

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.003

文章编号: 1005-8982(2017)14-0014-05

热射病大鼠死亡危险因素及心肌损伤的实验研究*

陈长富,袁彬彬,董文鹏,刘莹,王晓武

(广州军区广州总医院 心脏外科中心,广东 广州 510010)

摘要:目的 复制热射病(HS)大鼠模型,探讨 HS 大鼠死亡危险因素及心肌损伤情况。**方法** 雄性无特定病原体级 SD 大鼠 48 只,随机分为对照组、HS 组、维生素 E 组(HS 维生素 E 处理)、缬沙坦组(HS 缬沙坦处理),每组 12 只;除对照组外,余组给予 40℃、(65±1)%湿热打击,达复制模型标准后终止;心肌苏木精-伊红染色法(HE)染色及透射电镜观察病理变化。**结果** 对照组体重变化率与其余 3 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),HS 组血清乙酰胆碱(Ach)含量为(9.958±4.283) μg/ml,对照组为(15.734±4.987) μg/ml,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);HE 染色和透射电镜结果显示,HS 大鼠存在心肌损伤,且维生素 E 组、缬沙坦组大鼠心肌损伤程度较 HS 组减轻。**结论** 死亡事件主要发生在发病后 24 h 内,且低体温和较长打击时间是 HS 大鼠死亡的主要危险因素,但相对较高的体重变化率是 HS 大鼠存活的保护因素;HS 大鼠存在心肌损伤,其潜在机制可能是氧化应激和血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡。

关键词: 热射病;动物模型;心肌损伤;氧化应激;死亡率

中图分类号: R594.1

文献标识码: A

Death risk factors and myocardial injury in rat model of heat stroke*

Chang-fu Chen, Bin-bin Yuan, Wen-peng Dong, Ying Liu, Xiao-wu Wang

(Department of Cardiac Surgery, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To establish the rat model of heat stroke, explore the risk factors of death and myocardium injury in the rat model. **Methods** Forty-eight male SD rats of SPF grade were randomly divided into group of blank control (C), group of heat stroke (HS), group of heat stroke vitamin E treatment (VitE) and group of heat stroke Valsartan treatment (Valsartan), each group included 12 rats. Except the group C, the rats of other groups were put in a damp and hot environment of 40℃ (temperature) and (65±1)% (humidity) until the standard of the model of heat stroke was reached. The core temperature of the bodies of rats were monitored via the record of rectal temperature. The responses of heat stress in the HS, VitE HS and Valsartan HS groups and the survival time of rats were analyzed and compared by K-M survival analysis. The risk factors of survival were analyzed by univariate and multivariate Cox regression analyses. The lesions of myocardium were observed through HE staining and transmission electron microscopy (TEM). **Results** The rate of weight change in the group C was significantly lower than that in the groups HS, VitE HS and Valsartan HS ($P < 0.05$). The serum level of acetylcholine (Ach) in the group C [(15.734±4.987) μg/ml] was significantly higher in that in the group HS [(9.958±4.283) μg/ml, $P < 0.05$]. The results of HE staining and TEM showed that there was myocardium injury in the rats with heat stroke, which was milder in the groups VitE HS and Valsartan HS compared with the group HS. **Conclusions** Death mainly occurs in 24 hours after the onset and the major risk factors are low body temperature and long time of striking, but the relatively

收稿日期:2016-10-10

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81671885);广东省自然科学基金(No:2015A030313612);广东省科技计划(No:2014A020212262)

[通信作者] 王晓武, E-mail: xzww_xww@hotmail.com

high rate of weight change is the protective factor of the rat survival. Myocardium injury exists in the rat model of heat stroke, the potential mechanism may be apoptosis of myocardial cells induced by oxidative stress and angiotensin II.

