

固脱清腑汤胃肠道灌注对重症多发伤患者 血液细菌 16S rRNA 的影响

张 竝 王 伟 张 庚 俞 勇 金 冶 陈扬波
陈 云 蔡乾荣 詹元起 周 钰

摘要 目的 观察固脱清腑汤早期胃肠道灌注对重症多发伤患者血液细菌 16SrRNA 基因的影响。**方法** 60 例严重多发伤患者分为治疗组(33 例)和对照组(27 例),伤后两组经胃肠营养管分别滴入自拟中药汤剂固脱清腑汤和生理盐水,两组其余治疗原则相同。观察两组患者伤后第 3、6、9 天的血细菌 16SrRNA 基因阳性率、体温、白细胞计数、血清超敏 C 反应蛋白(CRP)、血培养阳性率、感染性并发症的发生率和病死率。**结果** 治疗组伤后第 9 天体温[(37.6 ± 0.12)℃]显著低于对照组[(38.10 ± 0.15)℃, $P < 0.05$];伤后第 6、9 天 CRP 治疗组分别为(52.4 ± 6.3) mg/L 和(42.9 ± 7.5) mg/L,显著低于对照组[分别为(104.3 ± 20.1) mg/L 和(92.5 ± 17.1) mg/L, 均为 $P < 0.05$];伤后第 6、9 天血细菌 16S rRNA 基因阳性率分别为 33.3% 和 30.3%,显著低于对照组(分别为 59.3% 和 77.8%),差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);伤后血培养结果两组差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗组感染性并发症的发生率(30.3%)也显著低于对照组(59.3%, $P < 0.05$)。**结论** 固脱清腑汤早期胃肠道灌注可能有益于严重创伤患者肠黏膜屏障功能的改善,对减少肠道细菌易位,降低感染性并发症的发生率有一定的作用。

关键词 固脱清腑汤;重症多发伤;细菌 16S rRNA;肠道细菌易位;感染性并发症

Effects of Gutuo Qingfu Decoction via Gastro-enteric Perfusion on 16SrRNA in Blood of Severe Multi-traumatic Patients ZHANG Bing, WANG Wei, ZHANG Geng, et al Department of General Surgery, Zhejiang Provincial Tongde Hospital, Hangzhou (310012)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Gutuo Qingfu Decoction (GQD) via gastro-enteric perfusion on blood level of bacterial 16S rRNA gene in severe multi-traumatic (SMT) patients at early stage. **Methods** Sixty SMT patients were assigned to two groups, the 33 in the treated group and the 27 in the control group. They were treated with the same conventional treatment, but different in the gastro-enteric infusion with GOD for the former and saline for the latter. Blood 16SrRNA gene, body temperature, leukocyte count, C-reactive protein (CRP), and blood bacterial culture positive rate on the 3, 6, 9 post-trauma days were detected, and incidences of infective complication and mortality were observed. **Results** Body temperature on day 9 in the treated group was significantly lower than in the control group (37.6 ± 0.12 °C vs 38.1 ± 0.15 °C, $P < 0.05$); so did the CRP level on day 6 (52.4 ± 6.3 mg/L vs 104.3 ± 20.1 mg/L, $P < 0.05$) and day 9 (42.9 ± 7.5 mg/L vs 92.5 ± 17.1 mg/L, $P < 0.05$), as well as the positive rates of blood 16SrRNA gene on day 6 and 9 (33.3% vs 59.3% and 30.3% vs 77.8%, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). However, the positive rates of blood culture were insignificantly different between the two groups ($P > 0.05$). Besides, incidence of infective complication in the treated group was significantly lower than in the control group (30.3% vs 59.3%, $P < 0.05$). **Conclusion** Early stage gastrointestinal administration of GQD is likely to have benefits for the improvement of intestinal mucosa barrier and reduction of enteric bacterial translocation in SMT patients, and it may also reduce the incidence of infective complication in these patients.

KEYWORDS Gutuo Qingfu Decoction; severe multi-trauma; bacterial 16SrRNA; enteric bacterial translocation; infective complications

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助(No. 2007CA027)

作者单位:浙江省立同德医院(杭州 310012)

通讯作者:张 竝, Tel: 0571 - 89972359, 13867425850, E-mail: hzbjoke@sohu.com

严重创伤的休克发生率高,易发生多脏器功能衰竭,治疗难度大,病死率高。其重要的临床特点是感染发生率高,除了由于创伤应激引发 SIRS (全身炎症反应综合征),导致机体免疫功能,特别是细胞免疫功能受到抑制,以及伤口污染严重外,肠道黏膜屏障功能障碍等所致的肠道细菌易位可能是一个重要因素。动物实验证实大黄可抑制肠道细菌易位^[1,2],但在创伤患者中,中药对肠道细菌易位的影响尚未见报道。我们对严重多发伤患者术后进行早期胃肠道中药汤剂的灌注,并通过血液细菌 16SrRNA 基因的检测,观察该方法对此类患者肠道黏膜屏障功能的影响。

