

· 论著 ·

广谱抗生素对肠道菌群的选择作用

马丽琼 陈德昌 刘绍泽

【摘要】 目的 探讨广谱抗生素对烫伤、脓毒症大鼠肠道菌群的选择作用。方法 56 只健康 SD 大鼠被随机均分为正常对照组, 烫伤罗氏芬治疗前组(单纯烫伤组)、烫伤罗氏芬治疗 3 d 和 9 d 组, 脓毒症罗氏芬治疗前组(单纯脓毒症组)、脓毒症罗氏芬治疗 3 d 和 9 d 组。采用大鼠背部 30% 总体表面积 III 度烫伤模型, 于烫伤后 24 h 内腹腔给予内毒素(20 mg/kg)进行“二次打击”。“二次打击”24 h 后给予罗氏芬治疗, 分别取胃、小肠、大肠内容物行细菌定量培养、菌种鉴定。结果 应用罗氏芬治疗后大鼠胃肠内容物球菌数量明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 球/杆菌比严重倒置; 正常对照组胃肠内容物中肠杆菌均为大肠杆菌, 烫伤、脓毒症后出现肺炎克雷伯杆菌、变形杆菌, 应用罗氏芬治疗后大肠杆菌减少或消失, 代之以铜绿假单胞菌为主, 肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、阴沟杆菌、变形杆菌和其他杆菌等并存的肠道菌群。结论 广谱抗生素破坏肠道微生态平衡, 降低了肠道定植抗力, 使条件致病菌、病原菌成为优势菌群, 造成肠道菌群紊乱和抗生素相关性肠源性疾病的发生。

【关键词】 抗生素; 肠道, 原籍菌; 感染, 肠源性; 微生态环境

Selective action of broad - spectrum antibiotics on intestinal flora in sepsis in rats MA Li-qiong, CHEN De-chang, LIU Shao-ze. Department of Emergency, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: CHEN De-chang (Email: icudcchen@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Objective** To investigate the selective effect of broad - spectrum antibiotics on the intestinal flora in sepsis in rats. **Methods** Fifty - six SD rats were randomly divided into normal control group, scald group [before ceftriaxone sodium (rocephin) treatment group], scald group with 3 days of rocephin treatment, scald group with 9 days of rocephin treatment, and sepsis group (before rocephin treatment group), sepsis group with 3 days of rocephin treatment, and sepsis group with 9 days of rocephin treatment. All the animals were incurred with 30% III degree burns on their back followed by endotoxin challenge with a dose of 20 mg/kg 24 hours after the burn injury. The animals were treated with intraperitoneal injection of ceftriaxone 24 hours (60 mg/kg, quaque 12 hours) after the second hit with endotoxin. At the end of the treatment, the bacteria in stomach, intestine and colon were cultured. The number and kind of the bacteria were also determined. **Results** Antibiotics significantly increased the number of cocci ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ratio between cocci and bacilli was markedly inverted. In selective culture of gut bacilli, *E. Coli* was almost the only bacteria in the contents of stomach, intestine and colon in normal control group, but after burns and endotoxin challenge, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* appeared. After the rats received antibiotics treatment, *E. Coli* decreased in number or disappeared, and was replaced mainly by *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* and *Proteus* and other bacilli. **Conclusion** Broad - spectrum antibiotics can induce imbalance of bacteria flora in the gut, resulting in a reversion of the ratio between cocci and bacilli, and also reduction in intestinal colonization resistance. Then, opportunistic pathogens become dominant flora in gut, which may cause antibiotic - related gut - origin diseases.

【Key words】 antibiotics; intestinal flora; gut - origin infection; microbiogeocoenosis

正常生态菌群是指生理情况下人体和动物的体表或体内的天然孔、道中存在的菌群, 在宿主的营养、生长性能、免疫、抵抗病原菌的入侵和消除某些化合物的毒性等方面发挥重要作用, 该菌群的种类、

数量很多。正常情况下, 与宿主、环境三者之间形成一个动态平衡的微生态系统^[1]。下消化道是人体内最大的“菌库”, 是人体的“微生物”器官, 肠道内的原籍菌是隐藏于人体器官内的一个“微生物反应堆”, 具有很多重要的功能^[2]。本课题提出如下假说: 病理情况下, 广谱抗生素的应用大量杀灭肠道内敏感菌群, 导致肠道内正常生态菌群发生改变, 微生态环境被破坏, 并逐步选择出耐药菌株。条件致病菌引起的肠源性感染及其多重耐药已经成为全球非常棘手的问题。本实验通过罗氏芬对脓毒症大鼠肠道菌群的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472270); 上海市科学技术发展基金资助项目(044119750)