Keywords: heat stroke; animal model; myocardial injury; oxidative stress; mortality

中暑是指人体在高温环境下,由于水和电解质流失过多,散热功能衰竭引起的以中枢神经系统和心血管功能障碍为主要表现的热损伤性疾病^[1]。热射病(heat stroke, HS)是中暑中最严重、致命的,流行病学调查显示其死亡率为 10%~70%。心血管被认为是 HS 中最先受到影响的系统,但损伤程度和机制尚未明确^[2-5]。本研究通过复制 HS 大鼠模型,探讨其心肌损伤的严重程度和潜在机制,分析死亡率及其危险因素,以期为临床研究和治疗 HS 提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要设备和试剂

模拟热气候动物舱(920 培养箱,中国宁波戴维医疗器械股份有限公司),H-7650 型透射电子显微镜(日本日立高新技术那珂事业所),BX51 型荧光数码成像显微镜(日本奥林巴斯株式会社),离心机(美国赛默飞世尔科技公司),酶标仪(Thremo, Multiskan Go S/N:1510-00633, 美国赛默飞世尔科技公司),LS-3035A 型全自动生物组织脱水机(中国沈阳市龙首电子仪器有限公司),BM-VII 型生物组织包埋机、冷冻台、摊片机及 micRom 型石蜡切片机购自中国孝感市宏业医用仪器有限公司,乙酰胆碱测定试剂盒(A105-2, 中国南京建成生物工程研究所),缬沙坦胶囊(X1958, 中国北京诺华制药有限公司),维生素 E 软胶囊[ME30030, 中国广州白云山星群(药业)股份有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 无特定病原体级 SD 大鼠 48 只,体重 278~316 g,广州军区广州总医院实验动物中心饲养 1 周,23℃、(50±5)%湿度,12h 昼/夜循环照明,实验大鼠随机分为对照组、HS 组、维生素 E 组(HS 维生素 E 处理)及缬沙坦组(HS 缬沙坦处理),每组 12 只。

1.2.2 核心体温测量 用动物专用体温计测量大鼠直肠温度(rectal temperature, Tr),以 Tr 代表核心体温。随机选取 20 只大鼠,测量肛温,早、晚各测 1 次,连续监测 7 d,以平均肛温(37.75±0.14)℃作为基础核心体温(basic of core temperature, Tcb)。低体温:Tr 低于 Tcb 1℃以上;高热:Tr 高于 Tcb 1℃以上。

1.2.3 湿热打击方法及 HS 诊断标准 ①湿热打击方法:热打击前将模拟热气候动物舱预热至 40℃、65%湿度。称量大鼠体重,HS 组、维生素 E 组、缬沙坦组大鼠于热打击前 2 h 分别给予生理盐水 1 ml、维生素 E 100 mg/kg(溶解为 1 ml)、缬沙坦 16 mg/kg(溶解为 1 ml)灌胃,分批置于模拟热气候动物舱内进行湿热打击,每隔 10 min 检测 1 次肛温。②HS 诊断标准:肛温达(42.5±0.2)℃同时伴有四肢无力、不能爬行。达到 HS 诊断标准后将大鼠从模拟热气候后舱内取出。热打击期间各组大鼠禁食、水,对照组大鼠置于标准饲养环境中。

1.2.4 恢复期处理方法 各组大鼠称重,记录打击前后体重变化,体重变化率(体液丢失率)=体重变化(热打击前体重-最大核心体温时体重)/热打击前体重×100%;恢复进食、水,在恢复过程中继续给予体温检测 1 次/30 min,持续 3 h 后改为 1 次/6 h;记录体重 1 次/12 h;维生素 E 组、缬沙坦组分别给予维生素 E 100 mg/(kg·d)(溶解为 1 ml)、缬沙坦 16 mg/(kg·d)(溶解为 1 ml)灌胃,对照组、HS 组分别给予生理盐水 1 ml/d 灌胃,72 h 后终止实验并绘制 Kanplan-Meier 曲线、计算死亡率。应用 10%水合氯醛按照 3 ml/kg 腹腔注射麻醉,经腹主动脉采血留取血液和心肌组织标本,检测血清中乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach)含量、应用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)和透射电镜观察各组心肌标本病理改变。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较用 *t* 检验,多组比较用方差分析,两两比较用 LST-*t*, Kanplan-Meier 法作生存曲线,比较采用 Log-rank χ^2 检验,影响因素分析用 COX 回归模型, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 发病时间、体重变化率及血清 Ach 的变化

