



重度热射病合并内毒素血症大鼠模型的建立

热射病属重症中暑,死亡率较高,过热的细胞毒性以及宿主的炎症反应相互作用往往造成热应激个体多器官功能障碍综合征(MODS),增加临床救治以及监护难度[1]。为研究重度热射病、MODS的发生机制,在高温应激(HS)大鼠热射病的基础上,静脉注射细菌脂多糖(LPS),扩大炎症反应,加重循环衰竭、靶器官损伤,建立重度热射病合并感染大鼠的动物模型,为重度热射病合并感染、MODS的研究,尤其是内毒素血症启动机制的研究提供较佳的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 主要设备与试剂

仿真热气候动物舱(南方医科大学公共卫生与热带卫生学学院提供),Powlab/8sp生理记录仪(AdInstruments公司,澳大利亚)。LPS(*E. coli*, 0111:B4,批号:034K4105, Sigma-Aldrich)。

1.2 实验动物及模型制备

SPF级雄性Wistar大鼠80只(南方医科大学实验动物中心提供),体质量190~210 g(质量合格证编号:0005277)。

1.2.1 动物分组 将80只大鼠随机分为高温LPS组(HL组)、常温LPS组(L组)、高温生理盐水组(H组)、常温生理盐水组(C组),各组下设应激后0、40、80、120 min组($n = 5$)。

1.2.2 致模因素 主要致模因素为LPS、干球温度(Tdb)、应激时间、相对湿度(RH)、湿球温度(Twb);实验环境:仿真热气候动物舱。

1.2.3 实验方法与步骤 实验动物以3%戊巴比妥钠1 ml/kg腹腔注射麻醉后仰卧位固定于操作台,头转向一侧。经左股动脉插管连接三通,以肝素盐水(125 U/ml) 0.2 ml/h冲管。HL组、L组经尾静脉缓慢注射LPS10 mg/kg(浓度为1 mg/ml),H组、C组经尾静脉缓慢注射0.9% NaCl 10 ml/kg。动物稳定10 min后置入仿真热气候动物舱行热暴露。HL组、H组暴露条件:Tdb: $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, Twb: $(27 \pm 0.5)^\circ\text{C}$; L组、C组暴露条件:Tdb: $(26 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, Twb: $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,各实验组RH均为 $(40 \pm 5)\%$ 。于各时相点采集标本后处死动物。

1.3 监测指标

①连接Powlab/8sp生理记录仪描记实验动物心率(HR),直肠温度(Tr),左股动脉插管监测平均动脉压(MAP),人工记数呼吸频率(RR);②于各时相点抽取尾静脉血做外周血WBC计数;③于各时相点取右肺中叶背侧组织固定、包埋、切片、HE染色后光镜下观察病理学改变。

1.4 实验性热射病、全身炎症反应综合征(SIRS)诊断标准

实验性热射病诊断标准参考动物热射病诊断标准,SIRS诊断参考动物SIRS诊断标准以及国际脓毒血症定义会议中有关SIRS的诊断标准[3][4][5]。

1.5 统计学分析

计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用SPSS10.0软件包(南方医科大学公共卫生与热带卫生学学院医学统计系提供)进行单向方差分析, 均数间多重比较采用LSD-t检验。

2 结果

各实验组0 min与C组各时相点的各项监测指标无统计学差异($P>0.05$)。

2.1 生命体征

2.1.1 Tr的变化 H组、HL组于应激40 min起Tr即显著升高($P<0.01$ vs Group C), 应激120 min时H组、HL组高热、超高热水平, 两者之间差异无统计学意义($P>0.05$ vs Group H, Group HL, 表1)。

表1 高温与脂多糖复合应激对大鼠直肠温度的影响

Tab.1 Effect of heat stress and LPS administration on rectal temperature of the rats ($^{\circ}\text{C}$, $n=5$, $\text{Mean}\pm\text{SD}$)

Group	0 min	40 min	80 min	120 min
C	34.54 \pm 0.43	34.84 \pm 0.27	35.04 \pm 0.17	34.96 \pm 0.24
L	34.60 \pm 0.48	34.70 \pm 0.41	35.06 \pm 0.29	35.00 \pm 0.21
H	34.52 \pm 0.49	37.68 \pm 0.36 ³	39.32 \pm 0.19 ³	42.80 \pm 0.23 ³
HL	34.80 \pm 0.45	37.62 \pm 0.13 ³	39.34 \pm 0.16 ³	43.04 \pm 0.11 ³

³ $P<0.01$ vs group C, ³ $P<0.01$ vs group L

2.1.2 HR的变化 H组、HL组于应激80 min HR显著加快($P<0.01$, vs Group C), 应激120 min时约为正常对照值的1.5倍; HL组HR显著快于H组($P<0.01$, Group H vs Group HL, 表2)。

表2 高温与脂多糖复合应激对大鼠心率的影响

Tab.2 Effect of heat stress and LPS administration on the heart rate of the rats (bpm, $n=5$, $\text{Mean}\pm\text{SD}$)

