

碳酸氢钠治疗家兔菌血症模型后的心肌细胞器损伤

殷国庆^{1,2}, 唐家琪³, 陆承平^{1*}

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断和免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;
2. 南京市第二医院, 江苏 南京 210003; 3. 南京军事医学科学院, 江苏 南京 210002)

摘要: 在脑膜炎奈瑟球菌 (NM) 菌血症家兔模型中, 用细胞组织化学法观察 5% 碳酸氢钠溶液对心肌细胞器变性的影响。24 只家兔均分为对照组、NM 组、碳酸氢钠组 (Sb 组)、高渗盐水组 (Hs 组)。其中 NM 组、Sb 组、Hs 组动物分别静脉注射 1.0×10^{11} CFU \cdot kg⁻¹ 的 NM; 对照组动物静注生理盐水 1 mL \cdot kg⁻¹。60 min 后, 所有动物都静脉注射等量液体 (3.3 mL \cdot kg⁻¹): 对照组、NM 组为生理盐水, Sb 组为 5% 碳酸氢钠, Hs 组为 3.5% 氯化钠。NM 攻击 120 min 后处死动物, 观察心肌细胞超微结构, 检测碱性磷酸酶、酸性磷酸酶活性变化。结果显示: 菌体攻击引起心肌形态学改变, 心肌内碱性磷酸酶分布异常, 溶酶体增多; 注射碳酸氢钠加重心肌损伤, 表现为溶酶体损伤, 膜细胞器变性。提示: 对 NM 感染性休克的家兔用 5% 碳酸氢钠治疗, 会加重心肌细胞器变性。

关键词: 家兔败血症; 碳酸氢钠; 脑膜炎奈瑟菌; 心肌细胞; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 细胞组化染色
中图分类号: R378.15; R33 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2006) 03-0083-05

Damage of organelles in myocardium after sodium bicarbonate resuscitation in rabbits with bacteremia

YIN Gou-qing^{1,2}, TANG Jia-qi³, LU Cheng-ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. The Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210003, China;
3. Nanjing Academy of Military Medical Science, Nanjing 210002, China)

Abstract: The degeneration of myocardial cellular organelles following sodium bicarbonate resuscitation in rabbits with *Neisseria meningococcemia* (NM) was investigated by electron microscopy cytochemistry. Twenty-four rabbits were divided into four groups, namely, the control, NM infection, Sb and Hs groups ($n=6$, in each group). The rabbits of the NM, Sb and Hs groups were injected with NM 1×10^{11} CFU \cdot kg⁻¹, while the rabbits of the control group were treated with normal saline solution 1 mL \cdot kg⁻¹ iv. 60 min after NM challenging or normal saline solution treating, all the animals were infused with equal-volume fluid of 3.3 mL \cdot kg⁻¹. The animals of the control and the MC control groups were infused with normal saline; the Hs group, with 3.5% saline chloride solution; and the Sb group, with 5% sodium bicarbonate. All the animals were sacrificed at 120 min after MC challenging. Ultrastructural examination and electron microscopy cytochemical staining, namely, alkaline phosphatase and acid phosphatase staining, was operated. The results showed that meningococci injection caused morphological alteration of myocardium, abnormal distribution of ALPase reactants but no alteration of lysosomes in myocardium; and administration of 5% sodium bicarbonate or hypertonic saline chloride to rabbits with meningococcemia aggravated myocardial damage, featured by destruction of lysosome and degeneration of membrane organelle. It suggested that perfusion of 5% sodium bicarbonate aggravates degeneration of myocardium of rabbits with bacteremia.