作者单位: 200003 上海, 第二军医大学附属长征医院急救科

通讯作者: 陈德昌 (Email: icudcchen@yahoo.com.cn)

作者简介: 马丽琼(1977 -), 女(汉族), 河北省人, 主治医师, 专业方向为危重病胃肠功能障碍的防治。

影响,阐明广谱抗生素对危重病肠道细菌的选择作用,进一步探讨危重病细菌移位和细菌耐药的机制。

1 材料与与方法

1.1 动物模型制备:健康雄性 SD 大鼠 56 只,体重 220~250 g,由上海西普尔-必凯实验动物中心提供。动物适应性喂养 2 d,禁食不禁水 12 h,用质量分数为 1% 的戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉。动物俯卧位,背部脱毛后固定于烫伤模型架上,将背部浸泡于沸水 15 s,造成 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤,立刻用 100 ml/kg 平衡盐液腹腔注射复苏。烫伤后 24 h 内腹腔给予内毒素[革兰阴性菌 O111:B4 脂多糖(LPS)20 mg/kg,美国 Sigma 公司产品]进行“二次打击”,间隔 12 h 腹腔注射 1 次。正常对照组仅背部脱毛而不予烫伤,以等量生理盐水替代 LPS 注射,余处理同单纯烫伤组。

1.2 实验设计:按随机数字表法将大鼠分为正常对照组,烫伤罗氏芬治疗前组(单纯烫伤组)、烫伤罗氏芬治疗 3 d 和 9 d 组,脓毒症罗氏芬治疗前组(单纯脓毒症组)、脓毒症罗氏芬治疗 3 d 和 9 d 组,每组 8 只。烫伤各组及脓毒症各组大鼠于腹腔注射生理盐水或 LPS 24 h 后再注射罗氏芬 120 mg/kg 治疗(60 mg/kg,12 h 1 次)。各组大鼠分别在相应时间点活杀,在无菌条件下采集标本。

1.3 指标检测及方法:各组大鼠在相应时间点常规麻醉,仰卧位固定于手术台上,腹部脱毛,常规消毒,腹部皮肤铺洞巾,严格无菌条件下开腹。依次切开胃、小肠、大肠肠壁,各取内容物约 0.5 g,以生理盐水 10 倍稀释作为原液,取原液作 1:10、1:100、1:1 000……系列倍比稀释,各浓度分别取 100 μl 置于血琼脂、麦康凯和肠球菌平板上以玻璃涂布棒涂匀,做肠杆菌、肠球菌选择培养。各标本每个浓度做 3 个平板,分别置于 CO₂ 孵箱中 37 ℃ 培养 24 h,对每个平板的细菌菌落进行计数,取 3 个梯度的均数。按公式进行细菌定量:组织细菌含量(cfu/g)=菌落数×稀释度/组织重量,数据取以 10 为底的对数(lg)表示。根据革兰染色、菌落形态进行初步鉴定,再进行细菌自动分析仪鉴定。

1.4 统计学处理:统计资料采用 SPSS13.0 统计软件包分析处理,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 广谱抗生素对大鼠肠道球菌数量的影响(表 1):烫伤罗氏芬组大肠内容物肠球菌数量较正

常对照组和单纯烫伤组明显增多(P 均 <0.01),但罗氏芬治疗 3 d 组和 9 d 组间比较差异无显著性;单纯脓毒症组较正常对照组和单纯烫伤组肠球菌数量也明显增加(P 均 <0.01),用罗氏芬治疗后肠球菌数量进一步增加,显著高于未应用抗生素治疗组(P 均 <0.01),但罗氏芬治疗 3 d 组和 9 d 组间差异无显著性。小肠及胃内容物菌群变化趋势与大肠内容物相似,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 罗氏芬对脓毒症大鼠肠道球菌数量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effects of ceftriaxone on the number of enterococci in sepsis rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	in sepsis rats($\bar{x}\pm s, n=8$)		
	大肠内容物	小肠内容物	胃内容物
正常对照组	5.39±0.96	5.16±0.78	3.97±1.05
单纯烫伤组	5.33±1.06	4.48±0.80	4.21±0.89
烫伤罗氏芬 3 d 组	9.51±0.35▲★	6.82±0.91▲★	6.87±0.80▲★
烫伤罗氏芬 9 d 组	9.67±0.40▲★	6.79±0.84▲★	4.88±1.35
单纯脓毒症组	7.20±0.95▲★	5.67±0.62#	4.19±0.28
脓毒症罗氏芬 3 d 组	9.35±0.16▲●	6.53±1.10△	6.22±1.56△
脓毒症罗氏芬 9 d 组	9.53±0.21▲●	7.67±1.10▲●	6.55±0.63△*

