

高温直接打击法与逐步升温法建立经典型热射病多器官功能障碍综合征小鼠模型的对比及评价

刘育妍^{1,2}, 李云^{1,2}, 胡婕², 宣律³, 王陆^{1,2}, 袁睿^{1,2}, 邓子辉⁴, 张玉想⁵, 康红军^{1,2*}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心重症医学科, 北京 100853; ³河北北方学院研究生学院, 河北张家口 075000; ⁴解放军总医院研究生院生物化学教研室, 北京 100853; ⁵解放军总医院第八医学中心重症医学科, 北京 100091

[中图分类号] R594.12; R599.3 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0053.2023.0414

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘育妍, 李云, 胡婕, 等. 高温直接打击法与逐步升温法建立经典型热射病多器官功能障碍综合征小鼠模型的对比及评价[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(8): 893-902.

[收稿日期] 2023-01-10 [录用日期] 2023-03-09 [上线日期] 2023-04-14

[摘要] **目的** 比较两种温度策略建立的伴多器官功能障碍综合征(MODS)经典型热射病(CHS)小鼠模型的差异。**方法** 将66只雄性C57BL/6J小鼠采用随机数字表法分为直接热打击(DHS)组($n=28$)、逐步升温热打击(SHS)组($n=28$)及对照组($n=10$)。前两组分别使用41℃直接打击法及25.0~39.5℃逐步升温法建立CHS小鼠模型。将小鼠放入模拟气候舱, 密切观察其活动规律及意识状态, 并监测直肠温度(T_r), 待达到造模终点后出舱。每组采用随机数字表法抽取4只小鼠, 于热暴露结束后恢复24h取其血样和肝、肾、肠、肺、脾组织, 采用全自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酐(CREA)、血尿素氮(BUN)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)水平, 采用多因子检测试剂盒测定白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1及转化生长因子(TGF)- β 水平, 并对小鼠不同器官进行组织学观察及病理损伤评分; 对剩余小鼠进行72h生存分析。**结果** 两种热打击策略均可成功建立CHS小鼠模型, 但与DHS组比较, SHS组小鼠热暴露的时间较长[(181.61 \pm 41.88) min vs. (104.72 \pm 18.68) min, $P<0.001$], 脱水百分比较高[(11.59 \pm 1.52)% vs. (7.07 \pm 1.84)%, $P<0.001$], 72h内致死率较高(73.68% vs. 22.22%, $P<0.05$)。恢复24h后, SHS组ALT、AST、CREA、BUN水平均明显高于DHS组[(875.63 \pm 241.24) U/L vs. (139.38 \pm 188.22) U/L, $P<0.01$; (2406.75 \pm 1008.69) U/L vs. (208.13 \pm 149.23) U/L, $P<0.01$; (79.88 \pm 41.39) U/L vs. (18.75 \pm 10.51) U/L, $P<0.05$; (134.33 \pm 52.54) U/L vs. (17.75 \pm 7.31) U/L, $P<0.01$], 各器官组织病理学评分均明显高于DHS组($P<0.05$); 此外, SHS组MCP-1水平明显高于DHS组[(22.89 \pm 1.97) pg/ml vs. (15.97 \pm 3.91) pg/ml, $P<0.05$], TGF- β 水平明显低于DHS组[(936.46 \pm 30.17) pg/ml vs. (1453.50 \pm 129.81) pg/ml, $P<0.001$]。**结论** 使用逐步升温法建立的CHS小鼠模型成功率及致死率均较高, 各器官损伤较重, 是一种更符合CHS病理生理状态的动物模型。

[关键词] 热射病; 多器官功能障碍综合征; 直接热打击; 逐步升温热打击

Comparison and evaluation of direct heat stroke method and stepwise heating method for establishing mouse model of multiple organ dysfunction in classic heat stroke

Liu Yu-Yan^{1,2}, Li Yun^{1,2}, Hu Jie², Xuan Lv³, Wang Lu^{1,2}, Yuan Rui^{1,2}, Deng Zi-Hui⁴, Zhang Yu-Xiang⁵, Kang Hong-Jun^{1,2*}

¹Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China

²Department of Critical Care Medicine, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China

³Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

⁴Department of Biochemistry, Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

⁵Department of Critical Care Medicine, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

[基金项目] 军委科技委基础加强计划(军173)重点基础科研项目(2022-JCJQ-ZD-097-11)

