

抗生素治疗大鼠急性胰腺炎后肠道真菌的变化与易位的关系

石承先, 陈喜

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)并发真菌感染占全部SAP感染患者的40%-70%,病死率高达20%-53.1%。导致SAP患者中后期真菌感染的因素是多方面的,多数学者认为重要的原因可能与广谱抗生素的长时间使用有关。在真菌感染的防治方面,大多数学者主张在临床明确真菌感染的依据后才开始抗真菌治疗,但疗效不甚满意,死亡率仍然很高。

石承先, 陈喜, 贵州省人民医院肝胆胰外科 贵州省贵阳市550002

通讯作者: 石承先, 主任医师, 550002, 贵州省贵阳市中山东路, 贵州省人民医院肝胆胰外科, chengxianl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-15 修回日期: 2009-09-07

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-18

Relationship between multiplication and translocation of intestinal fungi in rats with acute pancreatitis after antibiotic treatment

Cheng-Xian Shi, Xi Chen

Cheng-Xian Shi, Xi Chen, Department of Hepato-pancreato-biliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Correspondence to: Cheng-Xian Shi, Department of Hepato-pancreato-biliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Zhongshan East Road, Guiyang 550002, Guizhou Province, China. chengxianl@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-15 Revised: 2009-09-07

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the multiplication and translocation of intestinal fungi in rats with acute pancreatitis (AP) after antibiotic treatment.

METHODS: AP was induced in rats by intraperitoneal injection of caerulein. The model rats were then divided into five groups (six rats in each group) and treated with cefoperazone-sulbactam for 3, 6, 9, 12 and 15 days, respectively. Normal rats were used as controls. At the end of the treatment, the rats were killed to take colonic mucosa, mesentery, lungs and pancreas for fungal culture. Serum (1, 3)- β -D-glucan was measured.

RESULTS: After three days of treatment, the number of intestinal fungi and serum (1, 3)- β -D-glucan level began to increase. On day 6, the number of intestinal fungi and serum (1, 3)- β -D-glucan level were significantly higher in the treat-

ment group than in the control group ($P < 0.05$). On day 9, the detection rates of fungi in the mesentery, lungs and pancreas were significantly higher in the treatment group than in the control group (all $P < 0.05$). The multiplication of intestinal fungi was positively correlated with intestinal fungal translocation and serum (1, 3)- β -D-glucan level ($r = 0.8972$ and 0.7970 , respectively).

CONCLUSION: The multiplication and translocation of intestinal fungi are significant on days 6 to 9 in rats with AP after antibiotic treatment. Prophylactic antifungal therapy is reasonable during this period and measurement of serum (1, 3)- β -D-glucan is helpful for early diagnosis of fungal infection.

Key Words: Acute pancreatitis; Antibiotics; Fungal translocation; (1, 3)- β -D-glucan; Rat

Shi CX, Chen X. Relationship between multiplication and translocation of intestinal fungi in rats with acute pancreatitis after antibiotic treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(26): 2714-2717

摘要

目的: 观察急性胰腺炎(AP)大鼠使用抗生素治疗后, 肠黏膜真菌和血清1-3- β -D葡聚糖的变化与真菌易位的关系。

方法: 采用雨蛙素(Cerulein)腹腔注射法复制大鼠急性水肿性胰腺炎模型。对成功复制AP模型的大鼠(治疗组)使用头孢哌酮舒巴坦治疗, 分别治疗3, 6, 9, 12及15 d, 按观察时间随机分为5个亚组, 每亚组6只。对照组为正常大鼠。观察期间正常喂食。分别于相同时间点处死2组动物并取相应的肠组织、肠系膜、肺和胰腺组织进行真菌培养, 测定血清1-3- β -D葡聚糖含量。

结果: 与对照组相比, 治疗组大鼠在抗生素治疗3 d后, 肠道真菌数量开始增加, 于第6天后肠道真菌和血清1-3- β -D葡聚糖的含量增加明显($P < 0.05$), 第9天后肠外组织真菌检出率明显增加($P < 0.05$)。血清1-3- β -D葡聚糖含量随着

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

肠道真菌数量和真菌易位的增加而增加, 肠道真菌增殖与肠道真菌易位和血清1-3- β -D葡聚糖水平之间均呈正相关($r = 0.8972$ 和 0.7970).