注:与正常对照组比较:△ $P<0.05$,▲ $P<0.01$;与单纯烫伤组比较:# $P<0.05$,★ $P<0.01$;与单纯脓毒症组比较:* $P<0.05$,● $P<0.01$

2.2 广谱抗生素对大鼠肠道球/杆菌比的影响(表 2):正常对照组、单纯烫伤组和单纯脓毒症大鼠大肠内容物球/杆菌比小于 1,即杆菌数量多于球菌数量;且烫伤及内毒素“二次打击”后肠道内杆菌数量显著增加,表现为球/杆菌比的负值明显增大,也说明烫伤和内毒素打击后杆菌数量增多幅度大于球菌。烫伤和脓毒症大鼠应用罗氏芬治疗后球/杆菌比发生倒置,球菌数量明显多于杆菌,各组间比较差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 罗氏芬对脓毒症大鼠肠道球/杆菌比的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Effects of ceftriaxone on the ratio between cocci and bacilli in sepsis rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	球/杆菌比	组别	球/杆菌比
正常对照组	-0.13±0.66	单纯脓毒症组	-1.76±1.06▲#
单纯烫伤组	-0.65±0.53	脓毒症罗氏芬 3 d 组	4.91±0.71▲●
烫伤罗氏芬 3 d 组	6.01±0.84▲★	脓毒症罗氏芬 9 d 组	3.71±1.02▲●
烫伤罗氏芬 9 d 组	5.29±0.68▲★		

注:与正常对照组比较:▲ $P<0.01$;与单纯烫伤组比较:# $P<0.05$,★ $P<0.01$;与单纯脓毒症组比较:● $P<0.01$

2.3 广谱抗生素对大鼠肠道杆菌的选择作用(表 3):正常对照组大鼠大肠内容物中肠杆菌选择培养仅培养到大肠杆菌;单纯烫伤组、单纯脓毒症组大鼠大肠内容物中除大肠杆菌外,分别出现肺炎克雷伯杆菌、变形杆菌;应用罗氏芬治疗后大肠杆菌减少或消失,代之以铜绿假单胞菌为主,另外有肺炎克

雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、阴沟杆菌、变形杆菌和其他杆菌(如摩根摩根菌、普罗威登菌、丙二酸阴性枸橼酸杆菌、洛非不动杆菌等)。

表 3 脓毒症大鼠大肠内容物细菌培养结果

Table 3 Result of enterobacteriaceae culture in intestinal contents in sepsis rats 只

组别	动物数	大肠杆菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯杆菌	鲍曼不动杆菌	阴沟杆菌	变形杆菌	其他
正常对照组	8	8						
单纯烫伤组	8	8		1			1	
烫伤罗氏芬 3 d 组	8		3		2			1
烫伤罗氏芬 9 d 组	8		6		3			
单纯脓毒症组	8	8		3				
脓毒症罗氏芬 3 d 组	8	4	5	1	1			1
脓毒症罗氏芬 9 d 组	8		5		1	3		

3 讨论

肠道菌群分为三部分:①生理性细菌与宿主共生关系,为专性厌氧菌,是肠道的优势菌群,如双歧杆菌、类杆菌、优杆菌和消化球菌等是膜菌群的主要构成者,具有营养及免疫调节作用;②条件致病菌与宿主共栖,以兼性需氧菌为主,为肠道非优势菌群,如肠球菌、肠杆菌等,其在调节肠道微生态环境平衡中起重要作用,对人体不构成危害,但在特定的条件下获得侵袭性,对人体造成损害;③病原菌多为过路菌,不能长期定植于肠道,且被正常肠道生态菌群所阻抑,故细菌数量极少,不能致病,但病理情况下其数量超出正常生理极限,具有很强的致病力,如不动杆菌、假单胞菌和变形杆菌等。

肠黏膜上皮的正常菌群组成了人体内的生物屏障,能抑制条件致病菌或病原菌在黏膜上定植造成的感染。1971 年荷兰微生物学者 van der Waaij 等^[3]提出定植抗力(CR)学说,他们认为人或动物肠道内厌氧菌占绝对优势(95%以上),对外来菌(致病菌或非致病菌)在肠道内定居表现出一定的 CR。有些常居菌群,还能产生细菌素等抗菌物质,减弱致病菌毒素的毒性作用,杀死、抑制外袭菌。可见肠道正常菌群所起的生物拮抗作用具有防止外源性病原微生物入侵、维护人体健康的作用。