[作者简介] 刘育妍, 硕士研究生, 主要从事急危重症疾病的相关研究

[通信作者] 康红军, E-mail: doctorkang301@126.com

*Corresponding author, E-mail: doctorkang301@126.com

This work was supported by the Basic Strengthening Project of the Science and Technology Commission of the Military Commission (Military 173) Key Basic Research Projects (2022-JCJQ-ZD-097-11)

[Abstract] Objective To examine the differences between mouse models of classic heat stroke (CHS) with multiple organ dysfunction *via* two different rising strategies. **Methods** A total of 66 male C57BL/6J mice were divided into direct heat stroke (DHS) group ($n=28$), a stepwise heat stroke (SHS) group ($n=28$), and control group ($n=10$) using the random number table method. In the first two groups, animals received direct warming at 41 °C and stepwise warming from 25.0 °C to 39.5 °C, using a simulated climate chamber, respectively. While the animals were in the climate chamber before reaching the endpoint, we constantly monitored the animal activity, animal consciousness, and rectal temperature. We randomly selected 4 animals from each group and collected the blood samples and organ tissues (liver, kidney, intestine, lung, and spleen) after 24 hours of recovery since the end of heat exposure. We used the automatic biochemical analyzer to measure the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CREA), blood urea nitrogen (BUN), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB). We employed multifactorial test kits to detect the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and transforming growth factor (TGF)- β . We analyzed the histological sections from each organ and then calculated the pathological injury scores. We saved the remaining mice for the 72 h survival analysis. **Results** Both heat stroke strategies can establish a stable CHS model of the mouse. In contrast with mice in DHS group, mice in SHS group exposed to heat for a longer time [(181.61 \pm 41.88) min *vs.* (104.72 \pm 18.68) min, $P<0.001$], had a higher percentage of dehydration [(11.59 \pm 1.52)% *vs.* (7.07 \pm 1.84)%, $P<0.001$] and higher 72 h mortality (73.68% *vs.* 22.22%, $P<0.05$). After 24 hours' recovery, biochemical indicators (ALT, AST, CREA, BUN) of SHS group were higher than those of DHS group [(875.63 \pm 241.24) U/L *vs.* (139.38 \pm 188.22) U/L, $P<0.01$; (2406.75 \pm 1008.69) U/L *vs.* (208.13 \pm 149.23) U/L, $P<0.01$; (79.88 \pm 41.39) U/L *vs.* (18.75 \pm 10.51) U/L, $P<0.05$; (134.33 \pm 52.54) U/L *vs.* (17.75 \pm 7.31) U/L, $P<0.01$]. The pathological injury scores of each organ tissue of the SHS group were higher than those of the DHS group ($P<0.05$). The levels of MCP-1 of the SHS group were higher than that of the DHS group [(22.89 \pm 1.97) pg/ml *vs.* (15.97 \pm 3.91) pg/ml, $P<0.05$], and TGF- β of SHS group was lower than that of DHS group [(936.46 \pm 30.17) pg/ml *vs.* (1453.50 \pm 129.81) pg/ml, $P<0.001$]. **Conclusions** The stepwise warming method had a higher success rate in developing the model, a higher mortality rate within 72 h, and more severe organ damage than the direct warming method. Thus it was a more stable and reliable modeling method that was more consistent with the pathophysiological state of CHS patients at the actual onset of illness.

[Key words] heatstroke; multiple organ dysfunction syndrome; experimental animal models

热射病(heat stroke, HS)是一种危害性高且后果严重的热致疾病,其中伴有多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的经典型热射病(classic heat stroke, CHS)是由热损伤因素直接作用于机体引发的、以核心体温(core temperature, Tc)升高及中枢神经系统异常为特征的临床危重症^[1-2]。有数据显示,经过医院救治的CHS患者病死率仍高达63.2%^[1-3]。合适的动物模型是深入研究HS损伤的重要基础,并可为临床救治工作的开展提供新思路。目前报道的CHS动物模型主要包括羊^[4]、兔^[5]、猪^[6]、狒狒^[7]、大鼠^[8]及小鼠^[9]等,其中大型动物往往因配合度及操作性差,需进行束缚、麻醉等处理。麻醉药物会影响动物的生理状态,包括改变机体在热环境中的体温调节机制^[10],束缚也会影响动物自发的体温调节动作,如在腹部涂抹唾液促进蒸发降温等,上述因素均会影响自发CHS的实验研究。因此,体型小、易操作、清醒且可自由活动的小鼠成为近年来HS相关研究中最常使用的模型动物。既往实验研究中建立CHS小鼠模型的方法不尽相同,造模终点体温为35.0~43.5 °C,热暴露时间为60~180 min^[9, 11-15]。有团队使用高热直接打击法建立