资料与方法

1 入选和排除标准

1.1 入选标准 (1)年龄 16~70 岁;(2)机械性创伤的住院患者;(3)入院后立即进行损伤严重程度评分(Injuries Severity Score,ISS 评分,以简明损伤定级法 AIS-90 为标准)^[3]≥16 分。

1.2 排除标准 (1)伤前有感染性疾病,或伴有其他严重疾病,包括肝、肾、心血管疾病,(2)体表伤口污染严重,72 h 内出现体表严重软组织感染。

2 临床资料 2006 年 11 月—2009 年 7 月,收住本院普外科和 ICU 的机械性创伤的患者,用随机数字表进行 4 个病例为一区组的区组随机化方法分为治疗组和对照组,以使两组病例数一致。根据上述标准及分组原则,共对 70 例患者(治疗组和对照组各 35 例)进行了研究,其中 10 例(治疗组 2 例,对照组 8 例)因多种因素而脱落。余 60 例纳入本组研究,其中治疗组 33 例(男 28 例,女 5 例),对照组 27 例(男 17 例,女 10 例)。两组在年龄($t = 1.482$)、ISS 评分($t = 1.643$)、病程(受伤至入院时间, $t = 0.365$)、致伤原因、致伤部位、手术次数等方面比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2 治疗方法

2.1 置管 所有患者在循环系统稳定(血压 $> 90/60$ mm Hg,心率 < 120 次/min)后放置鼻胃管,如有胃十二指肠、肝胆胰脾损伤暂不能经胃灌注的,则置鼻空肠管,或术中放置鼻空肠管。

2.2 中药方剂组成及制备方法 方剂为我院经验方固脱清腑汤,处方:党参 12 g 制附子 9 g 黄芪 15 g 当归 12 g 厚朴 12 g 大黄 20 g 枳壳 15 g 三七粉 3 g 甘草 6 g,浓煎 200 mL。由浙江省立同德医院中药煎药室制剂。

表 1 两组的伤情和手术情况

项目	治疗组(33 例)	对照组(27 例)
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	31.9 ± 2.2	37.2 ± 3.0
病程(h, $\bar{x} \pm s$)	5.3 ± 1.0	6.2 ± 2.5
ISS 评分($\bar{x} \pm s$)	21.2 ± 1.0	25.0 ± 2.2
致伤原因(例)		
钝器击打	5	5
车祸	22	19
高处坠落	6	3
主要损伤部位(例)		
腹部+胸部	7	7
腹部+头颅	8	5
腹部+四肢	5	4
头颅+四肢	6	5
头颅+胸部	2	3
胸部+四肢	1	0
3 个或以上部位	4	3
手术方式(例)		
未手术	3	4
1 次手术	26	21
2 次手术	3	4
3 次手术或以上	1	0

2.3 灌注方法 (1)治疗组:患者循环系统稳定后,上述中药汤剂 100 mL,过滤,肠内营养输注泵自上述置管中滴入,速度 30 mL/h,每天 2 次,连续 7 天,如期间患者已能恢复经口饮食,则改为口服。(2)对照组:生理盐水 100 mL,每天 2 次,连续 7 天灌注(方法同治疗组)。

2.4 其他治疗 两组采用相同的治疗原则,即各脏器和系统功能的监测和维持,针对病因的手术或非手术治疗,抗感染,对症支持治疗等。

3 血液中细菌 16SrRNA 的 PCR 检测方法

3.1 主要器材 SLAN Realtime PCR (上海宏石医疗科技有限公司产品),高速离心机(Biofuge 28RS, Heraeus 公司产品,德国),恒温水浴箱(Model DK-8D, 上海森信实验仪器有限公司产品)。

3.2 主要试剂 Taq 酶(Promega 产品)、PCR 反应混合液(上海之江生物科技有限公司产品)、核酸抽提液(上海之江生物科技有限公司产品)、引物(上海英骏生物技术有限公司合成)、探针(上海基康生物技术有限公司合成)等。

3.3 实验步骤

3.3.1 DNA 抽提 取血液 100 μ L,加入 100 μ L 核酸抽提液,振荡混匀;100 $^{\circ}$ C 水浴中放置 10 min;13 000 r/min 离心 10 min,所得上清即可直接用于 PCR 实验。

3.3.2 PCR 实验的反应体系包括 10 \times Buffer 4 μ L, Mg^{2+} 3.2 μ L, dNTP 0.8 μ L (25mmol/L),上、下游引物各 0.5 μ L (20 nmol/L), Taq 酶 0.3 μ L (1 U/ μ L),探针 0.3 μ L (20 nmol/L),DNA 模板 4 μ L,消毒

