

内毒素在大肠杆菌和白色念珠菌混合感染小鼠中的作用

张玉昆¹, 唐英春¹, 覃德冰², 朱家馨¹, 谈淑卿¹

(1. 中山医科大学附属第三医院呼吸内科, 广东 广州 510630; 2. 广西象州人民医院内科, 广西 象州 545800)

摘要:【目的】探讨内毒素对大肠杆菌和白色念珠菌混合感染病情的影响。【方法】建立小鼠大肠杆菌、白色念珠菌单独及混合感染模型, 对比大肠杆菌内毒素代替大肠杆菌, 多粘菌素 B 拮抗内毒素活性, 观察各组小鼠生存期、血浆内毒素水平及肺组织中的菌落数。【结果】大肠杆菌或大肠杆菌内毒素和白色念珠菌同时感染组, 小鼠生存期明显短于各自单独感染组 ($P < 0.05$); 大肠杆菌和白色念珠菌同时感染组 24 h 后, 血浆内毒素水平高于大肠杆菌单独感染组 ($P < 0.01$); 大肠杆菌和白色念珠菌同时感染组 24 h 和 48 h 后, 白色念珠菌和大肠杆菌菌落数高于各自单独感染组 ($P < 0.05$); 内毒素和白色念珠菌同时感染组 24 h 和 48 h 后, 白色念珠菌菌落数高于白色念珠菌单独感染组 ($P < 0.05$)。【结论】内毒素可造成大肠杆菌和白色念珠菌混合感染加重, 缩短生存期。

关键词: 大肠杆菌; 念珠菌, 白色; 内毒素类

中图分类号: R563

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)03-0200-04

Effects of Lipopolysaccharide on Mice with Concurrent *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Infection

ZHANG Yu-kun¹, TANG Ying-chun¹, QIN De-bin², ZHU Jia-xin¹, TAN Shu-qing¹. (1. Department of Respiratory Disease, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630; 2. Department of Internal Medicine, Xiangzhou People's Hospital, Xiangzhou 545800, China)

Abstract 【Objective】To study the effects of lipopolysaccharide on mice with concurrent infections of *E. coli* and *C. albicans*. 【Methods】The animal model with concurrent infections of *E. coli* and *C. albicans* and with either organism infection alone was established. Lipopolysaccharide was substituted for *E. coli* and polymyxin B was used to neutralized the toxic and immunologic effects of lipopolysaccharide. Then the life spans, plasma endotoxin levels and the numbers of cfu in lungs among different groups were compared. 【Results】The life spans of mice with combined infections of *E. coli* or lipopolysaccharide and *C. albicans* were significantly shorter than that of mice with infection alone ($P < 0.05$). The plasma endotoxin levels of mice with combined infections of *E. coli* and *C. albicans* infection were significantly higher than that with *E. coli* infection alone 24 hour postinfection ($P < 0.01$). The colonies of *C. albicans* and *E. coli* in lungs with combined infections of the two organisms were significantly higher than that with *C. albicans* infection alone 24 and 48 hour postinfection ($P < 0.05$). The colonies of *C. albicans* in lungs with combined infections of lipopolysaccharide and *C. albicans* were significantly higher than that with infection of *C. albicans* alone 24 and 48 hour postinfection ($P < 0.05$). 【Conclusion】Lipopolysaccharide can exacerbate concurrent infections of *E. coli* and *C. albicans* and shorten the life spans of infected animals.