CHS脑损伤^[12, 16]、肝损伤^[17]、肺损伤^[18]、肠损伤模型^[19],但该方法建立的CHS模型造成的全身器官损伤似乎并不严重,死亡事件只发生在24 h内。另有报道显示,采用逐步升温法建立CHS模型可导致包括神经系统在内的多器官严重受损,全身炎症反应水平较高,且24 h后仍持续有小鼠死亡事件发生^[20-22],与伴MODS的CHS患者临床表现相似。但目前尚无研究比较两种热打击策略建立的CHS小鼠模型多器官损伤程度及全身炎症反应水平。本研究选择高热直接打击法及逐步升温法两种方法,在湿度为60%的环境中建立CHS小鼠模型,并使用多维评价指标比较CHS小鼠各器官损伤程度及全身炎症反应水平,以选择更符合CHS患者病理生理状态的动物模型,为HS后各器官损伤的研究及药物研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及仪器 SPF级雄性C57BL/6J小鼠66只,体重(28.52 \pm 2.1) g,均由解放军总医院第一医学中心动物实验中心提供。动物实验方案均通过动物实验伦理委员会审查批准(编号:2022-X18-19),并

按照《NIH 实验动物护理和使用指南》(第 4 版, 2008)饲养 1 周以上使其适应环境。饲养条件为每笼 5 只, 室温(22 ± 1.6) $^{\circ}\text{C}$, 空气相对湿度 35%~45%, 气压 101.325 kPa, 12 h 昼/夜循环, 自由进食及饮水。实验结束后, 所有小鼠用戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉, 采用颈椎脱臼法处死。主要仪器和材料为 HWS-350B 模拟气候舱(北京市恒诺利兴科技有限公司), BB-XGJ 小鼠肛温计(北京搏贝科技有限公司), ZG-TP101 小动物电子秤(永康市松铮商贸有限公司), Cobas[®]8000 全自动生化分析仪(日本株式会社日立制作所), ProcartaPlex 多因子检测试剂盒(货号: PPX-07、EPX01A-20608-901, 美国 ThermoFisher Scientific 公司), Panoramic MIDI Case Viewer 系统(匈牙利 3DHISTECH 有限公司)。

1.2 动物分组及处理 使用高温直接打击法及逐步升温打击法建立 CHS 小鼠模型。将 66 只 C57BL/6J 小鼠编号后, 采用随机数字表法分为室温对照组($n=10$)、直接热打击(DHS)组($n=28$)及逐步升温热打击(SHS)组($n=28$)。DHS、SHS 组按照不同热打击策略处理达到 CHS 标准后恢复 24 h 时, 每组随机抽取 4 只小鼠取材并检测各项指标。对照组在实验结束时随机抽取 5 只取材。剩余全部小鼠进行 72 h 生存分析。

1.3 热打击策略 实验期间小鼠禁食禁水, 置于常规饲养笼中(3~5 只/笼)。DHS 组模拟气候舱温度、湿度设置为 41°C 、60% 后稳定运行 1 h 以上, 将小鼠饲养笼直接放入舱中进行热暴露。SHS 则将模拟气候舱温度、湿度设置为 25°C 、60%, 稳定运行 1 h 后将小鼠饲养笼放入舱中, 在 1 h 内逐渐升温到 39.5°C , 升温速率约为 $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。对照组小鼠一直处于(22.0 ± 1.6) $^{\circ}\text{C}$ 的室温环境中。在既往有关 CHS 动物模型的研究中, 可能由于物种间的差异及研究方法不同, 啮齿类动物的最低致死温度为 $40.4\sim 46.0^{\circ}\text{C}$ ^[23-24]。本研究终点体温主要参考 CHS 小鼠模型的国际公认标准 42.7°C ^[15, 20], 以满足高温对小鼠多器官产生损伤的最低体温要求。

将小鼠放入实验舱后密切观察其活动规律与意识状态, 并监测直肠温度(rectal temperature, Tr)。当小鼠出现以下任意一种情况即视为造模终点, 需立即转移出舱进一步处理: (1) $\text{Tr}\geq 42.7^{\circ}\text{C}$; (2) 出现意识障碍, 即无自主活动(轻度无痛刺激不能驱赶动物爬行或改变位置)时间 $> 5\text{ s}$ ^[25-26]; (3) 濒死, 即出现明显抽搐, 呼吸节律明显改变。