HS 组平均发病时间为(267.504±26.318)min、维生素 E 组为(226.363±20.314)min、缬沙坦组为(203.927±19.031)min,经方差分析,差异无统计学

意义($F=2.346, P=0.111$)。对照组体重变化率为(0.7 ± 0.1)%, HS 组为(11.2 ± 1.3)%、维生素 E 组为(9.5 ± 0.9)%、缬沙坦组为(8.0 ± 0.8)%, 经方差分析, 差异有统计学意义($F=16.339, P=0.000$), 但 HS 组、维生素 E 组、缬沙坦组体重变化率比较, 差异无统计学意义($P < 0.05$) (见图 1)。HS 组血清 Ach 含量为(9.958 ± 4.283) $\mu\text{g/ml}$, 对照组为(15.734 ± 4.987) $\mu\text{g/ml}$, 经 t 检验, 差异有统计学意义($t=2.428, P=0.032$); 但 HS 组及对照组血清 Ach 含量与维生素 E 组[(11.842 ± 4.527) $\mu\text{g/ml}$]、缬沙坦组[(12.889 ± 4.778) $\mu\text{g/ml}$] 比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 生存分析结果

HS 组、维生素 E 组及缬沙坦组大鼠的 72h Kaplan-Meier 生存分析发现, 各组死亡率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=0.783, P=0.676$), 但数据显示死亡事件主要发生在发病后 24 h 内 (见图 2)。COX 比例风险回归模型, 以分组、体液流失率、打击时间及体温为协变量, 采用逐步引入法, 检验标准 $\alpha=0.05$ 。结果提示, 发病后低体温和较长湿热打击时间是 HS 大鼠死亡的主要危险因素, 但相对较高的体重变化率 (体液流失率) 则对 HS 大鼠的存活有一定的保护作用 (见附表)。

2.3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

心肌组织横切 HE 染色, 对照组见心肌细胞呈类圆形, 胞核居中, 胞质均染, 未见炎症细胞浸润及出血 (见图 3A); HS 组见部分心肌细胞排列紊乱、形态不规则或模糊不清; 部分胞质深染、心肌细胞肥大, 细胞间质可见散在出血、水肿及炎症细胞浸润 (见图 3B); 维生素 E 组见心肌细胞排列较 HS 组整齐, 肥大的心肌细胞数量减少, 细胞间质仍可见散在出血和水肿及炎症细胞浸润, 但较 HS 组减轻 (见图 3C); 缬沙坦组与 HS 组比较细胞排列较整齐, 肥大的心肌细胞数量、细胞间质出血点及炎症细胞浸润数量均

减少, 间质水肿程度减轻, 但与维生素 E 组比较, 差异无统计学意义 (见图 3D)。

2.4 各组大鼠心肌组织形态

对照组大鼠心肌组织透射电镜显示, 肌节排列整齐、Z 线明显, 未见肌丝断裂、溶解, 线粒体无肿胀、嵴清晰及排列紧密整齐, 胞核染色质均匀, 未见染色质固缩、边集及无空泡变性 (见图 4A); HS 组大鼠心肌组织透射电镜显示, 部分肌微丝疏松、模糊, Z 线不明显, 线粒体肿胀、嵴变模糊及可见空泡形成, 核形不规整、核周间隙增宽、核染色质固缩并出现边聚现象, 以上改变在 HS 组打击后 24、48 和 72 h 并未改善 (见图 4B~D)。维生素 E 组较 HS 组肌节排列整

