peroxidation in the Mechanism of Bacterial Translocation from the Gut after Severe Thermal Injury in Rats

Peng Yizhi, et al. (Burn Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

Oxygen free radicals showing to play a role in ischemic-reperfusion-induced intestinal mucosal injuries, but the role of them in bacterial translocation from gut to extraintestinal sites is not documented. This experiment is performed on 186 rats (BW 180～220g) which are divided into 5 groups:normal control, simple Pseudomonas feeding, simple burns, combination of burns and Pseudomonas feeding with and without superoxide dismutase(SOD) treatment. The burnt animals receive 30% TBSA fullthickness scald burn, Pseudomonas fed ones are labelled with isothiocyanate for tracing. Animals are sacrificed at 4, 12, 24, 48, or 72 h after injury. The changes in ileal mucosal malondialdehyde (MDA) are measured, ileal mucosal pathological alterations are observed with light and electron microscopes. Bacterial translocation to liver and blood stream is traced. The combincation or simple burns result in a marked increase of ileal mucosal MDA(peak at 12h)followed by serious pathological changes;the incidence rate increases in the bacterial translocation from the gut; Animals treated with SOD was significant decrease in the ileal mucosal MDA, alleviation of the intestinal mucosal injury, reduction of bacterial translocation from the gut, and no labelled bacterium is isolated from the blood stream. Oxygen free radicals are demonstrated to be one of the causative factors in the intestinal mucosal damage after a severe thermal injury. SOD may preserve the intestinal mucosal barrier and inhibit bacterial translocation from the gut.

Key words: burns/CO; enterogenous infections; lipid peroxidation; malondialdehyde; superoxide dismutase

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net