Group	0 min	40 min	80 min	120 min
C	384 \pm 33	408 \pm 27	408 \pm 27	408 \pm 27
L	396 \pm 33	384 \pm 33	408 \pm 50	408 \pm 27
H	384 \pm 33	396 \pm 54	504 \pm 33 ³	576 \pm 33 ³
HL	408 \pm 27	396 \pm 33	528 \pm 27 ³	660 \pm 42 ³

³ $P<0.01$ vs group C, ³ $P<0.01$ vs group L; ³ $P<0.01$ vs group H

2.1.3 MAP的变化 H组、HL组MAP出现先升后降变化趋势: 于应激80 min时MAP显著上升($P<0.01$ vs Group C), 于应激100~110 min达峰值后迅速出现循环衰竭; HL组动物MAP显著低于H组MAP水平($P<0.01$, Group H vs Group HL)。

2.1.4 RR的变化 H组、HL组于应激80 min后RR显著加快($P<0.01$ vs Group C), 应激120 min时H组、HL组RR约为正常对照值的2倍, 两者之间差异无统计学意义($P>0.05$, Group H vs Group HL); L组动物偶尔出现呼吸深度与节律的改变, 但呼吸频率的改变与C组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 外周血WBC计数

HL组于致伤80 min出现WBC计数显著下降趋势($P<0.01$ vs Group C)。致伤120 min时, H组WBC显著上升($P<0.01$ vs Group C), HL组、L组WBC计数显著下降($P<0.01$ vs Group C)。HL组、L组之间差异无统计学意义($P>0.05$, Group H vs Group HL, 表3)。

表 3 高温与脂多糖复合应激对大鼠外周血白细胞计数的影响

Tab.3 Effect of heat stress and LPS administration on WBC of the rats ($10^9/L$, $n=5$, Mean \pm SD)

Group	0 min	40 min	80 min	120 min
C	5.30 \pm 2.41	4.66 \pm 0.66	5.44 \pm 0.99	5.22 \pm 1.07
L	5.14 \pm 0.54	5.22 \pm 2.13	4.28 \pm 0.51	2.68 \pm 0.91 ^{ac}
H	5.38 \pm 1.23	5.32 \pm 1.10	5.24 \pm 1.47	7.34 \pm 1.73 ^{bc}
HL	5.60 \pm 1.05	3.92 \pm 0.94	3.20 \pm 0.59 ^{ac}	2.60 \pm 0.92 ^{ac}

^a $P<0.01$ vs group C, ^b $P<0.05$ vs group C; ^c $P<0.01$ vs group L;
^e $P<0.01$ vs group H

2.3 病理报告

0 min各组动物肺组织肺泡壁完好, 支气管壁、肺泡壁无充血、水肿, 肺泡上皮形态正常; 肺泡无萎陷、扩张; 肺泡腔内无渗出物(图1A)。随致伤时间延长, L组动物出现局灶性肺不张以及代偿性肺气肿, 肺泡壁毛细血管轻度扩张、充血, 肺泡壁轻度水肿并可见少量炎细胞浸润(图1B)。H组动物肺泡壁毛细血管较明显扩张、充血, 肺泡壁水肿、增厚; 肺泡上皮肿胀, 肺泡壁变薄或断裂, 形成肺大泡(图1C)。HL组与H组、L组相比, 肺损伤改变明显, 表现为肺泡隔毛细血管以及肺间质小血管充血、管腔内中性粒细胞等集聚, 充塞管腔, 并见出血、透明血栓形成, 肺泡壁毛细血管有明显扩张、充血, 肺泡壁水肿, 大量炎细胞浸润, 局部肺不张; 可见肺出血、肺气肿(图1D)。

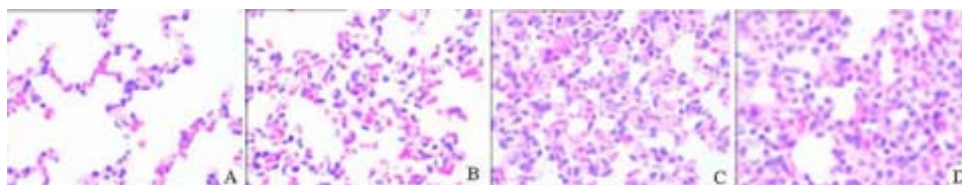


图1 高温与脂多糖复合应激对大鼠肺组织学的影响
Fig.1 Rat lung histology 120 min after heatstroke and LPS injection (HE staining, original magnification: $\times 40$)
A: group C; B: group L; C: group H; D: group HL

3 讨论

文献报道, 当高温应激动物体核温度达到 $42.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或动脉收缩压上升到达峰值后的下降点即标志发生中度热射病, 而体核温度达到 $43.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、动脉收缩压下降到 90 mmHg 以下则为重度热射病[3][4], 重度热射病个体脓毒血症、MODS等并发症的发病率及死亡率均显著升高。随着全球气候变暖以及热浪袭击频率和强度的逐年增加[5], 重度热射病、MODS成为危重病监护医学的巨大挑战。内毒素血症作为热射病、MODS的重要发病机制

