

• 论著 •

广谱抗生素对脓毒症大鼠肠道微生态环境的影响

马丽琼 陈德昌 刘绍泽

【摘要】 目的 探讨广谱抗生素对脓毒症大鼠肠道微生态环境的影响。方法 56 只健康 SD 大鼠被随机分为正常对照组、烫伤组和脓毒症组。于大鼠背部造成 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤后 24 h, 间隔 12 h 分两次腹腔注射内毒素 (20 mg/kg) 进行“二次打击”制备脓毒症模型。分别于烫伤及“二次打击”后 24 h, 间隔 12 h 分两次腹腔注射头孢曲松进行治疗, 各组于治疗前及治疗 3 d 和 9 d 活杀 8 只大鼠, 取胃窦、小肠、结肠内容物及结肠黏膜行细菌定量培养、菌种鉴定。结果 单纯烫伤对结肠内容物杆菌数量和种类无明显影响, “二次打击”后, 杆菌数升高上千倍 ($P < 0.01$), 应用头孢曲松治疗后大鼠结肠内容物杆菌数量明显减少 (P 均 < 0.01), 小肠内容物肠杆菌亦有类似变化, 而胃内容物肠杆菌数量变化不显著。经烫伤及“二次打击”后肠道杆菌数量显著增加, 球/杆比值负值增大; 应用头孢曲松后, 肠球菌数量显著增多, 球/杆比值严重倒置; 厌氧菌数量亦有所减少, 但差异不显著。结论 广谱抗生素使定植于肠道的厌氧菌和肠杆菌数量锐减, 使肠球菌、耐药菌选择为优势菌群成为可能, 造成肠道微生态环境破坏。

【关键词】 抗生素; 肠道; 细菌; 脓毒症; 微生态环境

Influence of broad-spectrum antibiotics on the gut microflora 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 study the influence of broad-spectrum antibiotics on intestinal microecology in septic rats. **Methods** Fifty-six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control, burn and sepsis group. Rats in the latter two groups received 30% total body surface area (TBSA)Ⅲ degree burns on back followed by an injection of endotoxin in a dose of 20 mg/kg 24 hours later. The animals in sepsis group were treated with intraperitoneal injection of ceftriaxone 12 hours after the endotoxin challenge in a dose of 60 mg/kg, and it was repeated 12 hours later. Another group of rats received burn injury only. Eight rats in burn group and sepsis group were sacrificed before ceftriaxone treatment, 3 days and 9 days after the treatment, respectively. The gastric, intestinal and colonic contents were collected for bacterial cultures and species determination. **Results** The influence of burn injury on the number and species of gut bacteria was not obvious. The addition of endotoxin could markedly increase the number of enteric bacilli in small intestine and colon (both $P < 0.01$), but not in stomach. However, the number of enteric bacilli was sharply decreased in intestine and colon after ceftriaxone treatment (all $P < 0.01$). Furthermore, the ratio of cocci to bacilli was seriously inverted in intestine and colon after ceftriaxone treatment, though burn injury followed by endotoxin had dramatically raise the ratio of cocci to bacilli in intestine and colon. It also produce a loss of anaerobic bacteria in colon, though the difference in number was not statistically significant. **Conclusion** Broad-spectrum antibiotics could decrease the amount of enteric bacilli, making enterococci to be the predominant microbial flora in gut.

【Key words】 antibiotics; gut; bacteria; sepsis; microbiogeocoenosis

大量广谱抗生素的应用导致肠内益生菌严重受抑或杀灭, 而少数原本“过路”的致病菌、真菌获得定植空间, 过度繁殖, 造成机会感染。肠道是多器官功能障碍综合征 (MODS) 的始动器官^[1], 细菌移位是其主要的病理环节^[2], 而肠道内条件致病菌过度增

长、黏膜局部免疫功能减弱和肠黏膜机械屏障受损可加剧上述病理生理过程^[3]。本实验通过观察头孢曲松对烫伤脓毒症大鼠肠道菌群的影响, 进一步探讨广谱抗生素对肠道微生态环境的影响规律, 为危重病患者抗生素合理选择和应用提供科学依据。

1 材料与方

1.1 动物分组及模型制备: 56 只健康雄性 SD 大鼠, 体重 220~250 g, 由上海西普尔-必凯实验动物中心提供, 按随机数字表法分为正常对照组 ($n=8$)、烫伤组 ($n=24$) 和脓毒症组 ($n=24$)。用质量分数为 1% 的戊巴比妥 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 将

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

作者单位: 200003 上海, 解放军第二军医大学长征医院急救科
通讯作者: 陈德昌, 教授, 硕士生导师, Email: icudcchen@yahoo.com.cn

作者简介: 马丽琼 (1977-), 女 (汉族), 河北省人, 主治医师, Email: mlq1977@sina.com.cn.

