

大黄对脓毒症大鼠肠道细菌及其移位的影响

陈德昌 马丽琼 刘绍译

【摘要】 目的 探讨大黄对脓毒症大鼠肠道细菌及其毒素移位的防治作用。方法 104 只健康 SD 大鼠被随机分为 4 组, 正常对照组 8 只, 烫伤组、脓毒症组、大黄组各 32 只, 后 3 组又分为治疗前及治疗后 1、3、9 d 亚组, 每个亚组 8 只。采用大鼠背部烫伤模型, 烫伤后 24 h 分两次腹腔注射内毒素 (20 mg/kg) 进行“二次打击”, 烫伤组和脓毒症组分别于腹腔注射生理盐水或内毒素打击 24 h 后腹腔注射头孢曲松 120 mg/kg, 间隔 12 h, 分两次给予, 大黄组内毒素打击后 24 h 在给予头孢曲松治疗的同时予以大黄 50 mg/kg 灌胃, 每日 2 次。分别于治疗前及治疗 1、3、9 d 取大肠内容物及肝脏、肺脏、肠系膜淋巴结、血液, 进行细菌定量培养和菌种鉴定。结果 烫伤大鼠头孢曲松治疗前大肠内容物肠杆菌数量较正常对照组变化不显著 [(5.86±0.62)log cfu/g 比 (5.52±0.41)log cfu/g]; 内毒素“二次打击”后肠杆菌数量 [(8.96±0.73)log cfu/g] 明显增加 ($P<0.01$), 应用头孢曲松治疗后 3 d、9 d 肠杆菌数量 [(4.43±0.64)log cfu/g, (5.82±0.99)log cfu/g] 明显减少 (P 均 <0.01), 大肠杆菌减少或消失, 代之以铜绿假单胞菌为优势菌群, 大黄组肠杆菌数量 [(8.24±1.32)log cfu/g] 下降不显著, 且大肠杆菌比例增加, 铜绿假单胞菌等数量减少。大黄在烫伤脓毒症早期能抑制肠道细菌移位率 (1 d 移位率 40.62% 比 6.25%, $P<0.05$)。结论 大黄对创伤、脓毒症大鼠胃肠道微生态环境有一定的保护作用, 能减弱广谱抗生素对肠道菌群的选择作用, 同时在脓毒症早期能抑制肠道细菌的移位。

【关键词】 大黄; 细菌; 细菌移位; 肠道; 大鼠

Effects of rhubarb (大黄) on intestinal flora and bacterial translocation in rats with sepsis CHEN De-chang, MA Li-qiong, LIU Shao-ze. Department of Critical Care Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of rhubarb (大黄) on intestinal flora and bacterial translocation in septic rats. **Methods** One hundred and four Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, burn group, sepsis group, and sepsis with rhubarb treatment group. All the animals except those in the normal control group were given 30% total body surface area (TBSA) II degree burn on their back followed by endotoxin challenge intraperitoneally in a dose of 20 mg/kg 24 hours after the burn injury. The animals were treated with intraperitoneal injection of ceftriaxone 24 hours after the second hit in various groups in a dose of 60 mg/kg, twice a day with an interval of 12 hours. Rhubarb was also given orally with a dose of 50 mg/kg, twice a day with an interval of 12 hours, at the same time. On 1, 3 and 9 days after treatment, intestinal bacilli in colon and the incidence of bacterial translocation in content of large intestine, liver, lung, mesenteric lymph node and blood in each group were determined. **Results** Neither intestinal bacilli in colon nor bacterial translocation showed significant change after the burn injury [(5.86±0.62) log cfu/g vs. (5.52±0.41) log cfu/g]. The second hit with endotoxin obviously increased the number of intestinal bacilli in colon [(8.96±0.73) log cfu/g, $P<0.01$], in which *Colibacillus* remain the predominant flora. At the same time, the incidence of *Colibacillus* translocation was also very high. The antibiotic ceftriaxone markedly reduced the number of *Colibacillus* on the 3rd and 9th day after the therapy [(4.43±0.64) log cfu/g, (5.82±0.99) log cfu/g, both $P<0.01$]. However, the number of some opportunistic pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Baumannii*, significantly increased, and they substituted *Colibacillus* to become the predominant flora in gut. Furthermore, the species of bacterial translocation also switched to *Pseudomonas aeruginosa* and *Baumannii* from *Colibacillus*. Rhubarb could prevent the loss of enteric bacilli in gut [(8.24±1.32) log cfu/g]. Moreover, it also attenuated the effects of antibiotics in diminishing commensal flora in gut. Lastly, the rhubarb could inhibit bacterial translocation at the early stage of sepsis (incidence of translocation on 1 th day of the therapy: 40.62% vs. 6.25%, $P<0.05$). **Conclusion** Rhubarb can protect the gut microbiogeocoenosis, mitigate the bactericidal effect on antibiotics on commensal flora, and inhibit bacterial translocation at the early stage of sepsis.

