

· 基础论著 ·

微生物酵素对抗生素相关性肠黏膜屏障损伤大鼠的保护作用

孙莉波 李宁 张海涛 周京安 陈涛 刘秀红

【摘要】 目的 观察应用微生物酵素对大鼠抗生素(克林霉素磷酸酯)相关性肠黏膜屏障损伤的保护作用。**方法** 制备大鼠抗生素相关性腹泻模型,分别对抗生素相关性腹泻组与微生物酵素喂养组模型的下腔静脉血行 D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)测定、细菌培养以及肝脏组织和肠系膜淋巴结行组织细菌培养、回肠内容物菌群培养、回肠末端行病理检查并评分,将两组数据进行统计学分析。**结果** 与单用抗生素组相比,微生物酵素喂养组大鼠于第 7 天时血浆中 DAO 和 D-乳酸水平显著降低($P < 0.05$),肠内容物中大肠埃希菌(7 d, $P < 0.01$)和肠球菌(7 d, $P < 0.05$)显著减少,乳酸杆菌(5 d, $P < 0.05$; 7 d, $P < 0.01$)和双歧杆菌(5 d, 7 d, $P < 0.01$)显著增多,7 d 时肝脏和肠系膜淋巴结的培养阳性率显著降低($P < 0.05$),下腔静脉血细菌培养阳性率无显著差异,7 d 时回肠病理评分显著降低($P < 0.01$)。**结论** 应用抗生素(克林霉素磷酸酯)可以造成肠道菌群紊乱及肠黏膜屏障损害,导致肠道黏膜上皮通透性升高,菌群易位以及肠外器官的损伤。加用微生物酵素可加强肠黏膜屏障,降低肠道的通透性,减少菌群易位,预防肠源性感染的发生。

【关键词】 微生物酵素;抗菌药;菌群失调;二胺氧化酶;D-乳酸

Protective effects of microbial ferment on intestinal barrier in rats with antibiotic-associated injury SUN Li-bo, LI Ning, ZHANG Hai-tao, ZHOU Jing-an, CHEN Tao, LIU Xiu-hong. Beijing You-an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: LI Ning, Email: lnbjya@163.com

【Abstract】 Objective To observe the antibiotic (clindamycin phosphate) induced injury of intestinal barrier and the protection of microbial ferment on antibiotic-associated injury of intestinal barrier in rats. **Methods** Total of 63 male healthy SD rats were randomly distributed into 3 different groups: blank control (BC group), antibiotic-induced injury group (AB group), antibiotic-induced injury and protection of microbial ferment group (AB + BF group). AB group and AB + BF group were

divided into 1, 3, 5, 7 days groups, respectively. Rats in AB group and AB + BF group were injected with Clindamycin Phosphate 120 mg/kg subcutaneously, twice per day in the following 7 days, and the AB + BF group were feeded with 1 g microbial ferment, twice per day in the following 7 days. The serum concentrations of D-lactic and diamine oxidase (DAO) were measured at 1, 3, 5, 7 days, respectively. The microbial floras in ileum were cultivated and counted. Liver tissue, mesenterium lymphaden and blood were cultivated. The pathological changes of terminal ileum tissue were observed. SPSS 11.5 software was used for statistical analysis. **Results** Compared with AB group, indexes in AB + BF group were as following: the serum concentrations of DAO and D-lactic were significantly lower ($P < 0.05$), *Escherichia coli* (7 days, $P < 0.01$) and *Enterococci* (7 days, $P < 0.05$) in ileum significantly decreased, *Bacillus acidi lactici* (5 days, $P < 0.05$; 7 days, $P < 0.01$) and *Bacillus bifidus* (5 days, 7 days, $P < 0.01$) increased, the cultivation positive rates of liver and mesenteric lymphonodi decreased (7 days, $P < 0.05$), the cultivation positive rates were not significantly different, the pathological scores of terminal ileum tissue were much lower (7 days, $P < 0.01$). **Conclusions** Long period (at least 5-7 days) application of antibiotics (clindamycin phosphate) could induce disorder of microbial floras and injury of intestinal barrier, increase intestinal tract permeability, cause bacterium translocation and another organ inflammatory injury. The application of microbial ferment could strengthen intestinal tract barrier including mechanical barrier, immunologic barrier, chemistry barrier, ecological barrier, also decrease permeability of intestinal tract and bacterium translocation and prevent gut derived infection.