背部浸泡于沸水 15 s 造成 30% 总体表面积 III 度烫伤, 立即用 100 ml/kg 平衡盐液腹腔注射复苏。烫伤后 24 h, 间隔 12 h 分两次腹腔注射内毒素(美国 Sigma 公司产品) 20 mg/kg 进行“二次打击”, 制备脓毒症模型。正常对照组仅予背部脱毛不烫伤, 以等量生理盐水替代内毒素, 其余处理同烫伤组。

1.2 给药方法: 烫伤组及脓毒症组于腹腔注射生理盐水或内毒素 24 h 后, 间隔 12 h 分两次腹腔注射头孢曲松(上海罗氏制药有限公司) 120 mg/kg; 并于治疗前及治疗 3 d 和 9 d 各活杀 8 只大鼠, 在无菌条件下采集胃窦、小肠(距胃 3~4 cm)、结肠(距肛门 3~4 cm) 内容物和结肠黏膜标本待检。

1.3 普通标本处理和选择性细菌培养: 分别从各标本取 0.5 g 胃肠道内容物, 以生理盐水 10 倍稀释作为原液, 取原液, 进行 1:10, 1:100, 1:1 000 的系列倍比稀释, 各浓度取 100 μl 置于血琼脂、麦康凯(郑州安图生物工程有限公司) 和肠球菌平板上, 做肠杆菌、肠球菌等选择培养, 各标本每个浓度做 3 个平板, 并分别置于 CO₂ 孵箱中 37 °C 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: 组织中细菌含量(cfu/g) = 菌落数 × 稀释度 / 组织重量。根据革兰染色对菌落形态进行初步鉴定, 再用细菌自动分析仪鉴定。

1.4 厌氧培养标本的处理和厌氧菌培养: 距盲肠 5 cm 处取结肠 1 cm (约 0.1 g), 加 0.9 ml 生理盐水, 匀浆后取 100 μl 分别涂于 3 块乳酸杆菌选择培养基 MRS 平板(英国 OXID 公司) 上, 于 15 min 内置于厌氧袋中并密封, 将厌氧袋放入 CO₂ 孵箱中 37 °C 培养 48 h, 计数每个平板的细菌菌落, 取 3 个梯度的均数, 通过革兰染色和镜检进行鉴定。

1.5 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件包, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃肠道杆菌数量的变化(表 1): 单纯烫伤大鼠头孢曲松治疗前结肠内容物中肠杆菌数量无明显变化, 应用头孢曲松治疗后 3 d 和 9 d 肠杆菌数量逐渐减少, 3 d 降至最低, 9 d 有所回升, 但均少于正常对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。烫伤大鼠经内毒素“二次打击”后, 肠杆菌数量较正常对照组和烫伤组均明显升高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 经头孢曲松治疗后 3 d 肠杆菌数量降至最低, 9 d 有所回升, 明显高于烫伤组 (P 均 < 0.01)。小肠的变化趋势与结肠相似, 而胃内容物杆菌数量变化不显著。

表 1 各组大鼠胃肠道杆菌数量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	不同组织内容物中杆菌数量(log cfu/g)			
		结肠内容物	小肠内容物	胃内容物	
正常对照组	8	5.52 ± 0.41	5.38 ± 1.20	4.60 ± 1.08	
烫伤组	治疗前	8	5.86 ± 0.62	4.99 ± 0.55	4.62 ± 1.35
	治疗 3 d	8	3.29 ± 0.90 ^{bd}	4.28 ± 1.50	4.78 ± 1.07
	治疗 9 d	8	4.30 ± 0.58 ^{bd}	3.91 ± 0.57	3.05 ± 0.21
脓毒症组	治疗前	8	8.96 ± 0.73 ^{bd}	7.35 ± 1.30 ^{bc}	3.86 ± 0.87
	治疗 3 d	8	4.43 ± 0.64 ^{ad}	4.26 ± 0.95 ^d	4.32 ± 1.31
	治疗 9 d	8	5.82 ± 0.99 ^{df}	4.67 ± 1.24 ^{df}	5.89 ± 0.65