【Key words】 rhubarb; bacteria; bacterial translocation; gut; rat

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.005

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

作者单位: 200003 上海, 第二军医大学长征医院急救科

严重创伤、感染、休克时, 强烈的应激反应破坏了胃肠道黏膜屏障功能, 致使肠道细菌及内毒素移位, 导致肠源性脓毒症, 诱发或加剧全身炎症反应综合征 (SIRS), 最终可以引起多器官功能障碍综合征

(MODS)。引起肠源性感染的病原菌是主要存在于肠道共生环境中的条件致病菌,病理情况下广谱抗生素的应用大量杀灭了肠道内的敏感细菌,导致肠道内微生态环境失衡,对抗生素耐药的菌株在肠道内大量繁殖,被选择为优势菌群。然而,临床常用的抗生素对肠道菌群影响的程度以及肠道菌群在抗生素压力下变化规律如何研究报道较少。我们前期的研究表明,大黄能改善胃肠道的血流灌注,保护肠黏膜屏障^[1-3]。本研究应用中大鼠烫伤脓毒症模型观察头孢曲松对肠道菌群的影响,进一步探讨大黄维护胃肠道功能的机制,为肠道耐药菌所致院内感染的防治探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备: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。用戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,将背部浸泡于沸水中 15 s,造成总体表面积 30% Ⅲ 度烫伤,平衡盐液腹腔注射进行复苏。烫伤后 24 h 腹腔内给予内毒素(O111:B4,美国 Sigma 公司产品)进行“二次打击”,总剂量 20 mg/kg,间隔 12 h 均分两次腹腔注射。正常对照组仅给予背部脱毛不予烫伤,以等量生理盐水替代内毒素进行打击,余处理同烫伤组。

1.2 实验分组及给药:按随机数字表法将大鼠分为正常对照组($n=8$)、烫伤组($n=32$)、脓毒症组($n=32$)和大黄组($n=32$)。后 3 组大鼠于致伤 24 h 后腹腔注射头孢曲松(罗氏制药有限公司)120 mg/kg(间隔 12 h 分两次给予),大黄组大鼠则在给予头孢曲松的同时灌胃大黄 50 mg/kg,每日 2 次,其他组灌胃等量生理盐水。烫伤组、脓毒症组、大黄组大鼠分别在治疗前及治疗 1、3、9 d 活杀大鼠,在无菌条件下采集标本。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肠内容物细菌数量:取大鼠距肛门 3~4 cm 处大肠内容物约 0.5 g,以生理盐水 10 倍稀释作为原液,取原液做 1:10、1:100、1:1 000 系列倍比稀释,各浓度取 100 μ l 置于血琼脂、麦康凯和肠球菌平板,做肠杆菌、肠球菌等选择培养,各标本每个浓度做 3 个平板,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:细菌含量(cfu/g)=菌落数 \times 稀释度/肠内容物重量。

1.3.2 肝、肺、肠系膜淋巴结、血液细菌移位率:取肝右叶、左下肺、回盲部肠系膜淋巴结约 0.1 g,加生理盐水进行匀浆;取心脏血 0.5 ml,用生理盐水稀释,分别取稀释液 100 μ l,用血琼脂、麦康凯、肠球菌

平板培养,24 h 后菌落计数。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:采用 SPSS 13.0 统计软件包分析处理,数据以均数 \pm 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,计数资料组间比较采用 χ^2 检验及四格表资料的 Fisher 确切概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄、头孢曲松对肠道杆菌数量的影响(表 1):烫伤组头孢曲松治疗前大肠内容物肠杆菌数量较正常对照组无明显增加;应用头孢曲松治疗 3 d 和 9 d 后,肠杆菌数量较治疗前明显减少(P 均 <0.01)。内毒素“二次打击”后肠杆菌数量较单纯烫伤明显增加($P<0.01$);应用头孢曲松治疗 3 d 和 9 d 后,脓毒症大鼠肠杆菌数量也明显减少(P 均 <0.01)。大黄治疗后大鼠头孢曲松对肠杆菌数量影响较小,但较烫伤组和脓毒症组比较差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。