小鼠出舱后复测 Tr 并迅速转移至(22.0 ± 1.6) $^{\circ}\text{C}$ 的通风环境中, 腹腔注射生理盐水(30 ml/kg)。复测时若 $\text{Tr}< 42.7^{\circ}\text{C}$ 则记录为造模失败; 若小鼠在模拟舱中死亡或在出舱后 30 min 内死亡则记录为造模死亡;

若 $\text{Tr}\geq 42.7^{\circ}\text{C}$, 伴有意识障碍则判定为 CHS 造模成功。

1.4 Tc 检测 Tc 以 Tr 代替, 将肛温计软头部位插入小鼠直肠 2~3 cm 后, 按下开关(ON/OFF)键, “嘀”声后开始测量, 当听到持续“嘀...”声后测量结束, 取出肛温计记录结果。小鼠入实验舱后每 30 min 测量 1 次, 热打击 90 min 后转为每 10 min 测量 1 次。

1.5 脱水程度估计 造模开始前, 所有小鼠在精确到 0.1 g 的小动物电子秤上称重, 得到热打击前体重(pre-heat stroke body weight, pre-BW)。达到造模终点后取出小鼠称重, 得到热打击后体重(post-heat stroke body weight, post-BW)。采用脱水百分比(percent dehydration, PD)评估脱水程度, 估算方法为: $\text{PD} = (\text{pre-BW} - \text{post-BW}) / \text{pre-BW} \times 100\%$ ^[27]。

1.6 标本留取 采用随机数字表法在 DHS、SHS 组造模成功的 CHS 小鼠中各抽取 4 只, 在热打击结束后 24 h 腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)进行快速麻醉, 麻醉成功后颈椎脱臼处死, 进行开胸及心内穿刺放血, 置入 1.5 ml 微离心管中。全血室温($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)凝固 20~30 min, 1000 $\times g$ 离心 10 min, 取上层血清于 -80°C 冻存; 分离肝、肾、肠、肺、脾组织, 部分固定于 4% 多聚甲醛溶液, 制作 4 μm 石蜡切片, 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后, 利用 Case Viewer 系统进行可视化及扫描; 每只小鼠取固定的左上叶肺组织, 称量并记录湿重(wet weight, W), 然后于 80°C 干燥 24 h 至恒重, 再次称量并记录干重(dry weight, D), 计算肺湿/干重比(W/D)。

1.7 主要器官损伤组织病理学评分 为进一步评估 HS 造成的器官组织损伤程度, 参照以往的评分标准, 制定 HS 各器官损伤分级评分标准, 将所有组织学切片打乱分组顺序后, 由两位经验丰富的病理学医师阅读并评分。各器官评分标准如下。

1.7.1 肝损伤组织病理学评分 根据急性肝损伤的病理情况^[28]制定两项标准: 肝实质变性坏死严重程度及炎症细胞浸润程度。每项按 4 分量表(0~3)进行评分, 总分为两项评分之和。

1.7.2 肾损伤组织病理学评分 根据急性肾损伤的病理情况^[29]制定三项标准: 肾小管损伤情况、肾小球损伤情况及微血栓含量。每项按 4 分量表(0~3)进行评分, 总分为三项评分之和。

1.7.3 肠损伤组织病理学评分 根据 Chiu's 评分^[30]制定肠黏膜病变进展标准, 评估肠损伤情况, 按 6 分量表(0~5)进行评分。

1.7.4 肺损伤组织病理学评分 根据 McGuigan 评分法^[31]制定四项标准: 肺泡间质水肿增厚、炎症细胞浸润、肺泡及间质出血以及透明膜形成。每项按 4

分量表(0~3)进行评分,总分为四项评分之和。

1.7.5 脾损伤组织病理学评分 根据脾内易染体巨噬细胞占白髓的比例评估脾脏损伤情况^[20],按4分量表(0~3)进行评分,其中<10%记0分,10%~15%记1分,15%~20%记2分,≥20%记3分。

