

文章编号:1005-6947(2008)04-0367-05

· 临床研究 ·

多聚酶链反应检测细菌 DNA 对大鼠空、回肠吻合口瘘的早期诊断价值

雷姗姗¹, 李铁钢²

(1. 湖南省人民医院 普外二科, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨 PCR 检测大鼠外周血及腹水中细菌 DNA 对空肠-空肠、回肠-回肠吻合口瘘的早期诊断价值。方法 健康 Wistar 雌性大鼠 50 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只: A 组为假手术组; B 组为空肠-空肠吻合组; C 组为空肠吻合口瘘组; D 组为回肠-回肠吻合组; E 组为回肠吻合口瘘组。采集手术前后外周血及术后腹水, 抽提 DNA, 比较 lacZ 基因和 16SrRNA 基因的 PCR 阳性率, 并观察各组的病理学情况。结果 (1) C, E 组术后外周血 lacZ 基因 PCR 阳性率与 B, D 组无显著性差异 ($P > 0.05$); C, E 组术后外周血 16SrRNA 基因 PCR 阳性率显著高于 B, D 组 ($P < 0.05$)。 (2) C, E 组腹水 lacZ 基因和 16SrRNA 基因 PCR 阳性率均显著高于 B, D 组 ($P < 0.05$)。 (3) C, E 组腹水 lacZ 基因阳性率显著高于外周血 ($P < 0.05$); C, E 组腹水 16SrRNA 基因阳性率与外周血无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 (1) PCR 检测术后外周血 16SrRNA 基因对空、回肠吻合口瘘的早期诊断有一定意义; (2) 检测术后腹水 lacZ 基因和 16SrRNA 基因对空肠-空肠、回肠-回肠吻合口瘘的早期诊断也有一定意义。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 367-371]

关键词: 吻合口; 肠瘘/并发症; 多聚酶链反应; DNA, 细菌/分析

中图分类号: R 656.7

文献标识码: A

Predictable value of PCR in detecting bacterial DNAs for early diagnosis of jejunal anastomotic leakage and ileal anastomotic leakage in rats

LEI Shanshan¹, LI Tiegang²

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, the People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China; 2. Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective To assess the value of detecting bacterial DNA in rats' blood with PCR technique for early diagnosis of jejunojejunal anastomotic leakage and ileoileal anastomotic leakage. **Methods** Fifty healthy female Wistar rats were randomly divided into five groups: Group A ($n = 10$), sham operation group; Group B ($n = 10$), jejunojejunal anastomosis group; Group C ($n = 10$), jejunojejunal anastomotic leakage group; Group D ($n = 10$) ileoileal anastomosis group, Group E ($n = 10$), ileoileal anastomotic leakage group. Group B and D rats had a complete anastomosis (end-to-end single layer anastomoses with 0# silk sutures). Group C and E rats had an anastomosis with a 5 mm opening in intestinal anastomosis anterior wall. Group B and C rats had 3 cm jejunum resection at 15 cm from the Treitz ligament. Group D and E rats had 3 cm ileum resection at 15 cm proximal to the ileocecal junction. Pre- and post-operative venous blood, and postoperative ascites samples were collected. DNAs was extracted from these blood and ascites samples, and PCR techniques were used to amplify lacZ genes and 16S ribosomal RNA genes (16SrRNA genes). **Results**

收稿日期: 2007-12-04; 修订日期: 2008-03-20。

作者简介: 雷姗姗, 女, 湖南省人民医院住院医师, 主要从事乳腺、甲状腺及胃肠道肿瘤的早期诊断与治疗方面的研究。

通讯作者: 李铁钢 E-mail: tshltg@sina.com

(1) Comparing Group B with Group C, or Group D with Group E, there was no difference in positive ratio of lacZ genes in peripheral blood (PB) ($P > 0.05$), but the positive ratio of 16SrRNA genes expression in PB in Group C and Group E was significantly higher than that in group B and Group D respectively ($P < 0.05$). (2) In ascites samples, the positive expressing ratios of lacZ genes and 16SrRNA genes in Group C and Group E were both higher than in Group B and Group D ($P < 0.05$); In jejunal anastomotic leakage and ileal anastomotic leakage groups, the positive ratios of lacZ genes in ascites were higher than the positive ratios in PB ($P < 0.05$); but there were no significant differences between the the positive ratios of 16SrRNA genes in ascites and in PB ($P > 0.05$). **Conclusions** (1) Detecting 16SrRNA genes from PB with PCR has certain significance for early diagnosis of jejunal anastomotic leakage and ileal anastomotic leakage, (2) PCR might be a useful tool for early diagnosis of jejunal anastomotic leakages and ileal anastomotic leakages by detecting lacZ genes or 16SrRNA genes from ascites.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(4):367-371]