去离子水 26.7 μL,总反应体积 40 μL。

3.3.3 PCR 实验反应程序 and 数据分析 预变性 94 °C 3 min;PCR 反应 94 °C 15 s,60 °C 60 s(采光),进行 40 个循环,之后用 SLAN Realtime PCR 仪器自带的程序进行数据分析。结果记录为血 16S rRNA 基因阳性或阴性。

4 观察指标 两组所有患者伤后第 3、6、9 天各取血 1 次,共 180 份全血标本。观察指标:(1)细菌 16SrRNA 的阳性率;(2)体温;(3)白细胞计数(WBC);(4)血清超敏 C 反应蛋白(CRP);(5)血培养阳性率;(6)感染性并发症的发生率和病死率。

5 统计学方法 计数资料两组比较采用 Pearson 卡方检验或 F 检验;正态分布的计量资料采用成组 t 检验。

结 果

1 两组伤后 3、6、9 天体温、白细胞及 CPR 比较(表 2) 治疗组伤后 9 天(治疗后)体温及 CRP 均较对照组同期下降($P < 0.05$)。

表 2 两组伤后体温、WBC、CPR 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	体温(°C)	WBC($\times 10^9/L$)	CRP(mg/L)
治疗	33	3 天	37.8 ± 0.15	13.8 ± 1.1	79.2 ± 12.1
		6 天	37.8 ± 0.12	12.3 ± 1.2	52.4 ± 6.3*
		9 天	37.6 ± 0.12*	13.2 ± 1.3	42.9 ± 7.5*
对照	27	3 天	37.9 ± 0.14	12.8 ± 0.79	80.7 ± 6.6
		6 天	38.0 ± 0.18	11.6 ± 0.96	104.3 ± 20.1
		9 天	38.1 ± 0.15	13.1 ± 0.97	92.5 ± 17.1

注:与同期对照组比较,* $P < 0.05$

2 两组伤后 3、6、9 天血培养及血 16SrRNA 阳性率比较(表 3) 治疗组与对照组同期比较,血培养结果差异均无统计学意义($P > 0.05$);16SrRNA 基因的阳性率在术后第 3 天两组差异无统计学意义($P > 0.05$);而在术后第 6、9 天治疗组显著低于对照组(分别为 $P < 0.05, P < 0.01$)。

表 3 两组伤后 3、6、9 天血培养及血 16SrRNA 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	血培养	血 16SrRNA
治疗	33	3 天	15.2	42.4
		6 天	27.3	33.3*
		9 天	18.2	30.3**
对照	27	3 天	14.8	48.1
		6 天	25.9	59.3
		9 天	33.3	77.8

注:与对照组同期比较,* $P < 0.05, **P < 0.01$

两组 180 份标本总的 16SrRNA 基因检测阳性率为 41.7% (75/180),高于血细菌培养总的检测阳性率 22.8% (41/180),差异有统计学意义($\chi^2 = 14.703,$

$P < 0.01$)。

3 两组感染性并发症的发生率和死亡率比较 治疗组感染性并发症发生率为 30.3% (10/33),低于对照组 59.3% (16/27),两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.0706, P < 0.05$);而治疗组的病死率为 12.1% (4/33),与对照组 18.5% (5/27)比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.4767, P > 0.05$)。

讨 论

判断肠道细菌移位是否发生,以往已建立了一些检测方法,如测定外周或门静脉血的内毒素、脂多糖(LPS)、TNF- α 、IL-6 mRNA、血液细菌培养、核素标记的大肠杆菌计数、微量尿一氧化氮等方法。但这些方法有的结果判断不可靠(间接推断),有的不适合临床研究,血细菌培养虽然可靠,但阳性率低。16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA(核糖体 RNA)相对应的 DNA 序列,存在于所有细菌的染色体基因中,但不存在于非原核生物体内。Wellingshausen N 等^[4]用 PCR 技术在 342 份临床提示细菌感染患者的血液标本中检测 16SrRNA 基因,发现其判断脓毒症的敏感性和特异性分别达到 87.0% 和 85.8%,高于细菌培养,其他的研究在发热的溃疡性结肠炎、血培养阴性的细菌性心内膜炎患者中也得出类似的结论^[5,6]。本组共 180 份全血标本同时进行细菌培养和 16SrRNA 基因检测,血培养的总阳性率仅为 22.8%,而 16SrRNA 基因的总阳性率为 41.7%,两者比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示实时 PCR 检测全血中 16SrRNA 基因,在判断肠道细菌易位上明显优于细菌培养。