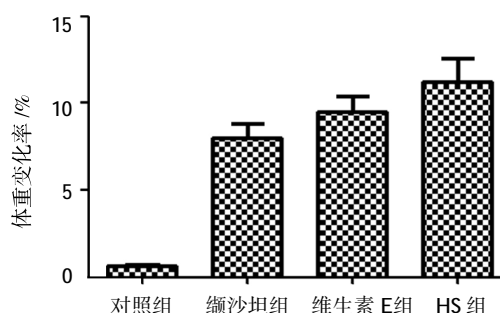


图 1 各组大鼠体重流失情况 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

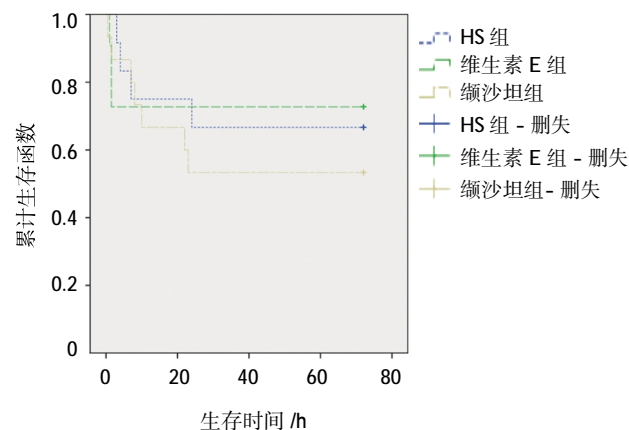


图 2 24 h 内 HS 大鼠死亡的生存分析

附表 HS 大鼠 COX 比例风险回归模型结果

因素	b	S _b	Wald χ^2	P 值	RR	95%CI	
						下限	上限
分组	-	-	0.758	0.685	-	-	-
A 组	-0.071	0.732	0.009	0.923	0.931	0.222	3.913
B 组	-0.691	0.844	0.670	0.413	0.501	0.096	2.622
体液流失率	-101.119	34.300	8.691	0.003	0.000	0.000	0.000
打击时间	0.034	0.015	5.134	0.023	1.035	1.005	1.066
体温	-3.186	0.891	12.779	0.000	0.041	0.007	0.237

齐,Z线清晰,线粒体肿胀减轻、嵴较清晰,线粒体空泡明显减少,核形较规整,胞核染色质较均匀、偶见核周间略增宽及边聚现象(见图 5A~C);缬沙坦组与 HS 组相比肌节排列较整齐,Z线较清晰,线粒体

肿胀减轻、嵴较清晰,未见明显线粒体空泡,核形较规整,胞核染色质较均匀,偶见核周间略增宽及边聚现象;缬沙坦组与维生素 E 组比较,差异无统计学意义(见图 5D)。

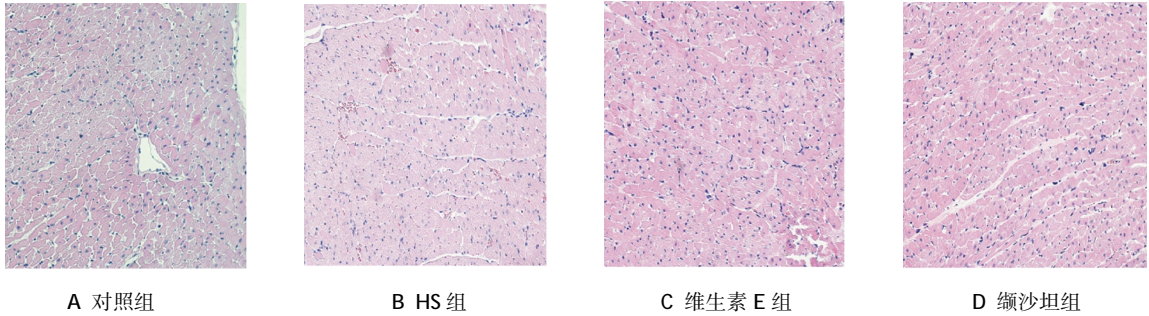


图 3 各组大鼠心肌细胞形态 (HE × 200)