结论: 使用抗生素治疗AP 6-9 d后, 肠道真菌增殖和易位明显, 此时预防使用抗真菌药物是合理的, 血清1-3- β -D葡聚糖检测有助于早期诊断真菌感染.

关键词: 急性胰腺炎; 抗生素; 真菌易位; 1-3- β -D葡聚糖; 大鼠

石承先, 陈喜. 抗生素治疗大鼠急性胰腺炎后肠道真菌的变化与易位的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(26): 2714-2717
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2714.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)尤其是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP), 并发症多, 病死率高, 其中中后期病死率的80%由感染引起, 真菌感染又是感染的主要原因之一, 占全部SAP感染患者的40%-70%, 病死率高达20%-53.1%^[1-3]. 导致SAP患者中后期真菌感染的因素是多方面的, 除肠黏膜屏障功能障碍、导管引起感染等外, 多数学者认为重要的原因可能与广谱抗生素的长时间使用有关^[4-5]. 在真菌感染的防治方面, 大多数学者主张在临床明确真菌感染的依据后才开始抗真菌治疗, 但疗效不甚满意, 死亡率仍然很高^[4-6]; 有少数学者报道临床预防性使用抗真菌药物, 死亡率可降低至15%^[7], 但在什么时候使用抗真菌药物最为适宜, 各家报道不一. 本实验通过对AP模型大鼠使用头孢哌酮舒巴坦治疗, 观察肠道真菌增殖和血清1-3- β -D葡聚糖的变化与肠真菌易位的关系, 探讨在使用抗生素治疗AP时预防全身真菌感染的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠60只, 雌雄各半, 体质量200 \pm 20 g, 购于重庆龙鑫实验动物中心. 雨蛙素为广州伟伯化工有限公司进口试剂.

1.2 方法

1.2.1 分组: 实验大鼠随机分为2组: 对照组和治疗组, 每组30只. 每组根据观察时间3, 6, 9, 12和15 d又分为5个亚组, 每个亚组6只. 对照组仅给予正常饲料(贵阳医学院动物中心)喂食; 治疗组复制急性水肿性胰腺炎模型, 然后使用抗生素治疗, 并正常喂食.

1.2.2 动物模型的复制和处理: 采用雨蛙素腹腔注射法复制AP大鼠^[5,8]. 用生理盐水将雨蛙素浓度调为2 mg/L. 固定大鼠四肢于操作板上, 备皮, 碘伏消毒腹部皮肤, 垂直进针, 按照35 μ g/kg的标准注射药物, 每小时1次, 连续7 h共7次, 注射间隙给予大鼠正常喂食. 按照上述方法成功复制AP动物模型后, 随机将模型动物分为5个亚组, 经动物尾静脉注入头孢哌酮舒巴坦(1:1, 1 g, 清华紫光制药厂生产, 批号200802133)34 g/kg, 分2次间隔12 h注入, 直至分别到3, 6, 9, 12和15 d处死动物为止. 期间给予大鼠正常喂食. 上述2组大鼠分别按照观察时间3, 6, 9, 12和15 d, 采用乙醚麻醉后, 抽取尾静脉血作标本; 剖腹, 以回盲部为解剖标志, 在回盲部远端15 cm(大约为大鼠乙状结肠部位)切取肠组织长约1 cm为标本, 同时沿肠系膜剪下整个肠系膜组织、切取肺和胰腺组织等作为真菌培养的标本. 整个操作过程严格按照无菌要求进行.

1.2.3 观察大鼠一般情况: 观察大鼠的精神状况、进食、活动情况等.

