

论著【实验研究】

热习服对小鼠热射病脑损伤的保护作用

易均凤¹, 何根林¹, 赵清¹, 银涛^{2*}, 杨学森^{1*}

1.第三军医大学热带医学研究所, 重庆 400038; 2.广州军区疾病预防控制中心, 广东 广州 510507

摘要; 目的 探讨热习服对小鼠热射病脑损伤的保护作用。**方法** 以C57小鼠分别建立热习服和热射病模型, 实验分为对照组(CON组)、热习服组(HA组)、热射病组(HS组)、热习服后再接受热应激组(HA+HS组)。观察各组小鼠一般行为学表现、肛温变化、脑组织含水量及死亡率。HE染色观察病理改变, TUNEL染色观察神经元凋亡情况, 透射电镜观察神经元形态改变。**结果** 在43℃环境中暴露120min后, HS组肛温升高至(42.8±0.83)℃, 死亡率为33%, 脑组织含水量为(82.6±12.7)%; HA+HS组肛温升至(40.0±0.67)℃, 未有动物死亡, 脑组织含水量为(77.8±12.1)% , 以上指标两组间差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。组织病理观察可见HS组脑组织细胞肿胀, 胞质疏松, 染色质边集, 核明显固缩, 内质网短小分散, 排列紊乱, 线粒体明显增大, 线粒体DNA固缩, 空泡化等, 并有大量神经元凋亡, HA+HS组亦可见类似病理变化及神经元凋亡, 但病变程度明显轻于HS组, 而对照(CON)组及单纯热习服(HA)组以上指标均无明显变化。**结论** 热射病可导致小鼠脑组织水肿, 脑组织结构改变, 神经元凋亡增加, 对中枢神经系统功能损伤严重。热习服预处理可减轻脑损伤, 具有明显的保护作用。

关键词:热习服; 热射病; 脑损伤; 保护作用

中图分类号:R **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2014)11-页码-页数

Protective effects of heat acclimation on brain damage of mice induced by heat stroke

YI Jun-Feng¹, HE Gen-Lin¹, ZHAO Qing¹, YIN Tao^{2*}, YANG Xue-Sen^{1*}

1. Institute of Tropical Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, P.R. China

Corresponding authors: YANG Xue-sen, E-mail: xuesenyzy@hotmail.com; YIN Tao; E-mail: yingtao6203@aliyun.com;

Abstract: Objective To explore the protective effects of heat acclimation (HA) on brain damage of mice induced by heat stroke (HS). **Methods** The HA model and HS model of C57 mice were established based on the heat acclimation and heat stroke conditions. The general behaviors, rectal temperature, brain water content, mortality, HE stained pathological change, TUNEL stained neuronal apoptosis and morphological changes in neurons by transmission electron microscope were compared. **Results** After exposing to 43 °C for 120 min, the general behaviors of mice in HA group were better than that of HS group and the mortality was as high as 33% in HS group, no mice died in the other groups. The rectal temperature and brain water content in HS group were (42.8±0.83)°C and (82.6±12.7)%, higher than those in HA group, (40.0±0.67)°C and (73.5±11.8)%, respectively. All the differences showed statistically significant difference ($P<0.01$, or 0.05). Cell swelling, cytoplasm rarefaction, chromatin concentration and edge accumulation, nuclear pyknosis, rupture, dissolved, cell vacuolation obviously, neuron apoptosis aggravated, endoplasmic reticulum shortened, scattered and disordered arrangement; Mitochondria enlarged, large quantities of mitochondrial DNA pyknosis, vacuolation; apoptosis of neurons were observed in Brain of HS mice. Similar pathology change and neuron apoptosis could be found in HA+HS mice, but the injury relieved significantly. **Conclusion** Heat stroke can lead to brain edema in mice, brain pathological changes, aggravates neuron apoptosis and cause serious damage to the central nervous system. Heat acclimation pretreatment can relieve brain injury, its protective effect was significant.