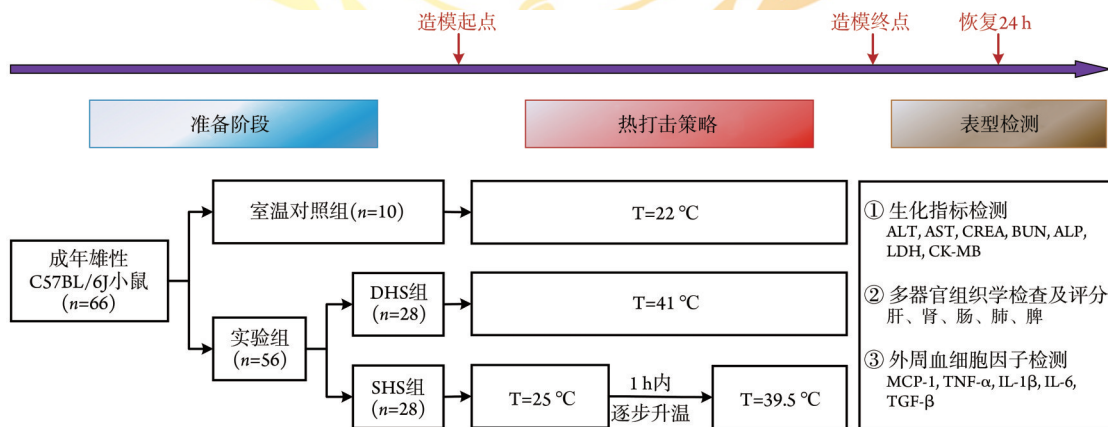
1.8 生化标志物及细胞因子检测 使用全自动生化分析仪测定血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐(creatinine, CREA)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)及肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase-MB, CK-MB)水平。使用多因子检测试剂盒测定血清中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1及转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的水平。

1.9 统计学处理 采用SPSS 21.0、GraphPad 8.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD- t 法;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用Kaplan-Meier曲线分析小鼠生存情况,组间比较采用Log-rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种热打击策略的造模结果 实验流程见图1。两组小鼠对高温反应较激烈,表现为入舱后躁动不安、在舱内自发运动增多、向笼顶攀爬寻找通风口、在皮毛上涂抹唾液等。随着热暴露时间延长,小鼠自发运动减少,舱内运动轨迹从复杂绕路运动变为贴边缘或沿对角直线前进,攀爬笼顶的行为逐渐减少甚至消失,呼吸短促。DHS组及SHS组小鼠pre-BW差异无统计学意义,SHS组post-BW明显低于DHS组($P<0.05$),PD明显高于DHS组($P<0.001$),在模拟舱中热暴露时长明显高于DHS组($P<0.001$),出舱时Tr也明显高于DHS组($P<0.001$,表1)。终止实验时,DHS组有3只小鼠在模拟舱中死亡,15只(包括死亡的3只)出舱时Tr未达42.7℃;SHS组5只小鼠死亡,其余Tr均达到42.7℃。因此,DHS组成功造模13只,SHS组成功造模23只,SHS组造模成功率明显高于DHS组(82.1% vs. 46.4%, $P<0.01$)。对照组实验期间无小鼠死亡,DHS组造模成功小鼠24 h内死亡2只,SHS组24、48及72 h分别死亡8、4及2只。Kaplan-Meier曲线显示,DHS组72 h生存率为77.78%,SHS组为26.32%,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。

2.2 肝损伤指标、组织病理学变化及损伤评分 对



DHS.直接热打击;SHS.逐步升温热打击;ALT.谷丙转氨酶;AST.谷草转氨酶;CREA.肌酐;BUN.血尿素氮;ALP.碱性磷酸酶;LDH.乳酸脱氢酶;CK-MB.肌酸激酶同工酶MB;MCP-1.单核细胞趋化蛋白-1;TNF- α .肿瘤坏死因子- α ;IL-1 β .白细胞介素-1 β ;IL-6.白细胞介素-6;TGF- β .转化生长因子- β

图1 小鼠热打击实验流程

Fig.1 Flow chart of heatstroke experimental process in mice

照组ALT、AST均处于较低水平,肝小叶结构清晰,无异常炎症细胞浸润。经热打击后,DHS组及SHS组ALT、AST均有上升,但DHS组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。SHS组ALT、AST均高于对照组,差异有统计学意义[(875.63 \pm 241.24) U/L vs. (39.67 \pm 9.54) U/L, $P<0.05$; (2406.75 \pm 1008.69) U/L vs.