Key words: rabbits sepsis; sodium bicarbonate; *Neisseria meningococcemia*; myocardial cell; phosphatase alkaline; phosphatase acid; electron microscopy cytochemical staining

败血症是由细菌感染引起的危急重病。在疾病发生过程中, 细菌释放出内毒素, 激活炎症反应, 引起组织损伤和心肌病变, 导致病人心功能衰竭和休克^[1]。给动物静脉注射细菌、内毒素, 可以制造感染性休克动物模型, 研究该病的发病机制, 探讨治疗方案。扩张血容量是严重败血症、感染性休克重要

收稿日期: 2005-04-01

基金项目: 南京医学科技重点专项基金 (ZKG-9809); 江苏省卫生厅科技项目 (TS-9904)

作者简介: 殷国庆 (1952-), 主任医师, 博士研究生, 主要从事传染病临床研究。* 通讯作者, E-mail: lucp@njau.edu.cn。

的治疗措施^[2]。由于静脉内输注 5% 碳酸氢钠具有纠酸和扩容双重的作用, 人类感染性休克扩张血容量的治疗中, 该药是常用药物^[3]。但是, 在大鼠内毒素休克模型中, 输注 5% 碳酸氢钠引起平均动脉压下降, 横纹肌细胞代谢恶化^[4]。作者在先前的研究中也发现高渗溶液治疗家兔感染性休克会导致心功能进一步恶化, 治疗后 60 min 内引起动物死亡^[5]。本试验采用酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的电镜细胞组织化学法, 研究碳酸氢钠治疗后心肌细胞器变性和心脏抑制的原因, 以揭示心肌细胞损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 脑膜炎双球菌 A 型菌液制备

A 型脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningococcus*, NM, Lot: NM-A 1987), 由南京市疾病预防控制中心微生物科提供。菌株接种于 100 mL 肉汤内, 36 °C 18 h, 然后接种于绵羊血琼脂平板, 在 36 °C、5% CO₂ 下培养 18 h。采集菌体, 生理盐水洗 2 遍。用比浊法测得菌体含量 (菌液最终含量 1×10^{11} CFU · mL⁻¹)。菌液于 -20 °C 保存。

1.2 实验动物

新西兰家兔 24 只, 体重 2.1 ~ 2.7 kg, 普通级, 由南京中医药大学实验动物中心提供。动物饲养和实验条件符合卫生部实验动物管理条例。

1.3 试验设计

24 只家兔随机分成 4 组: 对照组、NM 菌血症模型组 (NM 组)、碳酸氢钠组 (Sb 组)、高渗盐水组 (Hs 组)。实验开始时, NM 组、Sb 组、Hs 组 3 组动物经耳缘静脉注射 NM 悬液 1×10^{11} CFU · kg⁻¹, 对照组动物注射生理盐水 1 mL · kg⁻¹。60 min 后, 对照组和 NM 组动物注射生理盐水 3.3 mL · kg⁻¹; Hs 组动物注射 3.5% (3.5 g · dL⁻¹, 下同) 氯化钠 3.3 mL · kg⁻¹; Sb 组动物注射 5% (5.0 g · dL⁻¹) 碳酸氢钠 3.3 mL · kg⁻¹。上述溶液在 10 min 内注射完毕。NM 攻击后 120 min, 处死所有动物, 并迅速取心脏, 切下小块心室肌。制做电镜切片, 进行超微结构观察和酸性磷酸酶细胞化学、碱性磷酸酶的细胞化学检测。

1.4 常规电镜样品的制备

将标本切成 1 mm³ 大小, 用 2.5% 的戊二醛固定 2 h, 然后用 0.1 mol · L⁻¹、pH 7.4 磷酸缓冲液洗涤; 用体积分数为 1% 的锇酸固定 2 h, 酒精逐级脱水, 无水丙酮置换, Epon 812 聚合和包埋; LKB V 型超薄切片机制片, 醋酸铀-柠檬酸铅对比染色, 日立 H-600 型透射电镜观察和照相。