Key Words: Heat acclimation; Heat stroke; Brain Injury; Protective effect

热射病(Heat stroke, HS)是一种最为严重的中暑类型, 中枢神经损害为其主要临床特征之一, 也是HS后遗症的主要病理原因^[1]。热习服(Heat acclimatization, HA)是预防热损伤的重要手段, 且诸多研究证实HA具有保护作用^[2], 但其保护作用途径仍不完全清楚。为此, 本研究通过建立HS和HA小鼠模型, 观察肛温升值、死亡率、脑组织含水量及病理变化等, 明确HA对HS导致脑损伤的保护作用, 以揭示HA发挥保

护作用的具体途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48只8~9周龄健康雄性C57小鼠(由第三军医大学实验动物中心提供), 体重(21.3~23.5)g, 随机平均分为正常对照组(CON组)、热习服组(HA组)、热射病组(HS组)、热习服后再接受热应激组(HA+HS组), 各12只。CON组正常饲养, HA组与HS组按下述条件处理, HA+HS组为达到HA后再

作者简介: 易均凤(1986~), 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 中枢神经系统的损伤及防护。

***通讯作者:** 1. 杨学森, E-mail: xuesenyzy@hotmail.com; 2. 银涛, E-mail: yingtao6203@aliyun.com;

给予HS组处理条件处理。饲养及实验过程中遵守实验动物管理与保护准则。

1.2 HA和HS动物模型的建立 根据文献报道的HA和HS模型构建条件^[3-5], HA组小鼠置于温度 $(34.5\pm 0.4)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $(60\pm 5)\%$ 的热习服室连续30d, 自由食水, 照明7:00~19:00。HS组小鼠置于特定环境智能型模拟实验舱 $(43\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%加热120min, 肛温 $>42.5^{\circ}\text{C}$ 摄氏度认为达到HS, 结束应激。

1.3 观察指标 观察小鼠热暴露过程中的整体状况和行为改变, 比较各组动物的死亡率、肛温变化、脑组织含水量、脑组织切片的HE染色、Tunel染色和电镜观察亚细胞结构改变。

2 结果

2.1 一般行为学观察 HA组暴露1~10d期间, 多数动物体重稍有减轻, 呈现出轻度的烦躁不安, 活动增多; 11d后体重逐渐恢复正常, 静卧少动, 与对照组基本相似, 提示小鼠基本适应热环境。HS组入舱后20min左右, 活动明显增加, 在笼内四处攀爬走动, 大量分泌唾液, 呼吸加深加快; 入舱80min左右, 活动明显减少, 呼吸变为浅快, 行动不稳, 至110min左右基本处于半昏迷状态, 肛温 $>42^{\circ}\text{C}$, 提示动物达到休克状态。HA+HS组动物入舱后20min开始活动明显增

加, 大量分泌唾液, 呼吸深快, 但至120min应激结束, 活动稍减少, 但仍处于较清醒状态。

2.2 各组动物肛温变化 热暴露前, 各组动物肛温差异无统计学意义($P>0.05$)。HA组热暴露1d后, 肛温由 $(37.5\pm 0.34)^{\circ}\text{C}$ 升高至 $(38.7\pm 0.42)^{\circ}\text{C}$, 显著高于对照组($P<0.05$); 热暴露10d后, 肛温为 $(37.9\pm 0.36)^{\circ}\text{C}$, 略高于对照组, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 热暴露30d后, 肛温为 $(37.6\pm 0.35)^{\circ}\text{C}$, 与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。各组动物在 43°C 热暴露条件下的肛温变化情况见表1、图1。

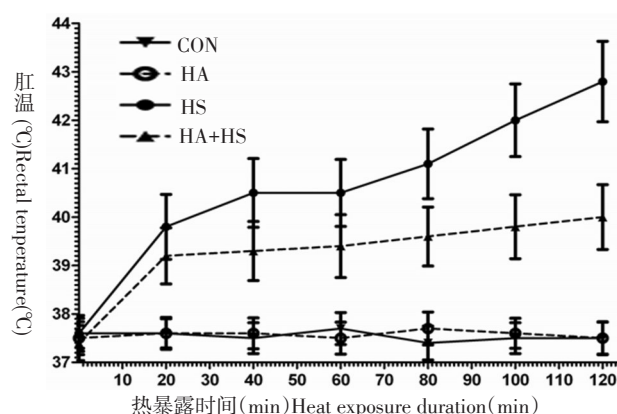


图1 各组动物肛温变化曲线

Fig. 1 Curve of rectal temperature changing in mice

2.3 各组动物的死亡率 CON组、HA组、HA+HS

表1 各组动物热暴露过程中的肛温变化情况

Table 1 Rectal temperature changes in mice of each group during the heat exposure

组别 Group	热暴露时间(min) Heat exposure time (min)						
	0	20	40	60	80	100	120
CON	37.6±0.31	37.6±0.30	37.5±0.32	37.7±0.33	37.4±0.35	37.5±0.32	37.5±0.33
HA	37.5±0.34	37.6±0.33	37.6±0.32	37.5±0.33	37.7±0.34	37.6±0.31	37.5±0.34
HS	37.6±0.37	39.8±0.67	40.5±0.71	40.5±0.69	41.1±0.72	42.0±0.75	42.8±0.83
HA+HS	37.4±0.36	39.2±0.58	39.3±0.61	39.4±0.65	39.6±0.61	39.8±0.66	40.0±0.67