1.2.4 肠道真菌培养: 将结肠标本用生理盐水5 mL洗净肠内容物, 将洗净的肠壁置于10 mL生理盐水中, 搅拌约5 min(A), 取A中的盐水1 mL, 稀释至10 mL(B), 用接种环取1环B液约1 μ L, 均匀涂抹于沙氏培养基及显色培养基(郑州博赛生物技术有限公司)上, 于37 $^{\circ}$ C温箱中培养48 h, 计数真菌菌落个数, 乘稀释倍数得出此肠管真菌个数(个/cm²), 对真菌个数取对数值后记录.

1.2.5 肠系膜、肺和胰腺组织真菌培养: 分别将肠系膜、肺和胰腺组织加入1 mL生理盐水研磨至匀浆, 将匀浆液加入肉汤培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养36 h, 若肉汤培养基出现浑浊, 再取出2 mL培养液, 用10% KOH 2 mL混合摇匀5 min杀灭细菌后, 取接种环1环, 接种于沙氏培养基及显色培养基上进行真菌培养. 记录真菌培养阳性例数.

1.2.6 检测血清1-3- β -D葡聚糖: 采各组大鼠静脉血3 mL, 缓慢放入无热源离心管中, 用灭菌铝箔封闭管口以防污染, 3000 r/min离心60 s, 分离得血清, -30 $^{\circ}$ C保存. 取上述血清0.1 mL, 加入装有0.9 mL的样品处理液中, 混匀后70 $^{\circ}$ C保温10 min, 取出后立刻放入冰水浴中, 即为待测血清样品. 采用MB-80微生物快速检测系统及1-3- β -D葡聚糖试剂盒(北京金山生物技术公司)方法检测, 在中国人民解放军南京军区总医院中心实验室^[9]进行. 按试剂盒说明公式将吸光度值换算成1-3- β -D葡聚糖浓度. 操作在生物安全柜中进行,

■研发前沿

SAP时使用抗生素后, 肠道真菌发生什么变化及其与真菌易位的关系并不清楚, 在什么时候开始使用抗真菌药物最为适宜, 各家报道不一, 成为研究热点.

■创新盘点

本研究发现, 应用抗生素治疗AP时, 6 d后肠道真菌增殖迅速, 9 d后真菌易位日趋明显, 并与血清1-3- β -D葡聚糖水平呈正相关, 提示在使用抗生素治疗AP 6-9 d后, 预防使用抗真菌药物抑制肠道真菌的过度增殖, 对预防AP时全身真菌感染应该是合理的, 血清1-3- β -D葡聚糖水平对早期诊断全身真菌感染有帮助.

■应用要点

本研究为临床预防使用抗真菌药物提供了理论依据,提示在使用抗生素治疗AP 6-9 d后,预防使用抗真菌药物防止AP发生全身真菌感染应该是合理的,有待进一步在临床研究。

表 1 大鼠肠道真菌的变化 (mean ± SD)

	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	4.15 ± 0.25	4.31 ± 0.34	4.41 ± 0.47	4.77 ± 0.18	4.50 ± 0.41
治疗组	4.56 ± 0.05	6.99 ± 0.06 ^{ac}	9.89 ± 0.07 ^{ac}	9.98 ± 0.02 ^{ac}	10.03 ± 0.04 ^{ac}

^a*P* < 0.05 vs 对照组; ^c*P* < 0.05 vs 治疗组3 d.