1.5 酸性磷酸酶细胞化学染色

依照 Lewis 等^[6]报告的方法, 用酸性磷酸酶细胞化学方法染色, 观察酶活性产物的分布。心肌用 2% 戊二醛、5% 蔗糖和 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸的固定液中 (pH 7.1) 固定。用 DTK-3000 切片机 (Dosa-ka, Kyoto, Japan) 切片, 组织切片厚度不超过 40 μm, 磷酸缓冲液冲洗。切片与哺育液在室温哺育 60 min。哺育液含有 40 mmol · L⁻¹ Tris (pH 5.2)、8 mmol · L⁻¹ β-甘油酸钠和 2.4 mmol · L⁻¹ 硝酸铅。哺育后用磷酸缓冲液冲洗, 锇酸后固定, 环氧树脂包埋, 超薄切片。不作电子染色, 直接用电镜 (日立 H-600 型) 观察。同时每个样本都设阴性对照, 在哺育液中不加甘油酸钠。阴性染色标本不应有酶反应物。

1.6 碱性磷酸酶细胞化学染色

碱性磷酸酶染色与酸性磷酸酶染色过程完全相同, 仅哺育液成分不同。哺育液含有: 30 mmol · L⁻¹ Tris/maleate sulphate、8 mmol · L⁻¹ β-甘油酸钠、5 mmol · L⁻¹ 硫酸镁、20 mmol · L⁻¹ 醋酸铅, pH 9.2。每个样本均设阴性对照。

2 结果

2.1 心肌的超微结构变化

受细菌攻击的 3 组家兔, 都观察到心肌病变。变性的心肌细胞肌膜损伤, 膜的双层结构消失。肌浆网扩大成囊泡状、肌丝挛缩, 在两挛缩带之间肌丝断裂成许多片段, 此片段直径如线粒体大小、无膜包绕。线粒体结构正常, 聚集在肌膜内 (图 1-B)。细胞核成为不规则高电子密度物, 核膜损伤。毛细血

管内皮和基底膜损伤；血管周围常见多个损伤的心肌细胞。对照组动物心肌细胞无异常（图1-A）。

NM组：主要为肌膜损伤，肌浆网扩张，少数细胞有肌丝挛缩。Sb和Hs组：近半数细胞内肌丝挛缩，细胞核损伤。

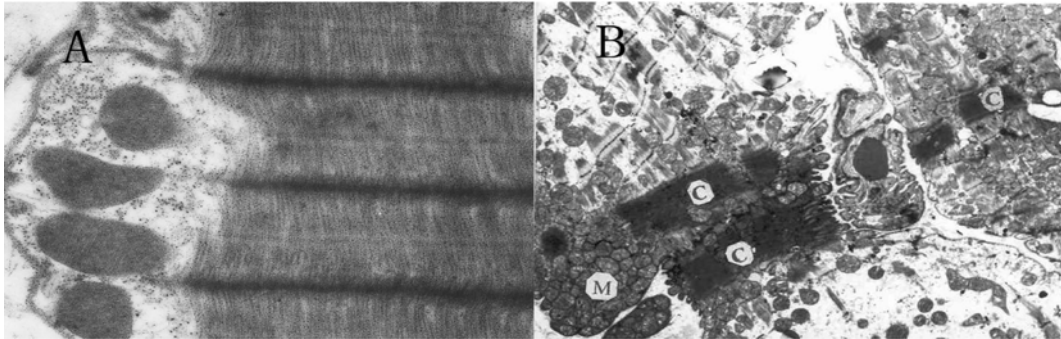


图1 心肌细胞的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of myocardium

A. 正常的心肌细胞（对照组）， $\times 8\ 000$ ；B. Sb组：变性的肌心，包括肌丝挛缩（C）、膜内腺粒体聚集（M）， $\times 3\ 000$

A. Normal myocardium in the control group, $\times 8\ 000$; B. Myocardial degeneration was showed, including myofilament contracture (C), and mitochondria gathering inside the membrane (M) in the Sb group, $\times 3\ 000$