生理情况下,肠道正常菌群与人体内外环境保持着动态平衡,对机体健康起着非常重要的作用,但在病理情况下,肠道的微生态环境破坏,生态菌群失调,导致或加剧某些病理过程。广谱抗生素的长期和大量应用是引起菌群失调的主要原因,如临床常见的难辨梭状芽胞杆菌引起的伪膜性肠炎。头孢菌素、氨基糖苷类抗生素、克林霉素是引起菌群失调的主

要抗生素。研究表明,无论是健康志愿者还是手术、感染患者,应用罗氏芬都可以使肠道厌氧菌和肠杆菌数量减少,而肠球菌、真菌数量增加^[4-7]。本实验观察了烫伤、内毒素二次打击后胃、小肠和大肠内肠道菌群的变化规律,以及罗氏芬对肠道微生态环境的影响,结果表明单纯烫伤后 24 h 大鼠肠道内球菌数量并无显著变化,应用罗氏芬后球菌数量增加上万倍,达 10^9 cfu/g,且抗生素应用时间越久,球菌数量越有增加趋势;烫伤和内毒素二次打击使大鼠肠道球菌数量增加近百倍,应用罗氏芬 3 d 后肠球菌数量明显增加,高于未治疗组上百倍,9 d 后数量仍有增加趋势;同时球/杆菌比严重倒置,说明主要针对革兰阴性杆菌的广谱抗生素杀死肠道杆菌的同时使肠球菌失去抑制,数量显著增加,被选择为优势菌群,严重破坏肠道微生态环境。抗菌药物可使肠道的一些敏感菌株受到影响,导致其含量下降,从而影响到肠道的微环境,引起某些非敏感菌株的过度生长。这可能是肠道菌群失调发生后肠道球菌比例增加的原因。

胃肠道是对应激反应最为敏感的器官之一,严重的应激反应可使胃肠黏膜屏障破坏,肠道内细菌和真菌移位至血液、肠系膜淋巴结、肝、脾、肺等组织器官,病理情况下,肠道是血液、尿道、呼吸道和外科伤口等感染的细菌播散“平台”。危重病患者广谱抗生素的临床应用,大量杀灭敏感菌群,肠黏膜上的许多细菌定植靶位暴露出来,为致病力较强的非常居菌留下定植空间,同时大量繁殖^[8]。在肠道 CR 降低时,环境中的病原菌或耐药菌也易于进入肠道定植。本研究表明,正常对照组大鼠大肠内容物肠杆菌选择培养均为大肠杆菌,烫伤和内毒素二次打击后肠杆菌菌种发生改变,出现肺炎克雷伯杆菌、变形杆菌等非共居益生菌,应用罗氏芬治疗后大肠杆菌明显减少或消失,代之以铜绿假单胞菌为主,肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、阴沟杆菌、变形杆菌和其他杆菌(如摩根摩根菌、普罗威登菌、丙二酸阴性枸橼酸杆菌、洛非不动杆菌等)并存于肠道菌群。说明广谱抗生素破坏了正常肠道菌群间的拮抗平衡,使肠道微生态环境平衡紊乱,降低了肠道 CR,使条件致病菌、病原菌等非优势菌群大量繁殖成为优势菌群,并可能通过受损的胃肠道屏障进入循环系统和体内组织器官,发生细菌/内毒素移位,造成肠源性感染,甚至引发脓毒症。由此也说明,危重病患者院内感染常见的病原菌铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、阴沟杆菌和变形杆菌等部分可能是肠源性

的,胃肠道可能是常见院内感染菌的“菌库”,也是院内感染菌向体内组织器官播散的平台。

综上所述,长期、大量应用广谱抗生素引起肠道菌群失调的可能机制:一是广谱抗生素大量杀灭了肠道内的敏感菌群,非敏感菌群则失去菌群拮抗的阻力而大量繁殖;二是在菌群紊乱、肠道屏障功能降低的情况下,某些外来细菌或过路菌得以乘虚而入,在肠道定植并大量繁殖,成为优势菌群^[9]。脓毒症是创伤、烧伤、休克等临床急危重患者的严重并发症之一,也是诱发脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)的重要原因^[10],而肠道内细菌移位是导致危重病患者系统炎症反应失控和并发 MODS 的重要病理环节^[11]。因此合理应用抗生素,维持胃肠道微生态平衡,保护肠道屏障功能,减少细菌移位,是防治肠源性脓毒症的关键,才有可能逆转 MODS 的病理过程。