Key words: Stomas; Intestinal Fistula/compl; Polymerase Chain Reaction (PCR); DNA, Bacterial/anal

CLC number: R 656.7

Document code: A

肠道吻合口瘘是肠道手术术后一种严重的并发症。早期诊断和及时处理吻合口瘘是改善预后、降低疾病致残率和病死率的关键。多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是早期菌血症有效检测方法^[1], 而大肠杆菌的 lacZ 基因和所有细菌的 16SrRNA 基因是 PCR 检测的理想指标。本实验使用 Wistar 大鼠模拟临床情况, 分别建立常规空肠-空肠吻合、回肠-回肠吻合、空肠和回肠吻合口瘘的模型, 观察空、回肠吻合口瘘对大鼠一般情况的影响; 并以 PCR 动态检测术前术后外周血及腹水中 lacZ 基因和 16SrRNA 基因的阳性率, 探讨 PCR 方法检测细菌 DNA 对空、回肠吻合口瘘的早期诊断价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 健康雌性 Wistar 大鼠 50 只 (购于中南大学湘雅二医院动物实验中心), 体重 (250 ± 30) g。动物随机分为 5 组, 每组 10 只。A 组为假手术组; B 组为空肠-空肠吻合组; C 组为空肠吻合口瘘组; D 组为回肠-回肠吻合组; E 组为回肠吻合口瘘组。每组体重比较差异无显著性。实验前禁食 8 h, 自由饮水。

1.1.2 实验试剂 引物: 大肠杆菌 β 半乳糖苷酶基因 (lacZ 基因) 的 BG-1, BG-4, 上游引物 5' - CTTTCCTGGTTTCCGGCACCAGAA - 3', 下游引物 5' - AACCACCGCACGATAGAGATTTCGGG - 3', 扩增片段长度为 762 bp; 细菌共有的 16SrRNA 基因高度保守区 16SrRNA (+), 16SrRNA (-), 上游引物 5' - AGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', 下游引物 5' - GGACTACCAGGTATCTAAT - 3', 扩增片段长度为

798 bp (上海捷瑞生物有限公司合成) (图 1)。大肠杆菌 ATCC - 25922 由湘雅二医院传染科赠与。

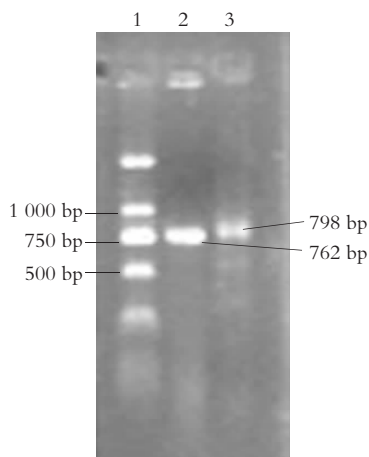


图 1 lacZ 基因和 16SrRNA 基因阳性 PCR 扩增产物电泳图 1: Marker; 2: lacZ 基因阳性对照, 762 bp; 3: 16SrRNA 基因阳性对照, 798 bp

1.2 实验方法

1.2.1 动物疾病模型的建立及采样 分组标记, 称重后用 10% 水合氯醛按 3 mL/kg 腹腔注射麻醉。按无菌操作取右下腹直切口长 4 cm。A 组打开腹腔找到回盲部后, 仅理顺肠管并回纳腹腔, 不予其他处理, 关腹。B 组和 C 组打开腹腔后, 切除 Treitz 韧带 15 cm 以下约 3 cm 空肠肠管, B 组用 0 号丝线行单层间断端端吻合, C 组吻合时留前壁 5 mm 不缝合^[2]。D 组和 E 组^[3] 切除回盲部上方约 15 cm 处的 3 cm 的肠管后, D 组行单层间断端端吻合, E 组行后壁和两侧壁的单层间断吻合时, 留前壁 5 mm 不缝合。观察各组无吻合口出血及坏死后, 理顺肠管并回纳腹腔, 关腹。术前术后按 0.21 g/kg 行腹腔内注入头孢唑林钠各 1 次。