严重创伤时肠道细菌移位的存在已在一些动物试验中得到证实,但临床研究较少,乔治等^[7]在 16 例严重创伤的患者中,发现有 10 例细菌 DNA 检测 PCR 阳性(62.50%),同时 PCR 阳性者脓毒症发病率为 100.00%。而在防治重症患者的肠道细菌移位方面,一些研究证实口服抗生素进行肠道去污染,口服双歧杆菌合剂维护肠道微生态平衡,早期肠内营养保护肠黏膜屏障等方法均可降低肠道细菌移位的发生;谷氨酰胺、表皮生长因子等也对肠黏膜屏障有保护作用;使用中医中药的方法对防治肠道细菌移位有一定的效果^[8],但在创伤患者中的研究尚未见报道。

我们自拟的固脱清腑汤,方中以党参益气固脱;黄芪、当归、甘草益气补血;附子回阳救逆;大黄泻热通便;厚朴行气散结,消痞除满,并助大黄加速积滞排泄,诸药合用既能回阳救逆固脱,又能通下解毒清腑。现代医学研究表明,黄芪具有增强机体免疫功能、调节蛋

白质及核酸代谢、清除氧自由基、抗感染等作用。附子能增强心肌收缩力,加快心率,增加心输出量。大黄具有改善胃肠黏膜的血液灌流,抗氧自由基,抑制炎症介质,促进肠道黏液和 S-IgA 的分泌,抗炎、抑菌及调节肠道菌群的微生态平衡等作用^[9]。枳壳对胃肠平滑肌呈双相调节作用,既兴奋胃肠,使其蠕动增强,又有降低胃肠平滑肌张力和解痉作用^[10]。厚朴对胃肠具有局部刺激作用,可促进肠蠕动。

我们通过随机对照分组,对 60 例严重创伤患者用该方剂进行早期胃肠道灌注的研究,结果发现治疗组伤后第 6、第 9 天血液中 16SrRNA 基因检测的阳性率明显高于对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),此结果与伤后第 6 天、第 9 天 CPR,第 9 天的体温情况吻合;同时,治疗组感染性并发症发生率也明显低于对照组($P < 0.05$)。该结果提示,固脱清腑汤早期胃肠道灌注,可能有益于严重创伤患者肠黏膜屏障功能的改善,对减少肠道细菌易位,降低感染性并发症的发生率有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] 顾群浩,张晓东,沙盈盈,等. 大黄四君子汤对重症胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的保护作用[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(2):64-66.
Gu QH, Zhang XD, Sha YY, et al. Protective effects of "Dahuang Sijunzi Decoction" on intestinal mucosal mechanical barrier in rats with severe acute pancreatitis[J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2009, 23(2):64-66.
- [2] 冯顺友. 大黄防治胃肠功能衰竭[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(10): 795-797.
Feng SY. Mechanism of rhubarb in preventing the occurrence of gastrointestinal function failure[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2000, 20(10): 795-797.
- [3] 曹光磊,沈惠良. 创伤评分及结果预测系统的发展与现状[J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(8): 510-512.
Cao GL, Shen HL. Development and current status of injury severity score and result predication systems[J]. Chin J Trauma, 2004, 20(8): 510-512.

- [4] Wellinghausen N, Kochem AJ, Disqué C, et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(9):2759-2765.
- [5] Harada A, Ohkusa T, Kushima K, et al. Identification of bacteria from blood in febrile patients with ulcerative colitis by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of 16S rRNA gene[J]. Scand J Gastroenterol, 2008, 43(4):423-430.
- [6] Madico GE, Rice PA. 16S-Ribosomal DNA to diagnose culture-negative endocarditis[J]. Curr Infect Dis Rep, 2008, 10(4):280-286.
- [7] 乔治,黎沾良,李基业,等. 严重多发伤后肠道细菌移位的临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(1): 13-15.
Qiao Z, Li ZL, Li JY, et al. Clinical study on bacterial translocation in severe multiple trauma patient[J]. Chin Crit Care Med, 2006, 18(1): 13-15.
- [8] 姜春燕,王宝恩,陈丹,等. 中药复方通腑颗粒对失代偿期肝硬化患者肠黏膜屏障的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(9): 784-787.
Jiang CY, Wang BE, Chen D, et al. Protective effect of compound Tongfu Granule on intestinal mucosal barrier in patients with cirrhosis of decompensation stage[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28(9): 784-787.
- [9] 杨海波,宣正荣,蔡骏. 大黄对胃肠功能影响的国内研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(3):306-308.
Yang HB, Xuan ZR, Cai J. Advance in domestic research of the effects of rhubarb on gastrointestinal function [J]. Chin J Surgery Integr Tradit West Med, 2006, 12(3): 306-308.
- [10] 徐欢,陈海芳,介磊,等. 枳实、枳壳的化学成分及胃肠动力研究概述[J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(1): 42-44.
Xu H, Chen HF, Jie L, et al. Summary on chemical components and gastrointestinal motility research of fructus aurantii immaturns and fructus aurantii[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2009, 21(1): 42-44.

(收稿:2009-12-11 修回:2010-03-15)