Key words: *Escherichia coli*; *Candida albicans*; endotoxins

革兰氏阴性菌和白色念珠菌败血症是住院危重病人的重要致死原因。有报道 30% 以上的白色念珠菌败血症合并细菌感染。多种细菌尤其是革兰氏阴性菌可与白色念珠菌在体内起炎症协同作用, 加重病情, 增加病死率^[1]。一些研究提示革兰氏阴性菌内毒素可能在其中起重要作用^[2,3]。我们建立了小鼠大肠杆菌与白色念珠菌单独及混合感染的模型, 比较各组小鼠生存期、血浆内毒素水平和肺组织中的菌落数。为明确内毒素的作用, 我们用大肠杆菌内毒素代替大肠杆菌, 并预先注射小剂量多粘菌素 B (一种在体内外均可中和内毒素活

性的药物) 观察小鼠上述指标的变化^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级 Balb/c 小鼠, 5 周龄, 雌性, 15~18 g, 购于中山医科大学实验动物中心。白色念珠菌 AS2.2086, 购自中国科学院微生物研究所, 保存于沙保氏培养基中置 4℃ 冰箱内。大肠杆菌 ATCC25922, 为本院保存的标准菌株。大肠杆菌内毒素和多粘菌素 B 购自 Sigma 公司。

1.2 实验分组

收稿日期: 2001-10-19

作者简介: 张玉昆(1967-), 男, 湖北十堰市人, 博士生, 医师。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

A组,单独注射大肠杆菌;B组,单独注射大肠杆菌内毒素;C组,单独注射白色念珠菌;D组,注射大肠杆菌和白色念珠菌;E组,注射大肠杆菌、白色念珠菌和多粘菌素B;F组,注射大肠杆菌内毒素和白色念珠菌;G组,注射大肠杆菌内毒素、白色念珠菌和多粘菌素B。

1.3 动物模型

实验前1d白色念珠菌以划线法接种于另一沙保氏培养基中,37℃温箱中过夜培养,用生理盐水配成菌液 5×10^6 CFU/mL,小鼠注入量为 5×10^6 CFU/只;大肠杆菌以划线法接种于麦康凯培养基中过夜培养,用9g/L盐水配成菌液 1×10^7 CFU/mL,小鼠注入量为 1×10^7 CFU/只;大肠杆菌内毒素以生理盐水配成2g/L溶液于4℃冰箱中保存,小鼠注入量为 1.5×10^5 EU/只;多粘菌素B以蒸馏水配成 1×10^9 U/L溶液,过滤除菌后于4℃冰箱中保存,小鼠注入量为100 U/只,此剂量可使其血药浓度小于最小抑菌浓度而保留拮抗内毒素的作用^[5],感染前1h静脉注入多粘菌素B或生理盐水,然后注入大肠杆菌、大肠杆菌内毒素或白色念珠菌,1周后观察小鼠生存期。

1.4 内毒素测定

用动态浊度法定量测定。小鼠感染24h后乙醚麻醉下经眼部采血0.5mL,并以1200 r/min离心70 min,上层血浆稀释后于75℃水浴加热10 min,然后于反应管中加入0.1mL鲎试剂、0.1mL内毒素标准液或样品,插入检测仪的反应孔中,于4405 nm处测出透光度95%时的反应时间。

1.5 肺组织菌落计数与组织学检查

小鼠于感染12、24和48h后以颈椎脱臼法处死,取出肺组织,用一侧肺研磨成匀浆经适当过滤稀释后注入沙保氏培养基或加有二性霉素B的麦康凯培养基中,孵育48h后做白色念珠菌或大肠杆菌菌落计数,另一侧肺保存于福尔马林中做组织学检查,切片用HE染色。

1.6 统计

各组小鼠之间生存期的比较用秩和检验,血浆内毒素水平及肺组织中菌落数的比较用t检验。

2 结果

2.1 感染小鼠的生存期

大肠杆菌、大肠杆菌内毒素和白色念珠菌的致死量分别为 1×10^9 CFU、 5.2×10^6 EU和 5×10^6

CFU。静脉注射亚致死量的大肠杆菌或大肠杆菌内毒素小鼠于2周观察期内无1例死亡,注入致死量的白色念珠菌所有小鼠于10d之内死亡,平均生存时间为 (6.1 ± 1.2) d,当上述剂量的大肠杆菌或大肠杆菌内毒素与白色念珠菌同时注射,所有小鼠均于5d内死亡,平均生存时间分别为 (2.4 ± 0.5) d、 (2.5 ± 0.5) d,均显著低于前者($P < 0.05$)。