【Key words】 Microbial ferment; Antibiotics; Disorder of microbial floras; Diamine oxidase (DAO); D-lactic

抗生素相关性腹泻、抗生素相关性肠炎常发生于腹部手术和应用广谱抗生素的患者,尤以危重症及免疫功能低下患者多见。其发生的主要原因为广谱抗生素使用不当导致的菌群失调、肠道屏障受损,进而引起菌群、内毒素移位,激发细胞因子和其他炎性介质连锁释放,引起肠源性感染及全身各器官的损害,如果处理不当将会导致中毒性休克,甚至危及患者生命。随着近年来研究的深入,肠屏障的功能保护在预防感染中的作用愈发突出,肠道生物屏障保护也愈加受到重视,而微生物制剂的应用也已成为新近的研究热点。本次研究通过复制抗生素相关性腹泻大鼠模型来了解抗生素所致肠道菌群失调对肠黏膜屏障损伤情况,并了解应用微生物酵素(microbial ferment)对肠黏膜屏障的保护作用。

材料和方法

一、实验动物与分组

63 只健康雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 280 g,购自军事医学科学院实验动物中

心。采用抽签法随机分为 3 组:空白对照组(BC 组)7 只,单用抗生素组(AB 组)28 只,使用抗生素 + 微生物酵素组(AB + BF 组)28 只;后两组又随机分为 1 d、3 d、5 d、7 d 四个时间点亚组,每个时间点各 7 只大鼠。大鼠于实验室适应性的喂养 7 d,单笼饲养,自由饮高压灭菌水,进食⁶⁰Co 照射灭菌标准大颗粒食料(军事医学科学院实验动物中心生产)。

二、主要试剂与设备

克林霉素磷酸酯(华北制药)、DAO 和 D-乳酸检测试剂盒(美国 Sigma 公司)、微生物酵素(日本岛本微生物工业株式会社)。紫外分光光度计(美国 Beckman 公司)、低温高速离心机(KUOTA5900)、漩涡混合器(江苏海门医用仪器厂)、Thermoforma 超低温冰箱(美国)、TGL-16c 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、Olympus BH-2 光学显微镜(日本)、Olympus BX50 照相显微镜系统(日本)、高速台式离心机(TGL-16C,上海安亭科学仪器厂)。

三、方法

1. 实验动物的处理:空白对照组(BC 组):BC 组大鼠未给予任何损伤和处理,实验开始后即处死进行检测。抗生素组(AB 组):克林霉素磷酸酯(120 mg/kg) + 0.3 ml 生理盐水,皮下注射,2 次/d。生理盐水 2 ml/次灌胃,2 次/d。抗生素 + 微生物酵素组(AB + BF 组):克林霉素磷酸酯(120 mg/kg) + 0.3 ml 生理盐水,皮下注射,2 次/d。微生物酵素 2 ml/次灌胃,2 次/d。

2. 标本采集和处理:(1)无菌条件下使用肝素抗凝管留取 4 ~ 5 ml 血液,离心后取血浆分装, -80℃ 保存用于二胺氧化酶(DAO)^[1,2]、D-乳酸^[3]的测定。无菌留取血液 2 ml,用于血液细菌培养。(2)打开回盲部,无菌条件下取回盲部内容物 0.5 g,进行 10 倍系列稀释到 10^{-9} ,分别取 10^{-9} ~ 10^{-3} 的细菌稀释液 50 μ l 接种在选择性培养基^[4](双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌和麦康凯培养基)上,厌氧菌培养基 37℃ 温箱中厌氧培养 48 h 后计数,将 EC 及 EMB 直接置于 37℃ 温箱中需氧培养 24 h 后计数,行革兰染色镜检及生化鉴定。

3. 组织及血液细菌学培养:无菌操作,取肝、肠系膜淋巴结组织各约 0.5 g,分别用无菌玻璃匀浆器研磨成组织匀浆,取 200 μ l 组织匀浆液和 200 μ l 下腔静脉血涂于血平板和麦康凯平板各 2 块,37℃ 温箱中孵育 24 h,计数菌落数并涂片,行革兰染色镜检、生化鉴定。凡组织匀浆液和血液中培养出 3 个或以上细菌即判为细菌易位阳性。

4. 组织形态学检查:光镜观察:距回盲部 5 cm 处取长约 1 cm 回肠组织,标本切片、苏木精伊红(HE)染色后在 100/400 倍光镜下观察肠黏膜的变化。每个标本随机观察 5 个视野,对每个视野按改良 Chiu 氏法进行肠黏膜损伤分级和评分^[5],以 5 个视野的均分作为每个标本的评分值。评分过程由同一病理科医生在单盲状态下完成。

三、统计学处理

所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 11.5 软件进行统计学处理,

血浆 DAO 和 D-乳酸浓度、肠道菌群结果、回肠病理学评分进行 t 检验;多组间参数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),若差异有显著性意义,再进一步行两两比较的 q 检验;淋巴结和肝脏培养结果、下腔静脉血培养结果进行 $Chi-square$ 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