术后大鼠进食进水不受限。观察大鼠的精神状态。所有大鼠术前3 d从尾静脉采血1 mL,术后36 h眶静脉取血1 mL。术后72 h处死后采下腔静脉血3 mL,均放入EDTA 无菌抗凝管4 ℃保存;与此同时B,C,D,E组抽取腹水1~2 mL于无菌微量离心管(EP管)内,4 ℃保存。

1.2.2 PCR 检测 取待测全血或腹水500 μL,溶血后用2 mg/mL蛋白酶K和质量分数为10%的十二烷基硫酸钠(SDS)将细菌破壁,苯酚、氯仿萃取,用无水乙醇沉淀和体积分数为75%的乙醇洗涤,将沉淀物重溶于TE缓冲液中作为DNA模板备用。采用总体积20 μL PCR反应体系,PCR扩增循环条件:均以双蒸水作为空白对照,大肠杆菌DNA为阳性对照,健康大鼠全血DNA为正常对照。预变性94 ℃ 5 min,变性94 ℃ 40 s,退火61 ℃ 45 s,72 ℃ 延伸1.33 min;共循环35次。最后72 ℃延伸10 min。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并与PCR Maker(D2 000)比对,用凝胶图象分析系统扫描记录。比较不同组别间的PCR阳性率。

1.2.3 病理标本检查方法 大鼠处死时,判定模型是否成功。B,C,D,E组以吻合部位为中心切取上下各1 cm的全层肠段(包括吻合口),A组分别取相应部位的小肠全层肠段各2 cm,用10%福尔马林溶液立即固定。石蜡包埋、切片,厚度4 μm,常规HE染色,光镜下观察肠管病理改变情况。

1.3 统计学处理

所有计数资料组间差异使用Fisher精确概率或卡方检验。所有数据使用SPSS(13.0)软件统计。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物一般情况

A组动物精神状态好,活动和反应灵敏,进食和饮水正常,不呕吐,无腹部隆起。B,D组动物精神可,进食水无明显减少,活动稍减少,未见呕吐现象,刺激时反应较灵敏,无腹部膨隆;C组及E组动物手术后精神差,不喜活动,刺激时反应差,进食水明显减少,未见明显呕吐现象,术后2~3 d可见明显腹部膨隆。

2.2 总DNA的鉴定

A260/280值均为1.7~2.0,纯度较高。浓度为100~200 μg/mL。

2.3 PCR反应结果

所有大鼠术前两组靶基因PCR均为阴性。阳性率的判断:术后36 h或72 h任一血标本PCR阳性即判为该动物外周血PCR阳性。

A组外周血lacZ基因和16SrRNA基因PCR均为阴性。外周血B,D组术后外周血lacZ基因和16SrRNA基因PCR均为阴性,C,E组术后外周血lacZ基因PCR阳性率均很低,与B,D组相比,差异无显著性($P > 0.05$);C,E组术后外周血16SrRNA基因PCR阳性率显著高于B,D组($P < 0.05$)(表1)(图2-3)。

腹水C,E组术后腹水lacZ基因PCR阳性率显著高于B,D组($P < 0.05$);C,E组术后腹水16SrRNA基因PCR阳性率显著高于B,D组的($P < 0.05$)(表2)(图2-3)。

C,E组术后腹水lacZ基因阳性率显著高于外周血($P < 0.05$);C,E组术后腹水16SrRNA基因阳性率与外周血无显著性差异($P > 0.05$)(表3-4)。

C,E组外周血lacZ基因和16SrRNA基因术后72 h的PCR阳性率较36 h均有所增加,但两者差异无显著性($P > 0.05$)(表5)。

PCR检测术后外周血lacZ基因对空、回肠吻合口瘘的敏感性为5.0%,显著低于16SrRNA基因的55.0%($P < 0.05$);而PCR检测术后腹水lacZ基因和16SrRNA基因对空、回肠吻合口瘘的敏感性分别为60.0%和65.0%,两者差异无显著性($P > 0.05$)(表6)。

2.4 肠管组织病理学改变

所有手术模型均成功。光镜下观察:A组显示为正常空肠,回肠结构。B,D两组术后72 h黏膜病变轻,小肠绒毛排列尚整齐,纹状缘欠清晰,柱状上皮细胞水肿。C,E组72 h见大量绒毛上皮细胞坏死脱落,且有向绒毛基底部扩展趋势;黏膜固有层出血,隐窝细胞肿胀;黏膜下层及肌层水肿,有较多含颗粒的炎症细胞浸润。