之一，在热射病、MODS发生、发展中的地位与作用正日渐受到重视[1][6]。因此，复制重度热射病合并LPS感染的动物模型是研究热射病到MODS发病机制和临床防治、监护的基础，也是热射病研究的重点。

循环衰竭与急性肺损伤(ALI)是内毒素血症、热射病的主要表现，心肺也是MODS首先发生功能障碍的靶器官。既往的热射病动物模型多以高温/高湿作为主要致模因素[3][6]，虽然均可导致循环衰竭和一定程度的ALI、MODS，但由于高温并非专一作用于心肺，因此无法确定内毒素血症在热射病以及MODS发生中的主导地位。LPS是革兰阴性(G⁻)细菌细胞壁外膜的主要结构成分，也是G⁻细菌感染的主要致病因子，静脉注射LPS可以复制感染性损伤模型，模拟临床严重感染因素引起肺血管损伤、SIRS、脓毒血症、MODS的发生发展过程[7]。但是，单纯静脉注射LPS介导的早期肺炎反应多以肺血管损伤为主[8]，不易迅速发展为ALI、脓毒血症、MODS。因此，在中度热射病大鼠动物模型的基础上给予较大剂量的LPS静脉注射，可以模拟临床中度热射病并发内毒素血症，扩大炎症反应，使其发展为重度热射病合并感染、MODS。

本实验表明，在环境暴露温度、暴露时间相同的情况下，高温应激可以复制中度热射病动物模型，而高温与LPS复合应激可以复制重度热射病合并感染的动物模型，表现为应激个体发生生命体征紊乱、靶器官损伤等改变的时间显著提前、程度显著加重。致伤120 min时，与H组相比，HL组动物出现体核温度达到超高热水平、HR显著加快、MAP下降幅度显著增大、外周血WBC计数显著减少、肺损伤程度显著加重等病理生理改变，其血浆促炎性细胞因子(如TNF- α 、IL-6)含量、动脉血气等指标的动态变化也说明在LPS造成肺血管损伤的基础上，复合应激通过加速中性粒细胞(PMN)的激活与肺泡内募集等机制加重肺实质损伤[9]；过热能够降低心室纤颤阈值，LPS则可能造成心室收缩功能降低，复合因素应激扩大了单因素应激的影响，导致HL组动物循环衰竭加重。因此复合因素应激能够放大HS/LPS介导的炎症级联反应，导致机体炎症反应失控而发生重度热射病合并感染，进一步即可发展为MODS，而严重的循环衰竭、生命体征紊乱、靶器官损伤本身也是MODS的组成部分。因此提示在宿主感染或潜在感染时，热射病的易感性、严重程度都可能升高，现有的临床资料也支持这种观点。

Bouchama[6][10]等对灵长类动物的高温应激实验表明，重度热射病动物发生内源性内毒素血症可以引发脓毒血症、MODS等并发症，热射病动物死亡率显著升高。本实验通过高温与LPS复合应激，复制重度热射病合并内毒素血症大鼠的动物模型，动物生命体征、外周血WBC计数、靶器官损伤程度等变化特点与Bouchama A等的实验研究结果一致，说明LPS与过热同时或序贯打击均可以通过SIRS造成重度热射病合并感染以及多器官损伤。

综上所述，高温与LPS复合应激可以建立重度热射病合并感染大鼠的动物模型，LPS在重度热射病的发生中起到重要作用；本实验建立的重度热射病合并内毒素血症模型是研究重度热射病、MODS内毒素血症启动机制较好的动物模型。

参考文献：

- [1]林晓静, 邹飞, 罗炳德. 热射病[J]. 国外医学·社会医学分册, 2005, 22(2): 87-90.
- [2]Meehl GA, Tebaldi C. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century[J]. Science, 2004, 305(5686): 994-7.
- [3]Lin MT, Liu HH, Yang YL. Involvement of interleukin-1 receptor mechanisms in development of arterial hypotension in rat heatstroke[J]. Am J Physiol, 1997, 273: H2072-7.
- [4]胡森, 盛志勇. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 186-7.
- [5]Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-6.
- [6]Bouchama A, Roberts G, Al Mohanna F, et al. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(2): 697-705.
- [7]van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms

involved in bacterial sepsis and septic shock[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 379-414.

[8]Enkhbaatar P, Okajima K, Murakami K, et al. Recombinant tissue factor pathway inhibitor reduces LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(5): 1752-9.

[9]Abraham E. Neutrophils and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003, 31: S195-9.

[10]Gathiram P, Wells MT, Raidoo D, et al. Portal and systemic plasma lipopolysaccharide concentrations in heat-stressed primates[J]. Circ Shock, 1988, 25: 223-30.

[回结果列表](#)