2.2 碱性磷酸酶细胞化学染色

由于未做电子染色，图中细胞器为淡灰色，碱性磷酸酶产物为黑色颗粒。对照组：反应物显示高电子密度物，位于细胞浆内。心脏小血管的内皮上也有颗粒状酶反应物。对照组中均无碱性磷酸酶活性颗粒（图2-A）。

NM组：心肌的肌膜、内浆网上见酶反应物，但细胞浆内无酶产物；血管内皮细胞上见酶反应物（图2-B）。Sb和Hs组：肌膜、横管、肌浆网、线粒体膜上的酶反应产物增多。颗粒状反应物弥漫分布于细胞浆内（图2-C、图2-D）。

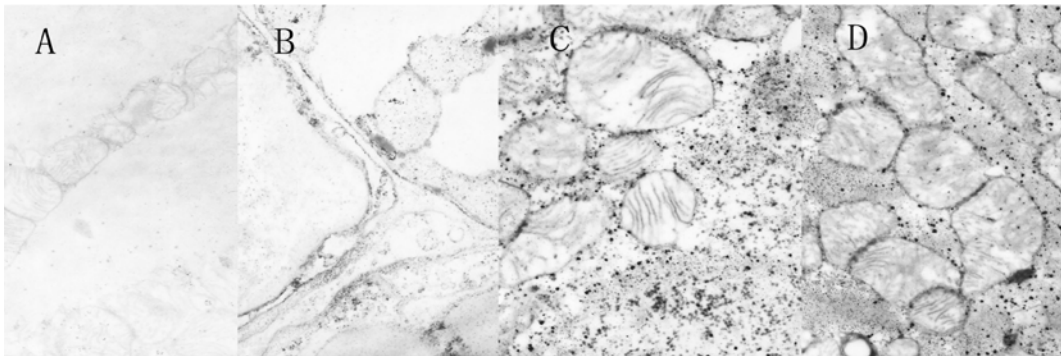


图2 心肌组织碱性磷酸酶染色（ $\times 15\ 000$ ）

Fig. 2 ALPase staining of myocardium

A. 对照组，细胞器上无酶反应产物；B. NM组，线粒体和血管壁上有酶产物，细胞浆内无酶产物；C. Sb组，酶反应物增多，分布在胞浆中；D. Hs组，酶产物分布与Sb组相同。A. There were no ALPase reactants in negative control staining in the control group; B. ALPase reactants were located on the peri-chondriosome and endothelium of vessels in the NM group; C. The tiny particulates of ALPase reactants diffused in the cytoplasm in the Sb group; D. Shape of ALPase reactants in the Hs group was similar to that in the Sb group.

2.3 酸性磷酸酶细胞化学染色

对照组动物心肌细胞的酶反应产物为高电子密度物，位于溶酶体上。溶酶体卵圆形，外有膜包裹。心肌内溶酶体数量稀少，心肌细胞浆内无酶反应物。所有阴性对照中，均发现酸性磷酸酶和碱性磷酸酶反应产物。

NM组动物心肌细胞内溶酶体数量增多，但结构正常（图3-A）。Sb和Hs组动物心肌细胞溶酶体被破坏，酸性磷酸酶反应物如颗粒状，位于胞浆内及线粒体周围（图3-B、C）。注射 $3.3\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的