结 果

一、血浆 DAO 和 D-乳酸的变化

加用微生物酵素后,大鼠血浆 DAO 与 D-乳酸浓度较 AB 组降低,7 d 时组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 血浆 DAO 与 D-乳酸浓度分析($\bar{x} \pm s$)

组别	DAO(U/ml)	D-乳酸($\mu\text{g/ml}$)
BC	0.13 \pm 0.06	1.42 \pm 0.09
AB(1 d)	0.18 \pm 0.08	2.76 \pm 1.32
AB(3 d)	0.27 \pm 0.09	2.91 \pm 2.02
AB(5 d)	0.31 \pm 0.14	4.08 \pm 2.57
AB(7 d)	0.48 \pm 0.24	6.87 \pm 3.70
AB + BF(1 d)	0.14 \pm 0.05	1.56 \pm 0.52
AB + BF(3 d)	0.23 \pm 0.10	2.45 \pm 0.79
AB + BF(5 d)	0.25 \pm 0.16	2.95 \pm 1.83
AB + BF(7 d)	0.31 \pm 0.18 ^a	4.18 \pm 1.45 ^a

注:相同时间点两组间比较,^a表示 $P < 0.05$

二、肠道内容物中菌群变化

长时间使用抗生素可导致乳酸杆菌和双歧杆菌减少,大肠埃希菌和肠球菌增多,而使用微生物酵素后,随时间延长,大肠埃希菌、肠球菌逐渐下降,乳酸杆菌、双歧杆菌逐渐增多,5~7 d 时差异具有统计学差异,见表 2。

表 2 肠内容物菌群培养结果分析(\log_{10} CFU, $\bar{x} \pm s$)

组别	大肠埃希菌	肠球菌	乳酸杆菌	双歧杆菌
BC	4.97 \pm 0.25	5.19 \pm 0.32	8.13 \pm 0.35	7.57 \pm 0.58
AB(1 d)	4.94 \pm 0.26	5.27 \pm 0.34	7.80 \pm 0.56	7.28 \pm 0.54
AB(3 d)	5.18 \pm 0.37	4.96 \pm 1.45	7.35 \pm 0.42	6.91 \pm 0.35
AB(5 d)	5.68 \pm 0.31	5.92 \pm 0.38	6.98 \pm 0.56	6.57 \pm 0.36
AB(7 d)	6.43 \pm 0.52	5.94 \pm 0.53	6.44 \pm 0.41	5.92 \pm 0.33
AB + BF(1 d)	5.02 \pm 0.39	5.28 \pm 0.34	7.87 \pm 0.47	7.33 \pm 0.44
AB + BF(3 d)	5.05 \pm 0.37	5.32 \pm 0.34	7.39 \pm 0.38	7.16 \pm 0.38
AB + BF(5 d)	6.05 \pm 0.20 ^a	5.69 \pm 0.40	7.58 \pm 0.44 ^a	7.33 \pm 0.56 ^b
AB + BF(7 d)	5.81 \pm 0.29 ^b	5.25 \pm 0.48 ^a	7.93 \pm 0.51 ^b	7.52 \pm 0.66 ^b

注:相同时间点两组间比较,^a表示 $P < 0.05$,^b表示 $P < 0.01$

三、肝脏及肠系膜淋巴结培养结果

应用抗生素后肝脏和肠系膜淋巴结组织培养阳性率 14.29% ~ 85.71%, 阳性率随应用天数增加而升高; AB + BF 组与 AB 组相比, 组织培养阳性率(0 ~ 42.86%)降低, 其在第 7 天时差异具有统计学意义(42.86% vs 85.71%, $P < 0.05$), 见表 3。

四、下腔静脉血培养结果

AB 组与 AB + BF 组下腔静脉血培养阳性率为 0 ~ 85.71%, 随抗生素应用天数增加而增高。AB 组与 AB + BF 组以及各亚组比较差异无统计学意义, 表 3。

表 3 组织培养阳性率、血培养阳性率、回肠组织学评分结果

组别	组织培养阳性率(%)	血培养阳性率(%)	组织学评分($\bar{x} \pm s$)
BC	7.14	0.00	0.14 ± 0.38
AB(1 d)	14.29	14.29	1.14 ± 1.07
AB(3 d)	35.71	0.00	2.43 ± 0.98
AB(5 d)	57.14	42.86	3.86 ± 1.07
AB(7 d)	85.71	85.71	6.43 ± 1.90
AB + BF(1 d)	7.14	0.00	0.57 ± 0.77
AB + BF(3 d)	21.43	0.00	2.14 ± 1.35
AB + BF(5 d)	35.71	14.29	3.29 ± 1.11
AB + BF(7 d)	42.86 ^a	42.86	4.57 ± 1.40 ^b