表1 PCR检测外周血lacZ基因和16SrRNA基因结果

分组	n	lacZ 基因				n	16SrRNA 基因			
		阳性	阴性	阳性率(%)	P值		阳性	阴性	阳性率(%)	P值
B组	10	0	10	0.0	>0.05	10	0	10	0.0	0.043 ¹⁾
C组	10	0	10	0.0		10	4	6	40.0	
D组	10	0	10	0.0		10	0	10	0.0	
E组	10	1	9	10.0		10	7	3	70.0	0.0030

注:1)该组P值判定时取单侧检验,可说明C组阳性率高于B组;其余P值判定均取双侧检验

表2 PCR检测腹水 lacZ 基因和 16SrRNA 基因结果

分组	n	lacZ 基因				P 值	n	16SrRNA 基因				P 值
		阳性	阴性	阳性率(%)				阳性	阴性	阳性率(%)		
B组	10	0	10	0.0	0.033	10	0	10	0.0	0.033		
C组	10	5	5	50.0		10	5	5	50.0			
D组	10	1	9	10.0	0.020	10	2	8	20.0	0.023		
E组	10	7	3	70.0		10	8	2	80.0			

表3 lacZ 基因在 C,E 组外周血及腹水中的比较

标本	n	C组			n	E组		
		阳性	阴性	阳性率(%)		阳性	阴性	阳性率(%)
外周血	10	0	10	0.0	10	1	9	10.0
腹水	10	5	5	50.0	10	7	3	70.0
P 值		<0.05				<0.05		

表4 16SrRNA 基因在 C,E 组外周血及腹水中的比较

标本	n	C组			n	E组		
		阳性	阴性	阳性率(%)		阳性	阴性	阳性率(%)
外周血	10	4	6	40.0	10	7	3	70.0
腹水	10	5	5	50.0	10	8	2	80.0
P 值		>0.05				>0.05		

表5 PCR检测 B,C,D,E 组外周血细菌 DNA 阳性例数

分组	n	lacZ 基因			16SrRNA 基因		
		术前	36 h	72 h	术前	36 h	72 h
B组	10	0	0	0	0	0	0
C组	10	0	0	0	0	3	5
D组	10	0	0	0	0	1	1
E组	10	0	0	1	0	6	7

表6 PCR检测 lacZ 基因及 16SrRNA 基因对空、回肠吻合口瘘诊断效果的比较

分组	n	外周血		腹水	
		敏感性(%)	特异性(%)	敏感性(%)	特异性(%)
lacZ 基因	40	5	100	60	95
16SrRNA 基因	40	55	100	65	90

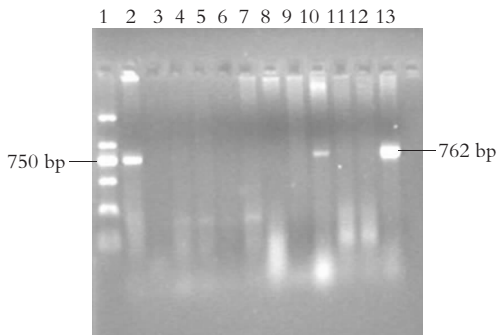


图2 C,D,E 组 lacZ 基因 PCR 扩增产物电泳图

1: Marker; 2: 阳性对照, 762 bp; 3: 试剂对照; 4: 空白对照; 5: D组外周血 36 h; 6: D组外周血 72 h; 7: D组腹水; 8: C组外周血 36 h; 9: C组外周血 72 h; 10: C组腹水; 11: E组外周血 36 h; 12: E组外周血 72 h; 13: E组腹水

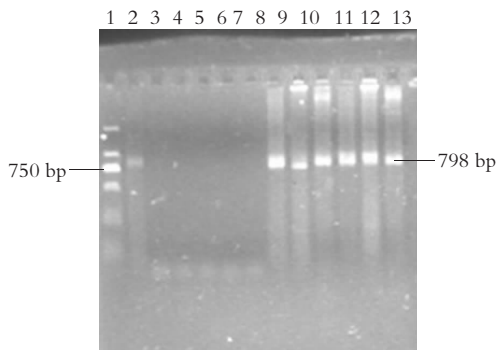


图3 C,D,E 组 16SrRNA 基因 PCR 扩增产物电泳图

1: Marker; 2: 阳性对照, 798 bp; 3: 试剂对照; 4: 空白对照; 5: D组外周血 36 h; 6: D组外周血 72 h; 7: D组腹水; 8: C组外周血 36 h; 9: C组外周血 72 h; 10: C组腹水; 11: E组外周血 36 h; 12: E组外周血 72 h; 13: E组腹水