2.2 感染小鼠的血浆内毒素水平

大肠杆菌和白色念珠菌同时感染组24h后血浆内毒素水平显著高于大肠杆菌单独感染组($P < 0.01$),而大肠杆菌内毒素和白色念珠菌同时注射组24h后与大肠杆菌内毒素单独注射组无显著差别($P > 0.05$)(表1),提示白色念珠菌和大肠杆菌混合感染可增强内毒素血症。

表1 小鼠静脉注射大肠杆菌、内毒素和白色念珠菌的血浆内毒素含量

Table 1 The plasma endotoxin levels of mice injected intravenously with *E. coli*, *C. albicans* and endotoxins

Group	Plasma endotoxin ($\bar{x} \pm s$, EU/mL)
<i>E. coli</i>	91.3 ± 35.8 (8 n)
Endotoxin	888.4 ± 203.2 (8 n)
<i>C. albicans</i>	7.6 ± 4.3 (7 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i>	185.2 ± 29.6 (7 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i> + Polymyxin B	42.3 ± 30.9 (8 n)
<i>C. albicans</i> + Endotoxin	861.4 ± 41.5 (6 n)
<i>C. albicans</i> + Endotoxin + Polymyxin B	13.5 ± 5.6 (8 n)

2.3 感染小鼠肺组织中的菌落数

白色念珠菌与大肠杆菌混合感染组小鼠24h及48h后肺组织中白色念珠菌菌落数高于白色念珠菌单独感染组($P < 0.05$),而且大肠杆菌菌落数高于大肠杆菌单独感染组($P < 0.01$)。给小鼠同时注射白色念珠菌和大肠杆菌内毒素24h及48h后肺组织中白色念珠菌菌落数也高于白色念珠菌单独感染组($P < 0.05$)(表2,3)。

2.4 多粘菌素B对感染小鼠的影响

给小鼠提前注射多粘菌素B与对照组比较能明显延长白色念珠菌与大肠杆菌混合感染小鼠的生存期,降低血浆内毒素水平,降低肺中白色念珠菌菌落数($P < 0.05$),而大肠杆菌菌落数无明显下降($P > 0.05$),同时发现,给小鼠注射白色念珠

表 2 小鼠静脉注射大肠杆菌、内毒素和白色念珠菌的肺组织中白色念珠菌菌落数

Table 2 The colonies of *C. albicans* in lungs injected intravenously with *E. coli*, *C. albicans* and Endotoxins

Group	Colonies of <i>C. albicans</i> [$\bar{x} \pm s$, log(CFU/g)]		
	12 h	24 h	48 h
<i>C. albicans</i>	3.91 ± 0.74(7 n)	3.58 ± 0.50(7 n)	3.63 ± 0.29(6 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i>	4.00 ± 0.85(7 n)	4.30 ± 0.45(6 n)	4.89 ± 0.81(4 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i> + Polymyxin B	3.93 ± 0.71(7 n)	3.70 ± 0.48(7 n)	3.71 ± 0.22(6 n)
Endotoxin + <i>C. albicans</i>	4.37 ± 0.42(7 n)	4.39 ± 0.55(6 n)	4.71 ± 0.12(4 n)
Endotoxin + <i>C. albicans</i> + Polymyxin B	4.13 ± 0.66(7 n)	3.61 ± 0.35(7 n)	3.63 ± 0.16(5 n)

表 3 小鼠静脉注射大肠杆菌和白色念珠菌的肺组织中大肠杆菌菌落数

Table 3 The colonies of *E. coli* in lungs Injected intravenously with *E. coli* and *C. albicans*