遵守无菌原则。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件分析处理。肠道真菌数和1-3-β-D葡聚糖含量以mean ± SD表示,组内和组间比较采用方差分析。肠外组织培养阳性例数比较采用 χ^2 检验。肠道真菌数量变化与血清1-3-β-D葡聚糖水平之间相关性采用Spearman秩相关分析,肠真菌移位与血清1-3-β-D葡聚糖水平的相关性使用回归分析。*P* < 0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 动物一般情况的变化 对照组大鼠精神、进食正常。治疗组动物萎靡,进食和活动均减少。

2.2 肠道真菌的变化 对照组大鼠肠黏膜存在少量真菌,治疗组大鼠从使用抗生素第3天开始出现肠黏膜真菌增殖,第6天后真菌数量增加明显(*P* < 0.05),其中6-9 d肠道黏膜真菌数量增加趋势较快(表1)。

2.3 肠道真菌易位的变化 治疗组大鼠在使用抗生素6 d后开始出现肠道真菌易位于肠系膜和胰腺组织,9 d后真菌易位明显(*P* < 0.05),15 d时治疗组在培养的18份标本中有16份为阳性(表2)。

2.4 血清1-3-β-D葡聚糖的变化 治疗组大鼠随着使用抗生素时间的延长,血清1-3-β-D葡聚糖水平逐渐增加,6 d以后其水平较第3天明显增加(*P* < 0.05)。对照组除仅在15 d时出现升高外(*P* > 0.05),其余时间没有明显变化(表3)。

2.5 肠道真菌增殖与真菌易位和血清1-3-β-D葡聚糖水平之间的关系 肠道真菌易位的增加和血清1-3-β-D葡聚糖水平的上升,是随着肠道真菌增殖的增加而增加,肠道真菌增殖与肠道真菌易位和血清1-3-β-D葡聚糖水平之间均呈正相关(*r* = 0.8972和0.7970),其中与肠系膜组织易位高度相关(*r* = 0.9898)。肠道真菌易位与血清1-3-β-D葡聚糖水平亦呈正相关(*r* = 0.7132)。

3 讨论

肠道真菌是机体体内的正常菌群,约占细菌总数的1%-3%,大约70%的健康人群能够检测出真

表 2 治疗组中5亚组大鼠肠外组织真菌培养结果

	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
肠系膜组织	0	2	4	4	5
胰	0	1	4	4	5
肺	0	0	2	4	6
合计	0	3	10 ^a	12 ^a	16 ^a

^a*P* < 0.05 vs 3, 6 d亚组。

菌^[2,10]。一般情况下,肠道正常菌群可以对真菌的生长起到抑制作用,使得真菌数量相对恒定。但是当某些因素使肠道菌群失调,打破菌群间的相互平衡后,真菌便可以大量繁殖,甚至发生向肠外组织易位,导致全身真菌感染^[4,11-12]。多数学者认为,肠道真菌是全身真菌感染的来源^[12]。SAP状态下,肠黏膜屏障作用减弱,机体免疫功能下降,尤其是抗生素的大量使用杀灭了大量的肠道正常菌群,可以导致肠道菌群失调,肠道真菌因而大量繁殖是发生肠外易位导致全身真菌感染的基础^[4,10,12]。目前,绝大多数学者认为感染尤其是真菌感染是SAP后期死亡的重要原因之一^[2]。本研究发现,正常动物肠道真菌相对恒定,但是在AP使用抗生素后肠道真菌增加,尤其是在6 d后这种增加更为显著,相应的在9 d后真菌易位日趋明显,在15 d时18个组织器官真菌培养时竟然有16个为阳性,提示在AP时,使用抗生素可以导致肠道真菌大量增殖,当真菌数量达到一定水平后便可能发生肠外易位,这可能是引起全身真菌感染的主要原因;在使用抗生素治疗AP 6-9 d后,预防使用抗真菌药物抑制肠道真菌的过度增殖,对预防AP时全身真菌感染应该是合理的,有待进一步在临床研究。

所有真菌的细胞膜上都含有1-3-β-D葡聚糖,占真菌细胞干重的70%以上^[6,13-14],当真菌侵入血液中被中性粒细胞吞噬、消化处理后,葡聚糖成分便被释放入血。因此在机体的体液中能够检测到1-3-β-D葡聚糖,是诊断深部真菌感染的有效依据^[6,10,15]。有报道在真菌开始肠外易