表 1 大黄和头孢曲松对脓毒症大鼠大肠内容物肠杆菌数量的影响($\bar{x}\pm s$) log cfu/g

组别	动物数	治疗前	治疗 3 d	治疗 9 d
烫伤组	8	5.86 \pm 0.62	3.29 \pm 0.90 ^a	4.30 \pm 0.58 ^a
脓毒症组	8	8.96 \pm 0.73 ^b	4.43 \pm 0.64 ^a	5.82 \pm 0.99 ^a
大黄组	8	8.24 \pm 1.32 ^b	7.45 \pm 1.44 ^{bc}	7.31 \pm 1.61 ^{bc}

注:正常对照组为(5.52 \pm 0.41)log cfu/g;与本组治疗前比较,^a $P<0.01$;与烫伤组比较,^b $P<0.01$;与脓毒症组比较,^c $P<0.01$

2.2 大黄和头孢曲松对肠杆菌种类的影响:烫伤组头孢曲松治疗前大肠内以大肠杆菌为主;烫伤内毒素“二次打击”后肠杆菌种类、数量明显增加,出现了假单胞菌、变形杆菌和其他杆菌;烫伤组和脓毒症组应用头孢曲松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、变形杆菌、鲍曼不动杆菌、阴沟杆菌和其他杆菌(如摩根菌、普罗威登菌、丙二酸阴性枸橼酸杆菌、洛菲不动杆菌等)混杂的菌群。应用大黄治疗后大肠杆菌比例增加,其他菌种、数量显著减少。

2.3 大黄和头孢曲松对各脏器细菌移位率的影响(表 2):烫伤组治疗 1 d 肠道细菌移位率低,肺脏和肠系膜淋巴结各有 1 次阳性细菌培养,菌种为大肠杆菌;治疗 3 d,肠道细菌移位率高,分别移位至肝脏、肺脏、肠系膜淋巴结;治疗 9 d,肠道细菌移位率亦较高,血液中有 2 次阳性培养。3 d、9 d 时 4 个脏器细菌总移位率均较 1 d 时增高,差异有统计学意

义(P 均 <0.05)；从移位菌种上看,由大肠杆菌转变为耐药力较强的院内感染菌如铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌等。

表 2 大黄和头孢曲松对肠道细菌移位的影响

组别	时间 (d)	动物 数	阳性培养动物数				细菌 移位率(%)
			肝脏	肺脏	淋巴结	血液	
烫伤组	1	8	0	1	1	0	6.25
	3	8	3	2	4	0	28.12 ^a
	9	8	0	2	4	2	25.00 ^a
脓毒症组	1	8	3	4	5	1	40.62 ^b
	3	8	0	3	7	1	34.38 ^b
	9	8	3	2	7	0	37.50 ^b
大黄组	1	8	0	1	1	0	6.25 ^c
	3	8	7	3	6	0	50.00 ^a
	9	8	0	2	7	1	31.25 ^a

注:与本组 1 d 比较,^a $P<0.05$;与烫伤组 1 d 比较,^b $P<0.05$;与脓毒症 1 d 比较,^c $P<0.05$

脓毒症组在给予内毒素“二次打击”后 1 d,肠道细菌移位率明显增加,移位菌种为大肠杆菌兼有假单胞菌、变形杆菌等;头孢曲松治疗未进一步加剧肠道细菌移位趋势,但移位的菌种主要为铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌等。脓毒症组治疗后各时间点 4 个脏器细菌总移位率均较烫伤组 1 d 明显增高,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。大黄组治疗 1 d 肠道细菌移位率明显降低($P<0.05$),仅肺脏和肠系膜淋巴结各有 1 次阳性培养;但在 3 d 和 9 d 时仍有较高的细菌移位率。3 d、9 d 时 4 个脏器细菌总移位率均较 1 d 时增高,差异有统计学意义(P 均 <0.05);移位的菌种主要为大肠杆菌,兼有少量肺炎克雷伯杆菌、变形杆菌等。

3 讨论

胃肠道是人体内最大的菌库,其作用之一是通过阻止病原微生物在肠道内的定植维持肠道菌群的平衡,保护人体免受病原菌侵袭^[4]。生理情况下,肠道菌群在肠腔内形成 3 个生物层:深层近黏膜为膜菌群,属专性厌氧菌,由双歧杆菌和乳酸杆菌组成;中层为共栖菌群,以兼性需氧菌为主,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;表层为腔菌群,多为过路菌,有较强的致病力,不能长期定居于肠道,且能被正常肠道生态菌群所阻抑,故细菌数量极少,生理情况下不能致病,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。临床上有些常用的广谱抗生素在胆汁内浓度较