组小鼠均无死亡, HS组死亡4只, 死亡率为33.3%(4/12)。见图2。

2.4 各组动物脑组织含水量 按照实验分组条件处理后, 即刻处死小鼠, 快速取出全脑, 剥离脑膜, 拭去血液, 置于 105°C 烤至恒重(两次称重差 $\leq 0.2\text{mg}$), 按照Elliott公式计算脑组织的含水量: 脑组织含水量 $= (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ 。结果显示, HS组含水量最高, 其次为HA+HS组, HA组与CON组差异无统计学意义($P>0.05$), 结果见表2。

2.5 各组动物脑组织病理改变 CON组脑组织结构正常, 胞质与胞核结构清晰, HA组小鼠脑组织细胞核呈现出轻微的固缩, HS组细胞肿胀, 胞质疏松, 染色质边集, 核明显固缩、破裂、溶解, 细胞空泡化明显, HA+HS组细胞核固缩和空泡化程度强于HA组, 但轻

于HS组。如图3, 红色箭头所示为典型的细胞结构异常。

表2 各组动物脑组织含水量

Table 2 Brain water content in mice of four groups

组别 Group	含水量(%) Water content (%)
CON	72.3±11.5
HA	73.5±11.8☆
HS	82.6±12.7*
HA+HS	77.8±12.1△

注: 与对照组比较, ☆ $P>0.05$, △ $P<0.05$, * $P<0.01$; 与HA组比较, *△ $P<0.05$; 与HS组比较, △ $P<0.05$ 。

Note: Compare to the CON group, ☆ $P>0.05$, △ $P<0.05$, * $P<0.01$; Compare to the HA group, *△ $P<0.05$; Compare to the HS group, △ $P<0.05$ 。

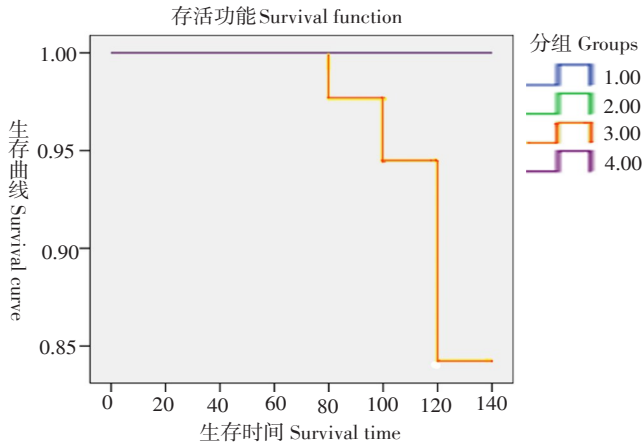


图2 各组动物热暴露过程中的生存率曲线

Fig. 2 Survival curve of mice during the heat exposure

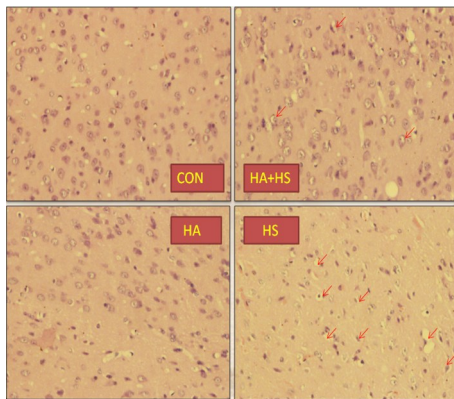


图3 不同组别小鼠大脑皮层HE染色 (200x)

Fig. 3 HE staining of the cerebral cortex of mice in different groups (200x)

2.6 各组小鼠脑组织神经元凋亡情况 CON组未观察到TUNEL阳性细胞,HA组有散在的阳性细胞,HA+HS组和HS组阳性细胞明显增多,HS组阳性细胞最多。典型图片见图4,细胞核呈棕褐色染色为阳性细胞。