Group	Colonies of <i>E. coli</i> [$\bar{x} \pm s$, log(CFU/g)]		
	12 h	24 h	48 h
<i>E. coli</i>	5.58 ± 0.33(7 n)	4.87 ± 0.43(7 n)	4.01 ± 0.29(7 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i>	5.74 ± 0.28(7 n)	5.83 ± 0.36(6 n)	5.75 ± 0.16(4 n)
<i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i> + Polymyxin B	5.69 ± 0.33(7 n)	5.55 ± 0.32(7 n)	5.60 ± 0.20(6 n)

菌和大肠杆菌内毒素前预先注入多粘菌素 B 与对照组比较也能明显延长生存期,降低血浆内毒素水平与肺中白色念珠菌菌落数 ($P < 0.05$), (表 1, 2, 3)。

3 讨论

3.1 内毒素缩短混和感染小鼠的生存期

多种微生物之间的相互作用是混合感染病情演变的关键。白色念珠菌经常见于不同部位的混合感染,然而有关白色念珠菌与革兰氏阴性菌相互作用的体内研究很少,其机理尚不清楚,有人报道某些革兰氏阴性菌能与白色念珠菌在体内起炎症协同作用,增加混合感染的病死率^[3,4],Burd 等^[2]研究提示革兰氏阴性细菌内毒素在混合感染中起重要作用。本实验显示大肠杆菌或大肠杆菌内毒素可增加白色念珠菌感染小鼠的致死性,多粘菌素 B 可拮抗内毒素活性,降低血浆内毒素水平,降低感染小鼠的病死率,从而证实细菌内毒素在白色念珠菌和大肠杆菌混合感染中起关键作用。

3.2 内毒素是引起混和感染病情加重和加速死亡的重要因素

Kagawa 等^[7]发现给感染白色念珠菌小鼠注射内毒素后其肾的菌落数显著高于对照组。有报道白色念珠菌可引起多种细菌感染播散^[3]。肺是微生物血源播散的主要器官,其病变程度明显影响整

个病情发展。本实验在混合感染小鼠肺组织中白色念珠菌和大肠杆菌菌落数均高于各自单独感染时的菌落数,造成肺部感染迁延不愈,推测其机制可能为:①细菌或真菌感染引起脏器损害,血管通透性增加,使其它微生物能更容易进入^[3]。②革兰氏阴性菌释放内毒素,引起一系列细胞因子释放,破坏机体的防御机制,从而有利于局部致病菌生长^[8,9]。我们发现小鼠血浆内毒素水平与肺组织中菌落数一致,这进一步提示内毒素可能是造成混合感染中病原微生物繁殖,病情加重的主要原因。

因不同种类抗生素在体内引起内毒素的释放量差别较大^[10],治疗白色念珠菌和革兰氏阴性菌混合感染的病人应选用内毒素释放量较小的抗生素,还需采用抗内毒素制剂,比如用多粘菌素 B 或抗内毒素抗体治疗,另外因机体存在免疫功能低下,可使用一些免疫调节剂,以恢复正常免疫功能,抑制病原菌的生长。

参考文献:

- [1] Verghese A, Prabhu K, Dismond R, et al. Synchronous bacterial and fungal septicaemia: a marker for the critically ill surgical patient[J]. *Amer Surg*, 1988, 54(5): 276.
- [2] Burd R, Raymond C, Dunn D. Endotoxin promotes synergistic lethality during concurrent *Escherichia coli* and *Candida albicans* infection[J]. *J Surg Res*, 1992, 52(6): 537.
- [3] Carlson E. Enhancement by *Candida albicans* of *Staphylococcus*