高,其影响的主要是腔菌群和中共栖菌群;对于胆汁内浓度较低的抗生素如碳青霉烯类抗生素,则主要影响膜菌群。因此,广谱抗生素主要的附加损害是肠道菌群的紊乱和二重感染,加重原发病的病理生理过程,严重时促发 MODS^[5]。

本实验中采用了烫伤加内毒素“二次打击”的动物模型,模拟临床上创伤并发脓毒症,应用的广谱抗生素是胆汁内浓度较高的头孢曲松。研究表明,单纯烫伤并未影响大肠内杆菌的构成,但头孢曲松的治疗严重干扰了肠道微生态环境,使肠道共栖菌群大肠杆菌减少或消失,代之以致病力和耐药性均较强的铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌等菌群。内毒素的打击本身即可导致肠道菌群紊乱,不但肠杆菌数量增加而且菌种也增加,出现了假单胞菌、变形杆菌等。其发生机制可能是内毒素影响了肠道的血流灌注,进而影响肠道的蠕动和肠黏膜细胞的分泌功能,导致肠道内非发酵菌大量繁殖,使肠道杆菌数量增加,同时出现菌群紊乱。脓毒症大鼠经头孢曲松治疗后加剧了上述病理生理过程,肠杆菌的数量急剧减少,对头孢曲松敏感的大肠杆菌消失,代之以耐药性较强的铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等非发酵菌。大黄治疗可减弱内毒素和头孢曲松对肠杆菌的影响,大黄治疗后肠杆菌数量下降不显著,且肠道杆菌以大肠杆菌为主,同时铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等非发酵菌增加不显著,说明大黄对肠道内生态菌群有保护作用。其药理机制与大黄可影响大肠内容物内水的重吸收,加强胃肠蠕动功能,一方面使结肠内头孢曲松的药物浓度降低,另一方面又可加快结肠内药物排泄,从而减弱了头孢曲松对肠道菌群的影响等胃肠道作用有关。

我们前期的研究表明,中药大黄对烫伤、失血性和内毒素性休克大鼠肠黏膜屏障有很好的保护作用,提高胃肠黏膜的血流灌注,清除组织内氧自由基,阻止肠道内细菌和内毒素移位^[2,6-7];在临床上亦取得了很好的疗效,目前已有 1 000 多例的临床研究报告^[8-11]。而本实验中主要观察广谱抗生素对烫伤与脓毒症大鼠肠道细菌移位种类的影响以及大黄的疗效。实验表明:单纯烫伤后肠道细菌移位至肝脏、肺脏、肠系膜淋巴结、血液,移位菌种以大肠杆菌为主;给予头孢曲松治疗后细菌移位显著增加,且移位的菌种以铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌多见;内毒素“二次打击”和头孢曲松治疗加剧了上述病理过程,移位率大大提高,移位的菌种与烫伤组相似。本实验结果也验证了一个临床现象,

即创伤早期从体内引流物中培养到病原菌以大肠杆菌多见,而中晚期就以铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌等多见,推测与广谱抗生素对创伤患者肠道菌群的选择作用有一定的关联。建议创伤患者在空腔脏器没有破裂、手术没有污染等情况下,避免预防使用广谱抗生素。

本实验结果还显示,大黄治疗仅在早期对烫伤、内毒素“二次打击”大鼠的肠道细菌移位有抑制作用,而在广谱抗生素治疗的中后期不能有效抑制肠道细菌移位。原因之一可能是广谱抗生素杀灭了肠道内大量敏感菌群,破坏了肠道内微生物屏障;同时,被抗生素杀死的肠道细菌可释放大量内毒素,引起肠黏膜血流量进一步减少,肠绒毛顶端内皮细胞因缺血、缺氧加重而出现坏死和通透性增加,加重肠道机械屏障的破坏,有利于细菌移位的发生^[12]。因此,严重创伤患者须早期应用大黄治疗,保护肠道微生态环境和肠黏膜屏障,中晚期一旦出现感染性并发症,大黄的临床疗效将受一定影响。