注: 相同时间点两组间比较, ^a 表示 $P < 0.05$, ^b 表示 $P < 0.01$

五、回肠病理学评分变化

AB 组与 AB + BF 组在第 7 天时回肠病理学评分差异具有显著统计学意义(4.57 ± 1.40 vs 6.43 ± 1.90, $P < 0.01$), AB + BF 组评分较高, 回肠损伤较重, 表 3。

讨 论

抗生素所致的肠屏障损伤在临床上主要表现为抗生素相关性腹泻和肠炎, 目前的治疗措施主要包括: 合理使用抗生素; 选择性肠道去污; 使用微生态制剂补充益生菌及益生元, 维护肠道屏障功能; 早期恢复肠内营养以及肠道免疫营养的使用。其中微生态制剂的使用受到了越来越多的关注。本研究使用的微生物酵素主要由乳酸杆菌、酵母菌、地衣芽孢杆菌和纳豆菌等组成。

本研究发现, 与单纯使用抗生素组相比, 应用抗生素的同时使用微生物酵素的组的双歧杆菌、乳酸杆菌菌量较多, 大肠埃希菌、肠球菌菌量较少, 说明长时间使用微生物酵素可有效补充肠道内正常菌群, 抑制潜在致病菌的大量生长。

加用微生物酵素一方面可直接补充乳酸杆菌, 乳酸杆菌产生胞外糖苷酶, 降解复合多糖, 阻止致病菌及毒素对肠上皮细胞的黏附和侵入, 其酸性代谢产物能使肠道 pH 值及氧化还原电势(Eh)下降, 抑制不耐酸的肠道致病菌生长; 乳酸菌在体内发酵糖类, 产生醋酸和乳酸, 使环境 pH 下降呈酸性, 促进肠道蠕动, 防止

病原菌定植,并对病原菌有拮抗作用;一方面能与肠道潜在致病菌竞争有限的细菌生长必需的营养成分,抑制潜在病原菌的增殖。

地衣芽孢杆菌通过生物夺氧和强大的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性,降解某些复杂的碳水化合物,产生具有拮抗肠道致病菌的多肽类物质,而对厌氧的有益菌有促菌或共生作用,并促进机体免疫器官、组织的成熟,T、B 淋巴细胞数量增多,提高机体的体液免疫和细胞免疫水平。纳豆菌同样也可以产生多种抑菌素,发挥拮抗大肠埃希菌等潜在致病菌的作用。此外,当补充外源性双歧杆菌后,其可在肠道内定植,拮抗肠道中革兰阴性杆菌的过度生长^[6],有效地纠正肠道菌群的失调状态。双歧杆菌作为肠道内有益菌,与其他厌氧菌共同占据肠道黏膜表面,除了具有占位性保护作用外,可通过生物夺氧、营养竞争和产酸(乙酸、乳酸)抑制等方式阻止其他致病菌、条件致病菌的定植和入侵,从而防止细菌、内毒素易位和肠源性感染的发生^[7]。双歧杆菌产酸还可以促进肠蠕动,减少致病菌滞留,从而减少机会性感染。

双歧杆菌可激活机体单核巨噬细胞系统,促进巨噬细胞的吞噬和杀菌功能。其机理可能是双歧杆菌可易位进入血循环,被单核巨噬细胞吞噬,从而激活单核巨噬细胞系统^[8]。当外源性双歧杆菌引入肠道定植后,可刺激肠黏膜下淋巴细胞(包括 B 细胞)增殖,从而诱生 sIgA 包被革兰阴性杆菌,使细菌表面与肠黏膜上皮细胞结合的特异性部位被封闭,使有害的代谢产物释放受抑;sIgA 本身还有直接杀伤肠道致病菌的作用,减少肠道细菌易位数量^[9]。