- aureus, *Serratia marcescens*, and *Streptococcus faecalis* in the establishment of infection in mice [J]. *Infect Immun*, 1983, 39(1): 193.
- [4] Yao Y M, Tian H M, Sheng Z Y, *et al*. Inhibitory effects of low-dose polymyxin B on hemorrhage-induced endotoxin/ bacterial translocation and cytokine formation in rats [J]. *J Trauma*, 1995, 38(6): 924.
- [5] Andrew M, Calvin B. Reversal of postburn immunosuppression with low-dose polymyxin B [J]. *J Trauma*, 1986, 26(11): 995.
- [6] Neely A, Law E, Holder I. Increased susceptibility to lethal *Candida* infections in burned mice preinfected with *Pseudomonas aeruginosa* or pretreated with proteolytic enzymes [J]. *Infect Immun*, 1986, 52(1): 200.
- [7] Kagawa G, Abe S, Yamaguchi H. Mortality of *Candida albicans* infected mice is facilitated by superinfection of *Escherichia coli* or administration of its lipopolysaccharide [J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(6): 1539.
- [8] Regel M, Nerlich M, Dwenger J, *et al*. Phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes and the RES in endotoxemia [J]. *J Surg Res*, 1987, 42(1): 74.
- [9] Kaija T, Lisa L, Ira M, *et al*. Endotoxin-induced selective dysfunction of rabbit polymorphonuclear leukocytes in response to endogenous chemotactic factors [J]. *Infect Immun*, 1985, 50(2): 527.
- [10] 吴朝晖, 张扣兴, 唐英春. 抗菌药物诱导大肠杆菌内毒素释放的研究 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(3): 194.

(编辑 黄小延)

(上接第182页 from page 182)

浓度褪黑激素可以抑制 P12 细胞的增殖, 而高浓度褪黑激素无抑制细胞的作用而是有助于细胞存活; 低浓度褪黑激素并不能抑制 forskolin 诱导的细胞内 cAMP 的升高, 这一现象提示低浓度褪黑激素不是通过细胞膜 G_i 蛋白偶联受体的作用, 而是直接作用于核受体, 抑制 P12 细胞的增殖^[9]。我们的实验结果得出相似的结论, Luzindole 阻断褪黑激素细胞膜受体后, 不能抑制低浓度褪黑激素对神经干细胞的促分化作用。细胞核内褪黑激素受体被激活后, 通过一系列复杂细胞内信号途径可诱导神经干细胞向神经细胞分化^[3, 8]。还有实验证实, 细胞膜褪黑激素受体的激活在干细胞向神经样细胞分化方面起重要作用, 该受体是在高浓度下被激活的^[2, 10]。本实验也证实, 细胞膜褪黑激素受体被阻断后, 高浓度褪黑激素促神经干细胞分化作用减弱, 说明是通过细胞膜受体而起作用的。

我们的实验证明褪黑激素作为体内重要的神经内分泌激素, 参与促进神经干细胞向神经元方向的分化成熟, 可能涉及细胞内复杂的信号系统的调控机制, 有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Reiter R J, Gverro J M, Garcia J J, *et al*. Reactive oxygen in intermeditates molecular, damage, and aging [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 854: 410.

- [2] Roth J A, Kim B G, Lin W L, *et al*. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 22041.
- [3] Takahashi J, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures [J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1): 65.
- [4] 项 鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321.
- [5] Cos S, Verduga R, Fernandez Viadero C, *et al*. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 216(2): 113.
- [6] Witt-Enderby P A, MacKenzie R S, Carroll E A, *et al*. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of human mt1 melatonin receptor [J]. *Cell Motil Cytoskel*, 2000, 46(1): 28.
- [7] 赵 瑛, 邵福源, 何淑芬, 等. 人胚胎下丘脑褪黑激素受体鉴定及其生物学特征 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, 15(3): 149.
- [8] Carlberg C. Gene regulation by melatonin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 917: 387.
- [9] Roth J A, Rabin, Agnello K. Melatonin suppression of PC 12 cell growth and death [J]. *Brain Res*, 1997, 768(1-2): 63.
- [10] Bordt S L, Mekeon R M, Li P K. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neuropeptides in response to melatonin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1499(3): 257.

(编辑 张恩健)