3 讨论

吻合口瘘发生早期相对隐匿, 症状多在术后 7~10 d 出现, 表现为消化液、脓液、和气体从引流管、创口或腹壁间歇性流出, 但此时, 最佳的处理机会往往已失去^[4]。BG 是大肠杆菌 lacZ 基因上的一段高度保守序列, 而细菌 16SrRNA 基因是细菌染色体上编码 16SrRNA 相对应的 DNA 序列, 存在于所有细菌中, 被选为细菌病原体 PCR 扩增部分或全部序列的目标序列^[5]。PCR 方法检测 lacZ 基因和 16SrRNA 基因临床意义大, 据报道 PCR 法检测细菌最低浓度为 0.3 CFU/mL (菌落形成单位/mL)^[6], 而常规使用的细菌培养最低细菌数为

$1 \times 10^5/\text{mL}$ ^[7]。本实验在同时排除抗生素的应用、动物体内正常菌群的干扰、术后肠道菌群移位等影响的前提下,显示 PCR 检测术后外周血 lacZ 基因对空、回肠吻合口瘘敏感性低,而检测 16SrRNA 基因的敏感性明显提高。提示 PCR 检测术后外周血大肠杆菌 lacZ 基因对大鼠空、回肠吻合口瘘的诊断意义可能不大,这与空、回肠内细菌的种类及数量少,主要为链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌,大肠杆菌含量很少相关^[8],从而使实验结果滞后于临床表现,缺乏敏感性;而 16SrRNA 基因存在于所有细菌的染色体基因中,这一特性使得 PCR 检测 16SrRNA 基因较 lacZ 基因在同等实验条件下对空、回肠吻合口瘘的诊断有更显著的意义,即外周血 16SrRNA 基因的 PCR 阳性率对空回肠吻合口瘘的早期诊断能起到一定的提示作用。PCR 检测术后腹水中 lacZ 基因和 16SrRNA 基因对大鼠空、回肠吻合口瘘的检出率均较高,提示其对空、回肠吻合口瘘的早期诊断可能有一定的辅助意义。特别是 lacZ 基因,吻合口瘘组腹水中的阳性检出率显著高于外周血所得的阳性率,说明 PCR 检测术后腹水 lacZ 基因较外周血敏感,能显著提高空、回肠吻合口瘘的诊断率。可能与在吻合口瘘发生后,机体在出现明显菌血症之前,大量细菌已进入腹腔,引起了局部腹腔感染有关。但空、回肠吻合口瘘组腹水中 16SrRNA 基因的阳性率与同组外周血相似,并不能提高空、回肠吻合口瘘的诊断率,这主要与空、回肠吻合口瘘组外周血中 16SrRNA 基因的阳性率敏感性已较高有关。

PCR 技术能灵敏、便捷地诊断外科早期菌血症和局部继发感染,随着其不断发展,特别是实时荧光定量 PCR 技术的广泛应用和更好靶基因的获得,PCR 技术将为吻合口瘘的早期诊断提供更大益处。

参考文献:

- [1] 吕艺,刘铁军,宋阳,等. 全血中细菌 DNA 检测方法的建立及初步应用[J]. 感染、炎症、修复,2004,5(3):69-72.
- [2] Emet T, Bilsel Y, Tilki M, *et al.* Early diagnosis of colorectal anastomotic leakages by detection of bacterial genome[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2005, 11(3):195-200.
- [3] 蔡晓敏,任建安,黎介寿. 腹腔感染对肠吻合口愈合影响的实验研究[J]. 江苏医药杂志,2000,26(7):526-527.
- [4] 任建安,黎介寿. 重视肠瘘的早期诊断与快速治疗[J]. 中华胃肠外科杂志,2006,9(4):279-280.
- [5] Teng LJ, Hsueh PR, Huang YH, *et al.* Identification of bacteroides thetaiotaomicron on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4):1727-1730.
- [6] Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki I. Comparison of detection methods for legionella species in environmental water by colony isolation fluorescent antibody staining and polymerase chain reaction[J]. Microbiol Immunol, 1993, 37(2):617-622.
- [7] Leonard J, Lascolea JR, Dryia D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance[J]. J Clin Microbiol, 1984, 19(2):187-190.
- [8] 盛吉芳. 抗生素应用与胃肠微生态[J]. 中国实用内科杂志,2006,26(13):968-970.