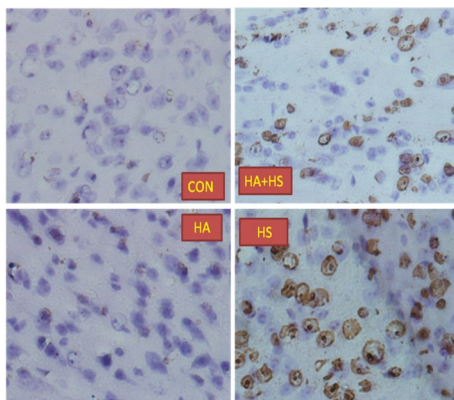


图4 不同组别小鼠大脑皮层tunel染色 (400x)

Fig. 4 TUNEL staining of the cerebral cortex of mice in different groups (400x)

2.7 各组小鼠脑组织亚细胞结构改变 电镜观察显示,CON组细胞核周围细胞器结构清晰,形态完整正常,

核膜清楚,核仁明显,细胞内可见内质网、线粒体和高尔基体等各种细胞器;突触结构清楚,突触小泡正常;毛细血管及其周围组织正常。HA组上述结构未见明显异常,结构清晰,但线粒体稍呈椭圆,偶有高尔基复合体扩张、紊乱;HA+HS组线粒体呈圆形,部分线粒体DNA固缩,少量空泡化;HS组线粒体明显增大,大量的线粒体DNA固缩,空泡化,神经细胞体积缩小,细胞内电子密度增高,胞质浓缩。内质网变得短小,分散,排列紊乱;突触结构出现融合样改变,突触小泡减少;毛细血管腔内可见脱落的内皮细胞,血管周围组织间隙增大。如图5所示,红色箭头为典型的细胞器结构异常。

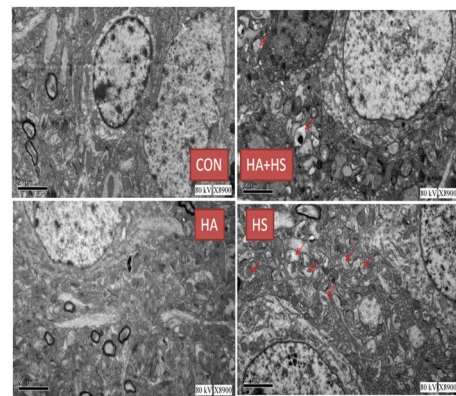


图5 不同组别小鼠大脑皮层电镜观察 (8900x)

Fig. 5 Scanning electron microscopy of the cerebral cortex of mice in different groups (8900x)

3 讨论

热射病(HS)是一种最为严重的中暑类型,临床主要表现为核心体温增高达40℃以上,循环障碍和神经系统异常。诸多研究显示,HS可导致严重的中枢神经损伤,多表现为认知功能障碍、注意力不集中、记忆减退、共济失调、谵妄、惊厥、昏迷等,重症患者可出现多器官功能障碍综合征(MODS),其死亡率非常高,国内外报道为10%~50%^[6,7]。本组研究中,小鼠暴露于43℃的高热环境中,肛温均超过42℃,出现意识障碍、抽搐、昏迷等热射病急性期中枢神经功能障碍表现,死亡率高达33.3%。中枢神经损伤可能就是热射病高死亡率、高致残率的主要原因。

有研究表明,HS可导致脑组织缺血缺氧,影响神经细胞代谢,导致细胞各种生理功能受损,离子交换障碍、离子泵运转失常,细胞内渗透压增高,形成细胞内水肿^[8],有学者提出HS发病机制之一可能是高热直接作用于组织细胞,导致细胞出现功能障碍,但相关的病理研究报道不多。本组研究发现,HS导致的小鼠脑损伤在病理学上主要表现为脑组织含水量显著升高,细胞肿胀,胞质疏松,染色质边集,核明显固缩、

破裂、溶解,细胞空泡化明显,神经元凋亡加剧。电镜观察显示神经元内胞质浓缩,细胞器失去正常结构,排列紊乱,多种细胞器破裂。因此,可以认为HS导致的脑组织细胞功能障碍是中枢神经系统功能障碍的病理基础。