碳酸氢钠或高渗氯化钠, 都引起溶酶体损伤。

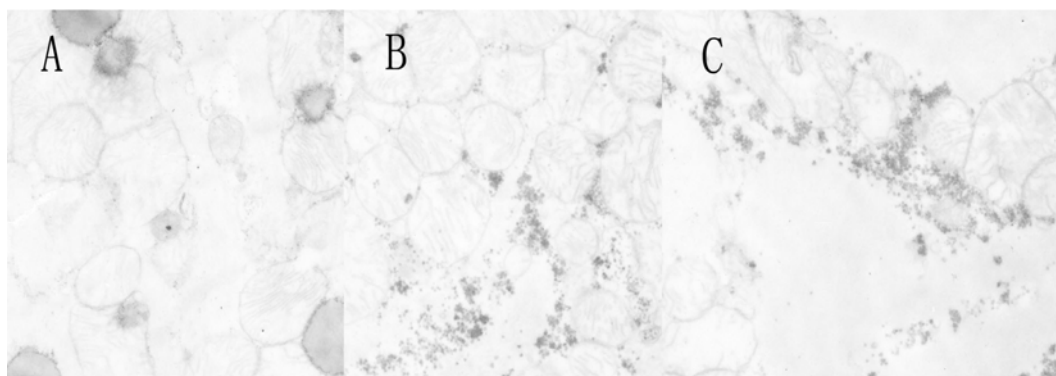


图 3 心肌组织酸性磷酸酶染色 ($\times 12\ 000$)

Fig. 3 ACPase staining of myocardium

A. NM 组, 心肌细胞内溶酶体卵圆形, 外有膜包绕, 胞浆内无活性反应物; B. Sb 组, 溶酶体结构破坏, 颗粒状酶位于胞浆内; C. Hs 组, 溶酶体形状与 Sb 组相似。A. NM group, lysosome was in oval shape and enveloped by membranes. No ACPase reactants were detected in cytoplasm; B. Sb group, lysosome structure was destroyed, and the granular ACPase reactants were observed in cytoplasm; C. The shape of lysosomes in the Hs group was similar to that in the Sb group.

3 讨论

暴发型流脑是典型的感染性休克, 病程中心肌病变起了重要作用^[7]。给家兔注射脑膜炎奈瑟菌, 可以引起心肌损伤和休克, 与人类的心肌损伤的电镜结果相似^[8]。因此, 此动物模型可以用于感染性休克治疗学研究。

以前的研究表明, 给大鼠内毒素休克模型输注碳酸氢钠, 引起平均动脉压降低, 没有改善细胞内 pH^[4]。给家兔感染性休克动物模型注射 5% 碳酸氢钠或 3.5% 高渗氯化钠溶液, 60 min 内加重心衰, 甚至引起动物死亡^[5]。本试验在原研究的基础上, 用细胞组织化学染色法进一步表明: 5% 碳酸氢钠、3.5% 高渗氯化钠溶液加重心肌细胞内溶酶体被破坏和膜细胞器代谢异常的程度。

5% 碳酸氢钠溶液是碱性溶液, 具有纠正酸血症作用。该溶液又是高渗溶液, 具有强烈扩张循环容量的作用。3.5% 氯化钠溶液渗透压为 $1\ 197\ \text{mOsm} \cdot \text{L}^{-1}$, 其扩容作用与 5% 碳酸氢钠相类似。但此溶液是中性溶液, 无纠正酸血症的作用。因此, 本研究以 3.5% 氯化钠作为高渗透压溶液对照。在家兔败血症模型的研究中, 补充 5% 碳酸氢钠和 3.5% 氯化钠溶液都引起心肌收缩力下降、加重心肌损伤^[5]。因此, 可以推断 5% 碳酸氢钠的高渗作用在心肌损伤中扮演了重要作用。

酸性磷酸酶是水解酶, 定位在溶酶体内。当溶酶体损伤时, 酶的反应产物在细胞浆内弥散, 溶酶体膜破坏。以前的研究表明, 溶酶体异常发生在心脏损伤的早期^[9]。Okada 等^[10]的研究发现, 给大鼠注射内毒素, 2 h 后心肌内溶酶体数量增多, 有些溶酶体结构破坏。本研究显示, 细菌攻击家兔后心肌溶酶体的变化与 Okada 等所观察到的相似; 5% 碳酸氢钠和高渗氯化钠溶液还加重了溶酶体损伤, 必然进一步恶化心功能。