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与本组治疗前比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与烫伤组同期比较, ^e $P < 0.01$

2.2 结肠菌群球/杆比值的变化(表 2): 正常对照组结肠菌群球/杆比值 < 1 , 即杆菌数量多于球菌数量; 烫伤组和脓毒症组大鼠制模后结肠杆菌数量显著增加, 即球/杆比值负值明显增大。烫伤组和脓毒症组治疗后球/杆比值发生倒置, 球菌数量明显多于杆菌, 各组间差异有统计学意义 (P 均 < 0.01)。

表 2 各组大鼠结肠菌群球/杆比值及乳酸杆菌数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	肠道菌群	乳酸杆菌数
		球/杆比值	(log cfu/g)
正常对照组	8	-0.13 ± 0.66	8.00 ± 0.28
烫伤组	治疗前	8	6.55 ± 2.08 ^a
	治疗 3 d	8	6.01 ± 0.84 ^{bd}
	治疗 9 d	8	6.10 ± 0.71 ^a
脓毒症组	治疗前	8	6.55 ± 0.60 ^a
	治疗 3 d	8	6.43 ± 1.16 ^a
	治疗 9 d	8	6.75 ± 0.21 ^a
	8	3.71 ± 1.02 ^{bd}	5.94 ± 1.21 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与本组治疗前比较, ^c $P < 0.01$; 与烫伤组同期比较, ^e $P < 0.05$

2.3 结肠黏膜菌群中乳酸杆菌数量的变化(表 2): 烫伤组和脓毒症组大鼠制模后结肠黏膜菌群中乳酸杆菌数量较正常对照组明显减少, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。应用头孢曲松治疗后乳酸杆菌数量未进一步下降, 但脓毒症组治疗 9 d 时乳酸杆菌数量约为正常对照组的 1% ($P < 0.01$)。

3 讨论

胃肠道是人体内最大的“菌库”和微生物“反应堆”, 肠道共生菌对肠道免疫、营养吸收和黏膜屏障功能发挥重要作用, 是肠道微生态环境的重要组成部分^[4]。肠道内乳酸杆菌、双歧杆菌等生理性益生菌还具有多种微生物拮抗功能, 如通过营养争夺, 产生各种有机酸降低肠道局部 pH 值, 产生具有广谱抗菌作用的物质如防御素、细菌素、过氧化氢、抗菌肽以及亲脂分子等, 对肠道内的条件致病菌起抑制或杀灭作用, 从而保护肠道屏障功能^[5-8]。

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致病菌播散的重要“平台”。广谱抗生素的大量使用,可杀灭敏感菌群,使肠黏膜上与益生菌结合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了定植空间,使之大量繁殖,出现菌群失调^[9-10]。本实验结果显示,单纯烫伤后肠道内杆菌数量并无明显增多,应用头孢曲松治疗后 3 d 肠杆菌数量锐减。内毒素“二次打击”使肠道杆菌数量增加上千倍,应用头孢曲松治疗 3 d 后肠杆菌数量明显减少,甚至低于正常对照组和烫伤组,9 d 后才有所增加,说明内毒素打击致使肠道血液灌流锐减,肠蠕动减弱,肠道内发酵菌大量繁殖,导致肠杆菌数量急增。而头孢曲松治疗 3 d 后肠道内对头孢曲松敏感的大肠杆菌被大量杀灭,引起肠杆菌数量锐减,治疗 9 d 后对头孢曲松耐药的肠杆菌被选择出来,并大量繁殖,而逐渐形成优势菌群,杆菌数量有所恢复,这是对生物体非常危险的一个信号。