综上所述,烫伤、脓毒症大鼠给予头孢曲松治疗后肠道菌群紊乱,肠道杆菌由生理情况的大肠杆菌转变以铜绿假单胞菌为主,肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌等混杂的肠道菌群,细菌移位的发生率亦明显增加,铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌等移位至肝、肺、肠系膜淋巴结和血液等。大黄对创伤、脓毒症大鼠的肠道生态菌群有保护作用,抑制铜绿假单胞

菌等被选择为优势菌群,在脓毒症早期能抑制肠道细菌的移位。

参考文献

- [1] 陈德昌,景炳文,张翔宇,等. 大黄对肠黏膜屏障的保护作用. 中国危重病急救医学,1994,6(6):329-331.
- [2] 陈德昌,杨建东,景炳文,等. 大黄对大鼠肠黏膜及肠血管通透性的影响. 中国危重病急救医学,1997,9(7):385-388.
- [3] 陈德昌,杨兴易,姜兴禄,等. 大黄对胃肠道血流灌注影响的临床与实验研究. 中国中西医结合杂志,2000,20(7):515-518.
- [4] Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JL. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu Rev Nutr, 2002, 22: 283-307.
- [5] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. World J Surg, 1996, 20(4): 411-417.
- [6] 乔林,陈德昌,景炳文. 大黄对烫伤大鼠肠黏膜上皮细胞线粒体呼吸链的影响. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(1):17-20.
- [7] 陈德昌,李红江. 大黄对烫伤后大鼠体内氧自由基的清除作用. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(1):21-23.
- [8] 陈德昌,景炳文,杨兴易,等. 大黄对创伤后危重病患者脓毒症治疗作用的研究. 中华创伤杂志,2003,19(1):17-19.
- [9] 陈德昌,杨兴易,景炳文,等. 大黄对多器官功能障碍综合征治疗作用的临床研究. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):6-8.
- [10] 陈德昌,景炳文,焦东海. 大黄治疗急性胰腺炎的疗效观察. 中国中西医结合急救杂志,1994,1(1):8-10.
- [11] 陈德昌,杨兴易,李红江,等. 大黄对危重病患者胃肠道并发症的治疗研究. 中华急诊医学杂志,2001,10(3):164-167.
- [12] 李志军,汤日波,张万祥. 肠道屏障功能损害与 SIRS/ MODS 的发生及其防治. 中国危重病急救医学,2000,12(12):766-768.

(收稿日期:2008-09-11 修回日期:2008-12-10)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

预测脓症患者发生器官功能障碍和死亡的一组标记物

美国学者对急诊科的 971 例疑似脓症患者开展了一项前瞻性、多中心研究。其中发生严重脓毒症占 52%,脓毒性休克占 39%,在院病死率为 7%;并筛选出中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白、蛋白 C 和白细胞介素-1 受体拮抗剂 3 个指标用作预测脓毒症的预后。将这 3 个标志物作为脓毒症评分,衡量其准确性的曲线下面积分别为:严重脓毒症 0.80、脓毒性休克 0.77、死亡 0.79。当引入多元模式与临床变量时,这 3 项指标的脓毒症评分呈高度相关性。结果显示,中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白、白细胞介素-1 受体拮抗剂以及蛋白 C 可以用来预测急诊科疑似脓症患者发生严重脓毒症、脓毒性休克及死亡的风险。研究者认为,有必要进一步验证这些生物标志物是否可以用于临床对疑似脓症患者发生脓毒症的风险进行分层评估。

王瑞晨,编译自《Crit Care Med》,2008-11-28(电子版);胡森,审校

活化蛋白 C 改善内毒素介导的心血管功能障碍

美国学者最近对活化蛋白 C(APC)在大鼠内毒素休克模型中的抗炎作用和细胞保护作用进行了研究。他们给大鼠按 10 mg/kg 注射内毒素导致大鼠发生内毒素休克,4 h 后输注含 APC 的盐水;连续观测大鼠的血流动力学参数,并检测肌肉氧分压、一氧化氮、超氧负离子、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞浸润及心脏和大动脉的基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性。结果发现,APC 能部分抑制内毒素导致的血压下降,提高动脉反应性和心肌收缩能力,同时伴有核转录因子- κ B、iNOS 和 MMP-9 上调,降低内毒素导致的组织一氧化氮增加,还可降低组织淋巴细胞浸润和激活。研究者认为,APC 通过调节内毒素介导的促炎反应和氧化应激状态,降低血管内皮和白细胞相互作用以及稳定细胞外基质等作用,提高心血管功能。

王瑞晨,编译自《Crit Care Med》,2008-11-28(电子版);胡森,审校