与抗生素组相比,使用微生物酵素后血浆 DAO 和 D-乳酸浓度相对降低,在第 7 天时有显著降低;同时病理学检查也发现,使用微生物酵素组病理改变相对较轻。以上结果提示,通过使用微生物酵素补充肠道有益菌,可有效保护肠道黏膜机械屏障,促进肠黏膜的早期恢复。双歧杆菌可促进肠黏膜损伤的修复,维护肠黏膜屏障结构和功能的完整性,从而减少肠道细菌和毒素的易位发生率。双歧杆菌促进肠黏膜损伤修复的机制:(1)控制内毒素血症^[10,11]。内毒素血症是由于作为膜菌群的双歧杆菌减少,屏障作用减弱,导致肠道革兰阴性杆菌在肠黏膜大量定植、增殖,并裂解释放内毒素通过受损的肠黏膜进入血液循环所致。扶植肠道双歧杆菌,则可使过多的革兰阴性杆菌减少到正常水平,减少内毒素的释放量,因内毒素引发的炎症反应对肠黏膜的损伤得以减轻。(2)营养作用^[12]:双歧杆菌对 B 族维生素生物合成及调控具有重要作用。除了合成 6 种水溶性维生素外,双歧杆菌对某些营养物质(铁、钙和维生素 D)的吸收亦具有促进作用,可改善肠黏膜营养和肠道微循环,对损伤修复有利。(3)减轻氧自由基对肠黏膜的损伤^[11]。已证实双歧杆菌可减少胰腺炎大肠黏膜丙二醛含量,增加肠黏膜二胺氧化酶活性,减轻氧自由基对肠黏膜的损伤,维护肠黏膜结构和功能的完整性。(4)加速损伤黏膜再生。双歧杆菌激活巨噬细胞后,巨噬细胞可在黏膜损伤处合成并分泌几种生长因子(包括碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子和表皮生长因子等),这些生长因子可刺激成纤维细胞、上皮细胞向损伤部位移动,使成纤维细胞

和上皮细胞进行大量增殖分化,新生黏膜迅速移向损伤表面,使损伤、坏死和脱落的黏膜得以迅速修复。Ramakrishna^[13]发现益生菌可促进肠道陷窝细胞增生,从而使损伤肠黏膜能够得到早期恢复。

本研究发现,使用微生物酵素后组织和血液细菌培养阳性率均降低,其中在第 7 天时组织培养阳性率显著降低,提示肠道细菌易位减少,这主要与三方面因素有关:(1)肠道有益菌群增多、潜在致病菌大量减少,菌群紊乱部分纠正,微生物屏障作用部分恢复;(2)在肠道有益菌增多的情况下,肠道黏膜上皮损伤修复,杯状细胞和腺体增加,消化液和黏液分泌增多,肠道机械屏障和化学屏障加强;(3)黏膜下淋巴细胞(包括 B 细胞)增殖,slgA 分泌增多,血液中巨噬细胞激活,肠道免疫屏障和机体免疫功能增强。

综上所述,微生物酵素可有效改善抗生素所致的肠道屏障损伤,加强机械屏障、生物屏障、化学屏障和免疫屏障,减少细菌易位的机会。

参 考 文 献

- 1 商宏伟,肖颖彬,陈林,等.大鼠体外循环后血浆二胺氧化酶活性变化与肠屏障损伤的关系.中国病理生理杂志,2006,22(2):396-397.
- 2 韦秋文,王琳琳,李小容.危重症新生儿血清二胺氧化酶和 D-乳酸测定的意义.实用儿科临床杂志,2008,23(6):428-429.
- 3 孙晓庆,付小兵,张蓉,等.创伤后肠道通透性改变血浆标志物 D-乳酸的实验研究.中国危重病急救医学,2000,12(8):476-478.
- 4 董国宾,李俊芝.几种主要厌氧菌培养基的制作和使用.遵义医学院学报,1997,20(4):79-80.
- 5 Chiu CT. Intestinal mucosal lesion in low flow states. J Arch Surg,1970,104(5):917-923.
- 6 熊德鑫,祝小枫.几种活菌的定植性研究.中国微生态学杂志,1995,7(3):8-11.
- 7 康白.微生物生态学.1版.大连:大连出版社,1988:355-358.
- 8 罗予,蔡访勤.双歧杆菌在抗感染中的作用.中国微生态学杂志,1996,8(5):45-49.
- 9 Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. J Clin Exp Allergy,2009,39(12):1842-1851.
- 10 Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of the colonic bacteria. J Appl Bacteriol,1998,77(2):412-420.
- 11 Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. Clin Diagn Lab Immunol,2005,12(9):1075-1084.
- 12 郝维善.人类肠道中的重要生理性细菌-双歧杆菌.中国微生态学杂志,1989,1(1):1.
- 13 Ramakrishna BS. Probiotic-induced changes in the intestinal epithelium: implications in gastro-intestinal disease. Trop Gastroenterol,2009,30(2):76-85.

(收稿日期:2011-06-27)

(本文编辑:孙荣华)

孙莉波,李宁,张海涛,等.微生物酵素对抗生素相关性肠黏膜屏障损伤大鼠的保护作用[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(4):403-409.