表 3 大鼠血清1-3-β-D葡聚糖的变化 (ng/L, mean ± SD)

	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照组	4.42 ± 1.15	5.27 ± 1.13	6.72 ± 2.01	3.98 ± 0.63	22.07 ± 24.19
治疗组	5.42 ± 1.08	24.71 ± 8.01 ^a	147.13 ± 47.89 ^a	541.11 ± 878.68 ^a	653.29 ± 285.16 ^a

^aP<0.05 vs 3 d亚组。

位时, 尽管此时临床患者并没有出现真菌感染的症状, 血清葡聚糖就可以有明显的升高, 因此葡聚糖对早期诊断临床真菌感染方面有重要作用^[9,16]。本实验显示, 正常动物肠道真菌数量相对稳定, 血清1-3-β-D葡聚糖水平波动也不大; AP时使用抗生素后肠道真菌数量逐渐增加, 于6 d后增加明显, 相应的9 d后肠道真菌易位至肠外器官也显著增加, 血浆1-3-β-D葡聚糖水平在此时也明显上升, 提示检测血清1-3-β-D葡聚糖含量对早期诊断真菌感染是有帮助的。

4 参考文献

- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28: 108-121
- Hoerauf A, Hammer S, Müller-Myhsok B, Rupprecht H. Intra-abdominal *Candida* infection during acute necrotizing pancreatitis has a high prevalence and is associated with increased mortality. *Crit Care Med* 1998; 26: 2010-2015
- 孔雷, 汤耀卿, 韩天权, 雷若庆, 张圣道. 重症急性胰腺炎并发神经精神障碍55例. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2239-2241
- 陈尔真, 黄小林, 袁祖荣, 张圣道. 48例重症急性胰腺炎合并真菌感染的临床分析. *中华医院感染学杂志* 2004; 14: 759
- Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 1985; 88: 1192-1204
- Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A, Ito A. Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345: 17-20
- 刘宗师, 陈裕胜, 吴晓琴. 危重患者并发深部真菌感染的早期治疗. *广州医药* 2007; 38: 19-21
- 刘兴, 陈怀仁, 杨得同, 杨建忠, 黄兴乐. 蛙皮素致小鼠急性坏死性胰腺炎模型. *南京铁道医学院学报* 1996; 15: 286
- 于宝军, 李幼生, 黎介寿. 体液内毒素及深部真菌快速定量检测方法. *肠外与肠内营养* 2005; 12: 76-78
- 滕维压, 狄惠芝. 深部真菌感染研究进展. *中华医院感染学杂志* 1999; 9: 62-64
- Eggimann P, Jamdar S, Siriwardena AK. Pro/con debate: antifungal prophylaxis is important to prevent fungal infection in patients with acute necrotizing pancreatitis receiving broad-spectrum antibiotics. *Crit Care* 2006; 10: 229
- 秦帅, 汤耀卿, 瞿洪平, 刘伟, 毛恩强. 重症急性胰腺炎合并深部真菌感染易感因素剖析. *外科理论与实践* 2001; 6: 96-99
- 李军, 席丽艳. 真菌抗原成分及代谢产物在系统性真菌感染诊断方面的应用进展. *国外医学·皮肤性病学分册* 2004; 30: 253-255
- 廖军, 郝飞, 钟白玉, 王莉, 王鲁. 大鼠实验性系统性白念珠菌感染血浆β-D-葡聚糖检测初报. *临床皮肤科杂志* 2003; 32: 373-375
- Adler-Moore JP, Olson JA, Proffitt RT. Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1096-1102
- 李世荣, 王红, 文艳. 血浆(1-3)-β-D-葡聚糖与抗深部白色念珠菌感染药物疗效关系的实验研究. *临床和实验医学杂志* 2007; 6: 20

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

■同行评价

本研究设计合理, 所得结果符合临床实际, 对临床治疗有指导意义。

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》 2007年影响因子0.568

本刊讯 2007年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-09-18)