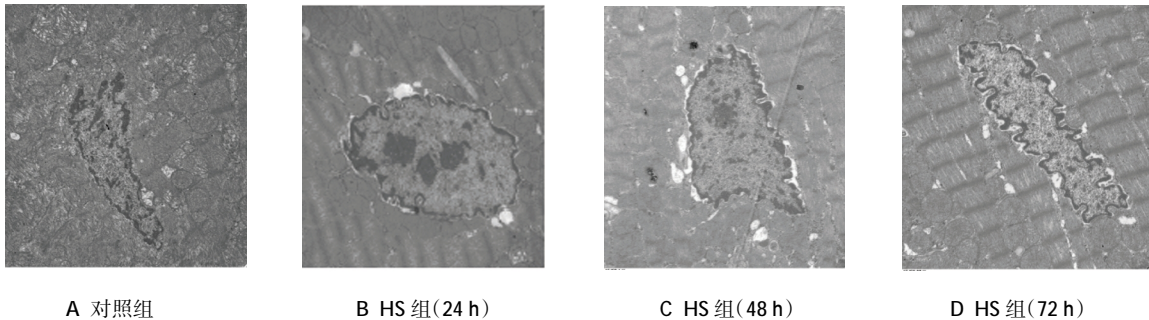


图 4 各组大鼠心肌组织形态 (透射电镜 × 15 000)

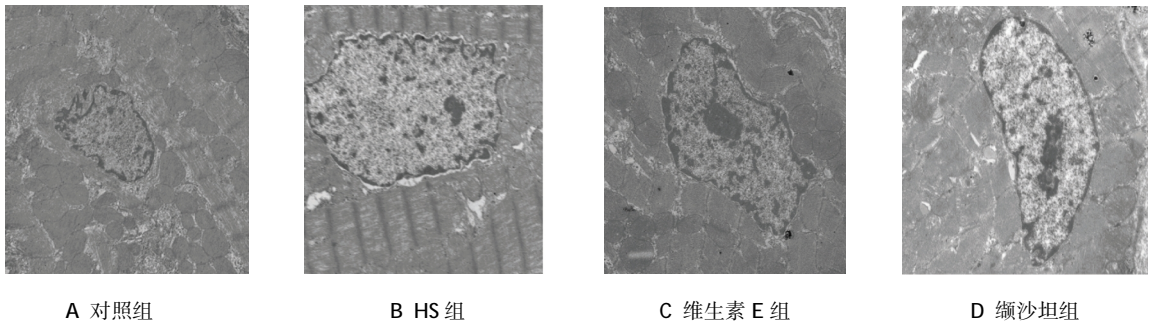


图 5 72 h 时各组大鼠心肌组织形态 (透射电镜 × 15 000)

3 讨论

HS 即重症中暑,临床上定义为由于暴露在高温、高湿环境中导致机体核心温度迅速升高,体温 > 40℃,伴有皮肤灼热、意识障碍(如谵妄、惊厥、昏迷)等多器官系统损伤的严重临床综合征。HS 病死率 > 40%,其死亡原因主要由多系统、多器官损伤所致^[6]。本研究应用 Kanplan-Meier 法和 COX 比例风险回归模型研究影响 HS 大鼠预后的因素,根据 Kanplan-Meier 曲线发现,HS 大鼠死亡时间主要在发病后 24 h 内,但 HS 组、维生素 E 组及缬沙坦组 HS 大鼠的死

亡率无明显差异,结合心肌组织 HE 染色及透射电镜结果,提示 HS 大鼠存在一定程度的心肌组织损伤,但心肌损伤可能不是导致 HS 大鼠死亡的直接和主要原因。COX 比例风险回归模型发现,恢复期低体温和较长打击时间是大鼠死亡的主要危险因素,这在一定程度上提示 HS 恢复期低体温是预测 HS 预后的良好指标,与刘亚楠等^[7]的研究结果相近。但本研究发现,体重变化率是影响 HS 大鼠预后的保护因素,即相对较高的体重变化率(体液流失率)对 HS 大鼠的存活有一定的保护作用,与刘亚楠等^[7]的研究