参考文献:

- 1 Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood[J]. *Eur J Nutr*, 2002, 41(Suppl 1):I32-37.
- 2 Backhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915-1920.
- 3 van der Waaij D, Berghuis-de Vries J M, Lekkerkerk-Lekkerkerk V. Colonization resistance of the digestive tract in conventional

- and antibiotic-treated mice[J]. *J Hyg (Lond)*, 1971, 69(3): 405-411.
- 4 Welling G W, Meijer-Severs G J, Helmus G, et al. The effect of ceftriaxone on the anaerobic bacterial flora and the bacterial enzymatic activity in the intestinal tract[J]. *Infection*, 1991, 19(5):313-316.
- 5 de Vries-Hospers H G, Tonk R H, van der Waaij D. Effect of intramuscular ceftriaxone on aerobic oral and faecal flora of 11 healthy volunteers[J]. *Scand J Infect Dis*, 1991, 23(5): 625-633.
- 6 Cavallaro V, Catania V, Bonaccorso R, et al. Effect of a broad-spectrum cephalosporin on the oral and intestinal microflora in patients undergoing colorectal surgery[J]. *J Chemother*, 1992, 4(2):82-87.
- 7 Vogel F, Ochs H R, Wettich K, et al. Effect of step-down therapy of ceftriaxone plus loracarbef versus parenteral therapy of ceftriaxone on the intestinal microflora in patients with community-acquired pneumonia[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(7):376-379.
- 8 陈德昌. 重视胃肠道在真菌感染中的作用[J]. *内科急危重症杂志*, 2005, 11(1):21-22.
- 9 顾军, 李维勤, 李珍大. 抗生素相关性肠炎[J]. *肠外与肠内营养*, 2006, 13(1):42-43.
- 10 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(6):321-324.
- 11 陈德昌, 乔林, 景炳文, 等. 大黄对烫伤大鼠肠黏膜上皮细胞线粒体单价泄漏的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(11): 849-852.

(收稿日期:2007-04-06 修回日期:2007-06-10)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

关于举办国家级继续医学教育项目

第七期《机械通气技术临床应用与进展》学习班、第三期《危重病急救医学进展》学习班招生通知

上海交通大学医学院附属新华医院急救中心/成人 ICU 分别于 2007 年 10 月 14—21 日举办《机械通气技术临床应用与进展》(2007-03-02-105), 2007 年 10 月 21—28 日举办《危重病急救医学进展》(2007-03-10-027); 以宋志芳教授主编的《现代呼吸治疗学-机械通气与危重病》和《危重病急救与重症监护》为教材, 每个学习班授予 I 类学分 12 分。举办地点在上海交通大学医学院附属新华医院, 招生对象为从事急诊、急救、危重病、ICU、呼吸、麻醉等专业技术人员, 招生名额为 30~50 名, 学费与资料费分别为 800 元, 食宿费各 600 元(其余费用一律不收)。联系电话:021-65790000-7505/7503/7500/6062; 联系人:叶云洁(7505/7503), 潘曙明(6062), 宋志芳(7500)。

(上海交通大学医学院附属新华医院)

2007 年第三届全国机械通气技术与临床应用新进展高层研讨班通知

天津市医学会、天津市呼吸机治疗研究中心和天津市第三中心医院联合承办的国家级 I 类继续教育项目(项目编号 2007-03-10090, 10 学分)“第三届全国机械通气技术与临床应用新进展高层研讨班”定于 2007 年 8 月 24—27 日在天津财富为酒店召开。会议将邀请国内知名的机械通气治疗专家就机械通气支持技术及各种最新通气模式的理论基础和临床实践中的有关问题进行深入细致的研讨, 采取授课与实际操作相结合的方式, 内容涉及机械通气治疗与监护技术、脱机新模式及各种指南的推出等诸多内容进行讨论, 欢迎国内从事 ICU、呼吸、急诊、心血管临床及科研的医护人员参加, 学习班预计为期 3 d。联系方式: Email: yzhqin@yahoo.com.cn; 电话: 022-84112612, 8411226; 联系人: 徐磊。会议地点: 天津市河东区津塘路天津财富为酒店。

(天津市医学会, 天津市呼吸机治疗中心, 天津市第三中心医院)