本研究中还发现胃内容物肠杆菌数量变化不显著,原因可能是头孢曲松在胆汁内浓度很高,因而在小肠和结肠内浓度也相当高,却在胃内浓度较低,故对胃内细菌的影响较小。头孢曲松治疗后结肠、小肠内球/杆比值严重倒置,说明头孢曲松在大量杀灭肠杆菌的同时失去了对肠球菌的拮抗作用,使之数量显著增多,严重破坏了肠道微生态环境。另外,被杀灭的革兰阴性杆菌释放出内毒素,可加剧胃肠道病理生理过程,促进细菌、内毒素移位。

肠道中的专性厌氧菌,如乳酸杆菌、双歧杆菌是宿主正常肠道菌群,是发挥定植抗力作用的主要菌群。研究表明,厌氧菌通过兼性厌氧菌和需氧菌等条件致病菌的定植抗力能够维持肠道的微生态平衡,一旦这种生态平衡被破坏,肠道内的条件致病菌就可能形成优势菌群,在肠黏膜屏障破坏的情况下,大量细菌和内毒素经门静脉系统侵入人体循环,造成肠源性脓毒症^[11],并在一定条件下使全身炎症反应失控,引起多器官功能损害^[1]。专性厌氧菌通过与肠道上皮细胞紧密结合而占据黏膜靶位,形成菌膜屏障,进而限制肠道内条件致病菌(通常为兼性厌氧菌或需氧菌)黏附至肠上皮细胞。病理因素和治疗干扰可破坏此菌膜屏障,加剧了条件致病菌的定植和过度生长^[12]。本实验中选取乳酸杆菌作为研究对象,通过头孢曲松对其数量的影响探讨广谱抗生素对肠道

微生态环境的破坏作用。结果显示,烫伤和内毒素“二次打击”后大鼠结肠黏膜菌群中乳酸杆菌数量较正常对照组明显减少;应用广谱抗生素后乳酸杆菌数量减少不明显。说明头孢曲松对乳酸杆菌等厌氧菌无抗菌活性,因此对肠道内乳酸杆菌影响较小。内毒素使肠道内乳酸杆菌丢失的原因可能是烫伤和内毒素打击使胃肠黏膜血流量锐减,肠黏膜上皮细胞因缺血、缺氧而发生代谢障碍,出现萎缩、坏死等,从而影响菌群的繁殖。厌氧菌数量锐减所带来的后果是肠道内益生菌定植抗力减弱、消失,出现严重的肠道微生态环境紊乱,加剧危重病病理生理过程。

综上所述,广谱抗生素的广泛应用,大量杀灭了肠道内敏感菌群,使肠道内对抗生素不敏感的常居菌(如念珠菌等)和耐药菌留下大量的定植空间^[10],形成优势菌群,导致肠道微生态环境破坏,严重者出现胃肠功能衰竭,加剧危重病病理生理过程。科学合理选择和使用抗生素、严格掌握抗生素应用的适应证是防止肠道菌群失衡的关键。

参考文献

- [1] 陈德昌,景炳文,李红江,等. 大黄对危重症患者系统炎症反应治疗作用的临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 584-587.
- [2] 陈德昌,景炳文,张鸿祺. 严重创伤、休克对肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1994, 6(3): 190-191.
- [3] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure; bacterial translocation and permeability changes [J]. World J Surg, 1996, 20(4): 411-417.
- [4] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118.
- [5] Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host; report on the Danone Symposium "the intelligent intestine" [J]. Am J Clin Nutr, 2003, 78(4): 675-683.
- [6] Seehofer D, Rayes N, Schiller R, et al. Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats [J]. J Surg Res, 2004, 117(2): 262-271.
- [7] Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function [J]. Gastroenterology, 2001, 121(3): 580-591.
- [8] Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, et al. Probiotics: effects on immunity [J]. Am J Clin Nutr, 2001, 73(2 Suppl): 444S-450S.
- [9] 马丽琼, 陈德昌, 刘绍泽. 广谱抗生素对肠道菌群的选择作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(8): 456-459.
- [10] 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.
- [11] 陈德昌, 景炳文, 张翔宇, 等. 大黄对肠黏膜屏障的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 1994, 6(6): 329.
- [12] 钟世顺, 张振书. 肠黏膜屏障功能障碍与双歧杆菌 [J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(4): 432-435.

(收稿日期: 2008-01-06 修回日期: 2008-08-22)

(本文编辑: 李银平)