结论并不一致。另外本研究发现,HS 大鼠血清 Ach 含量低于对照组大鼠,其可能原因是湿热打击致大鼠体内乙酰胆碱分泌量降低(具体机制尚不清楚),汗液分泌减少,导致热量不能通过排汗方式散出,高热致使 HS 大鼠多器官功能障碍,甚至衰竭而死亡。

有研究提出,长期处于湿热环境下可导致小鼠心肌细胞凋亡或损伤,但关于 HS 是否会导致心肌组织损伤及其机制的基础研究报道较少^[9]。本研究发现,HS 大鼠心肌组织存在病理形态学改变,即存在心肌组织损伤改变,与黄泼泼等^[9]的研究结果相似,并且本课题组还发现在 HS 发病后 72 h 内,心肌损伤程度未见明显减轻。本研究还发现,予以维生素 E 和缬沙坦治疗的 HS 大鼠的心肌损伤程度较单纯 HS 大鼠的心肌组织损伤轻。大量研究报道,活性氧所产生的氧化应激作用可导致心肌细胞的凋亡,而维生素 E 可清除细胞代谢产生的活性氧物质。另有研究提出,血管紧张素 II 能诱导心肌细胞凋亡^[10-12]。因此,笔者推测 HS 导致的心肌组织损伤机制可能与氧化应激和血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡有关,但其具体机制及氧化应激诱导心肌细胞凋亡和血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡之间是否存在关联尚不清楚,这既是本研究的一个不足也是笔者接下来要研究的内容。

综上所述,本研究发现,HS 大鼠的死亡主要发生在发病后 24 h 内,发病后低体温和较长时间的湿热打击是大鼠死亡的主要危险因素。在一定程度上提示临床上要尽早发现并救治 HS 患者,密切关注其发病早期体温变化,有利于判断患者病情严重程度,以便给予更好的治疗。HS 大鼠存在一定程度的心肌

组织损伤,其潜在机制可能是氧化应激和血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡。

参 考 文 献:

- [1] 沈洪,于学忠,刘中民,等. 急诊医学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008: 94.
- [2] KRAU S D. Heat-related illness:a hot topic in critical care[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(2): 251-262.
- [3] STEENLAND K. Epidemiology of occupation and coronary heart disease: research agenda[J]. Am J Ind Med, 1996, 30(4): 495-499.
- [4] CHIEN K R. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases[J]. Nature, 2000, 407(6801): 227-232.
- [5] WANG X W, YUAN B B, DONG W P, et al. Induction of heat-shock protein 70 expression by geranylgeranylacetone shows cytoprotective effects in cardiomyocytes of mice under humid heat stress[J]. PLoS One, 2014, 9(4): DOI: 10.1371/journal.pone.0093536.
- [6] 宋青,于代华,马壮,等. 热射病规范化诊断与治疗专家共识(草案)[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(1): 1-7.
- [7] 刘亚楠,耿焱,付炜,等. 经典型热射病大鼠恢复期体温变化与预后的关系[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(10): 818-821.
- [8] 王晓武,袁彬彬,林曦,等. 湿热应激诱导小鼠心肌细胞凋亡的机制[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4): 531-535.
- [9] 黄泼泼,刘江伟,张波,等. 沙漠干热环境中中暑大鼠的心肌酶及心肌组织形态学改变[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(2): 11-15.
- [10] KIM H J, CHO H K, KWON Y H. Synergistic induction of ER stress by homocysteine and beta-amyloid in SH-SY5Y cells[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(11): 754-761.
- [11] SITI H N, KAMISAH Y, KAMSIAH J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)[J]. Vascular pharmacology, 2015, 71: 40-56.
- [12] CHOI D W, LIM M S, LEE J W, et al. The cytotoxicity of Kahweol in HT-29 human colorectal cancer cells is mediated by apoptosis and suppression of heat shock protein 70 expression[J]. Biomol Ther (Seoul), 2015, 23(2): 128-133.

(童颖丹 编辑)