碱性磷酸酶又称碱性磷酸单脂酶, 属膜蛋白中的一种, 经酶羧基末端的磷脂酰肌酶嵌于膜的双脂质层, 是质膜标记酶^[11]。碱性磷酸酶反应物分布异常, 是细胞膜功能变化的指标。在 Schultz-Hector 等^[12]报告中, 大鼠经放射线照射后, 心脏血管上碱性磷酸酶活性下降与心肌病变、心衰程度密切相关。碱性磷酸酶的另一功能是内毒素减毒, 使内毒素的类脂 A 的去磷酸化^[12-15]。脑膜炎双球菌侵入机体释放出大量内毒素, 引起内毒素血症。在内毒素血症的动物模型中, 碱性磷酸酶反应物增多还提示心肌细胞增强了中和内毒素的能力^[10]。笔者分析了碱性磷酸酶浆膜型同功酶, 内毒素攻击后酶活性产物增加, 酶染色强度增强。不难推测: 细菌的内毒素也引起宿主增强了中和内毒素的能力。5% 碳酸氢钠和高渗氯化钠溶液治疗引起心肌细胞内碱性磷酸酶产物弥散分布, 还提示上述溶液加重了心肌细胞内膜细胞器变性。

上述研究表明：注射5%碳酸氢钠溶液加重了脑膜炎奈瑟菌菌血症家兔的心功能衰竭，心肌内膜细胞器和溶酶体是变性引起心功能下降的原因。

参考文献：

- [1] Bachetti T, Pasini E, Suzuki H, et al. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31: 1509 - 1514
- [2] Holmes C L, Landry D W, Granton J T. Science review: vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology [J]. *Crit Care*, 2004, 8: 15 - 23
- [3] Chrusch C, Bautista E, Jacobs H K, et al. Blood pH level modulates organ metabolism of lactate in septic shock in dogs [J]. *J Crit Care*, 2002, 17: 188 - 202
- [4] Bollaert P E, Robin-Lherbier B, Mallie J P, et al. Effects of sodium bicarbonate on striated muscle metabolism and intracellular pH during endotoxic shock [J]. *Shock*, 1994, 1: 196 - 200
- [5] 张运生, 刘歧山, 殷国庆, 等. 不同剂量5%苏打对脑膜炎双球菌感染性休克家兔心功能的影响 [J]. *南京铁道医学院学报*, 1999, 18(3): 148 - 151
- [6] Lewis P R, Knight D P. *Cytochemical Staining Methods for Electron Microscopy* [M]. New York: Amsterdam Elsevier Science Publishers, 1992: 147
- [7] 殷国庆, 林厚基, 李解权. 暴发性流脑病程中伴发心肌损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 13(3): 372 - 373
- [8] 殷国庆, 钟备, 林厚基, 等. 家兔血行感染脑膜炎双球菌对左心室功能和心肌超微结构的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 1997, 14(6): 744 - 746
- [9] Leighty E G, Stoner C D, Ressallat M M, et al. Effects of acute asphyxia and deep hypothermia on the state of binding of lysosomal acid hydrolases in canine cardiac muscle [J]. *Circ Res*, 1967, 21: 59 - 64
- [10] Okada T, Zinchuk V S, Seguchi H. Lipopolysaccharide administration increases acid and alkaline phosphatase reactivity in the cardiac muscle [J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 58: 421 - 426
- [11] Henthorn P S, Raducha M, Edwards Y H, et al. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase close homology to placental alkaline phosphatase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 1234 - 1238
- [12] Schultz-Hector S, Balz K. Radiation-induced loss of endothelial alkaline phosphatase activity and development of myocardial degeneration. An ultrastructural study [J]. *Lab Invest*, 1994, 71: 252 - 260
- [13] Hirose S, Knez J J, Medof M E. Mammalian glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and intracellular precursors [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 250: 582 - 590
- [14] McDonald T E, Grinman M N, Carthy C M, et al. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in the heart [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 279: 2053 - 2061
- [15] Poelstra K, Bakker W W, Klok P A, et al. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification [J]. *Lab Invest*, 1997, 76: 319 - 327

责任编辑：周广礼