热习服(HA)是指机体在长期反复的热作用下,出现的一系列适应性反应,主要表现为机体热产生减少、核心体温和心率下降,蒸发散热能力增强,耐热性和热稳定性增强,各种生理功能达到一个新的水平。HA是机体增强耐热能力的有效手段,机体达到HA后,对后续接受损伤性热刺激具有很好的保护作用,诸多国家根据这一现象对需要进行热区作战的部队开展热习服训练,对减少官兵热损伤,提高部队战斗力起到了十分重要的作用^[9]。Heled等^[10]研究发现HA可增强心脏的血液动力学功能,改善机体在中度低氧条件下的生理应激和认知功能。放射性核素研究显示,HA后,心脏在缺血时经无氧途径ATP的产量增加、心率减慢、ATP消耗降低,从而实现对缺血的保护^[11-12]。Shein等^[13]研究发现,HA预处理可减轻脑外伤时脑损伤的程度,加速临床康复,提高脑功能,并且可减轻继发损伤,减弱神经元凋亡。本组研究中,HA预处理后的小鼠暴露于损伤性热刺激,与未经HA预处理的小鼠相比,损伤效应明显减轻,表现在一般行为状态更好,热耐受力增强,存活力增高,肛温升高程度显著下降。证实了HA具有保护作用,但关于其保护作用的机制,仍有待进一步研究。

既然HS导致的细胞功能障碍是脑损伤后各种功能障碍的病理基础,那么HA是否通过增强细胞的耐热能力,维持细胞在高热环境中的生理功能而发挥的保护作用呢。为此,我们观察了不同处理条件小鼠的病理改变,发现HA预处理可显著减轻小鼠脑损伤程度,表现在脑水肿和脑细胞变性程度减轻,神经元凋亡减少,电镜观察显示神经元内各种细胞器排列规则,结构正常或病变轻微,表明HA对HS导致的细胞损伤具有很好的保护作用。

近年来,诸多学者对HA进行了系列研究,虽然研究方法和途径各有差异,但都得到比较一致的研究结论:HA增强了机体的保护网络,不仅增强热适应性,也可增强对热以外的刺激因素的调节能力,如对缺氧、缺血/再灌注、创伤等损伤也具有很好的保护作用^[14-15],所以热习服的交叉耐受对中枢神经的保护

可能具有普遍性。

参考文献

- [1] M. Horowitz, L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, et al. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2004, 97(4): 1496-1507.
- [2] M. Horowitz. Heat acclimation and cross-tolerance against novel stressors: genomic - physiological linkage[J]. *Progress in brain research*, 2007, 162:373-392.
- [3] Lisa R. Leon, David A. DuBose, Clifford W. Mason. Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005,288:R197-R204.
- [4] Benyamin Grosman, Osman S. Shaik, Bryan G. Helwig, et al. A physiological systems approach to modeling and resetting of mouse thermoregulation under heat stress[J]. *J Appl Physiol*, 2011: 111: 938 - 945.
- [5] 林晓静,邹飞,李亚洁,等. 重度热射病合并内毒素血症大鼠模型的建立[J].*南方医科大学学报*,2006,26(1):86.
- [6] N. Sugimoto, O. Shido, K. Matsuzaki, et al. Long-term Heat Exposure Prevents Hypoxia-Induced Apoptosis in Mouse Fibroblast Cells[J]. *Cell biochemistry and biophysics*, 2014, 1-7.
- [7] 杨芬,万琪,吴松笛. 热应激小鼠脑电图表现及脑组织的电镜观察分析[J].*解放军医学杂志*,2006,31(2):165-166.
- [8] G. Umschwief, A. S. Na'ama, A. G. Alexandrovich, et al. Heat acclimation provides sustained improvement in functional recovery and attenuates apoptosis after traumatic brain injury[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2010, 30(3): 616-627.
- [9] 荣鹏,孟建中,陈宇.热射病的发病机制及防治策略的研究新进展[J].*生物医学工程研究*,2010,29(4):287-292.
- [10] Y. Heled, A. Peled, R. Yanovich, et al. Heat Acclimation and Performance in Hypoxic Conditions[J]. *Aviation Space And Environmental Medicine*, 2012, 83(7): 649-653.
- [11] J. Zhou, X.-J. Xia, Y.-H. Zhou, et al. RBOH1-dependent H2O2 production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato[J]. *Journal of experimental botany*, 2014, 65(2): 595-607.
- [12] M. Eynan, T. Knubuvetz, U. Meiri, et al. Heat acclimation-induced elevated glycogen, glycolysis, and low thyroxine improve heart ischemic tolerance[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 93(6): 2095-2104.
- [13] N. a. A. Shein, M. Horowitz, E. Shohami. Heat acclimation: a unique model of physiologically mediated global preconditioning against traumatic brain injury[J]. *Progress in brain research*, 2007, 161: 353-363.
- [14] 宋青.热射病,致命的中暑[J].*军医进修学院学报*,2008,29(6):58.
- [15] M. Horowitz, H. Assadi. Heat acclimation-mediated cross-tolerance in cardioprotection[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1188(1): 199-206.

收稿日期:2014-09-03 编辑:崔宜庆