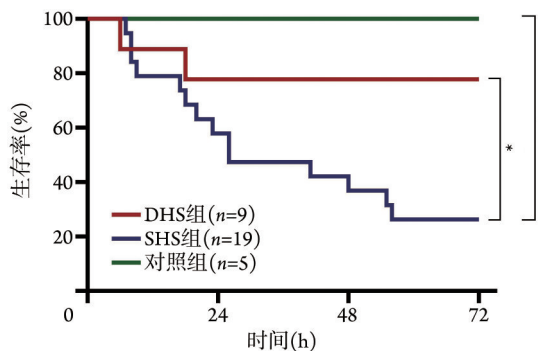
(179.00 \pm 130.44) U/L, $P<0.001$],且明显高于DHS组($P<0.05$)。病理学检查结果显示,DHS组小鼠部分肝细胞水肿,有点状坏死,炎症细胞浸润较少,恢复24 h后生化指标改变并不明显;而SHS组部分沿肝小叶分布的肝细胞有明显变性坏死,且坏死部位伴有大量炎症细胞浸润,其余部分有明显的肝细胞水

表1 两组小鼠热打击前后基本情况比较

Tab.1 Comparison of basic information between the two groups of mice before and after heat stroke

指标	DHS组	SHS组	t/χ^2	P
pre-BW (g, $\bar{x}\pm s$)	28.59±2.09(n=28)	28.59±2.06(n=28)	0.006	0.995
post-BW (g, $\bar{x}\pm s$)	26.44±1.83(n=25)	25.17±2.01(n=23)	2.302	0.026
PD (% , $\bar{x}\pm s$)	7.07±1.84(n=25)	11.59±1.52(n=23)	9.253	<0.001
模拟舱中热暴露时长(min, $\bar{x}\pm s$)	104.72±18.68(n=25)	181.61±41.88(n=23)	8.329	<0.001
Tr (°C, $\bar{x}\pm s$)	42.13±0.76(n=25)	42.89±0.22(n=23)	4.588	<0.001
造模成功率[例(%)]	13(46.4)	23(82.1)	7.778	0.005

DHS. 直接热打击; SHS. 逐步升温热打击; pre-BW. 热打击前体重; post-BW. 热打击后体重; PD. 脱水百分比; Tr. 直肠温度



DHS. 直接热打击; SHS. 逐步升温热打击; *P<0.05

图2 热打击小鼠Kaplan-Meier生存曲线

Fig.2 Kaplan-Meier survival curve of heat shock mice

肿, 病理损伤评分明显高于 DHS 组 (3.93 ± 1.16 vs. 2.73 ± 1.34 , $P<0.05$, 图3A)。

2.3 肾损伤指标、组织病理学变化及损伤评分 对照组 CREA、BUN 均处于较低水平, 肾小管上皮细胞排列有序, 而热打击后 DHS 组和 SHS 组发生了明显的急性肾损伤改变。DHS 组 CREA、BUN 变化不大, 与对照组比较差异无统计学意义 [(18.75 ± 10.51) $\mu\text{mol/L}$ vs. (17.00 ± 7.00) $\mu\text{mol/L}$, $P>0.05$; (177.5 ± 73.1) mg/L vs. (239.9 ± 37.2) mg/L , $P>0.05$]; 病理学检查显示部分肾小管上皮细胞坏死, 管腔内可见少量管型, 肾小球充血, 且出现包括皮、髓交界处肾小管上皮细胞坏死、肾小管扩张、大量管型, 另外还可见肾小球毛细血管及肾间质血管扩张、血管内血栓及炎症细胞浸润。SHS 组 CREA、BUN 分别为 (79.88 ± 41.39) $\mu\text{mol/L}$ 、 (1343.3 ± 525.4) mg/L , 均明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且明显高于 DHS 组 ($P<0.05$)。SHS 组肾损伤评分明显高于 DHS 组 (5.53 ± 1.06 vs. 3.60 ± 0.83 , $P<0.001$, 图3B)。

2.4 肠组织病理学变化及损伤评分 对照组小鼠肠黏膜内壁平整, 可见杯状细胞, 未见明显损伤。在热打击之后, DHS 组肠绒毛间隙增宽, 绒毛顶端上皮 Grunhagen 空间增大, 且伴有毛细血管充血。SHS 组的损伤评分明显高于 DHS 组 (1.60 ± 0.74 vs. 0.27 ± 0.46 , $P<0.001$), 损伤更严重, 视野中已出现上

皮下间隙明显增宽、固有层与上皮层分离、部分肠细胞脱落、绒毛中央乳质扩张以及毛细血管出血等改变, 还可见中性粒细胞等炎症细胞浸润(图3C)。

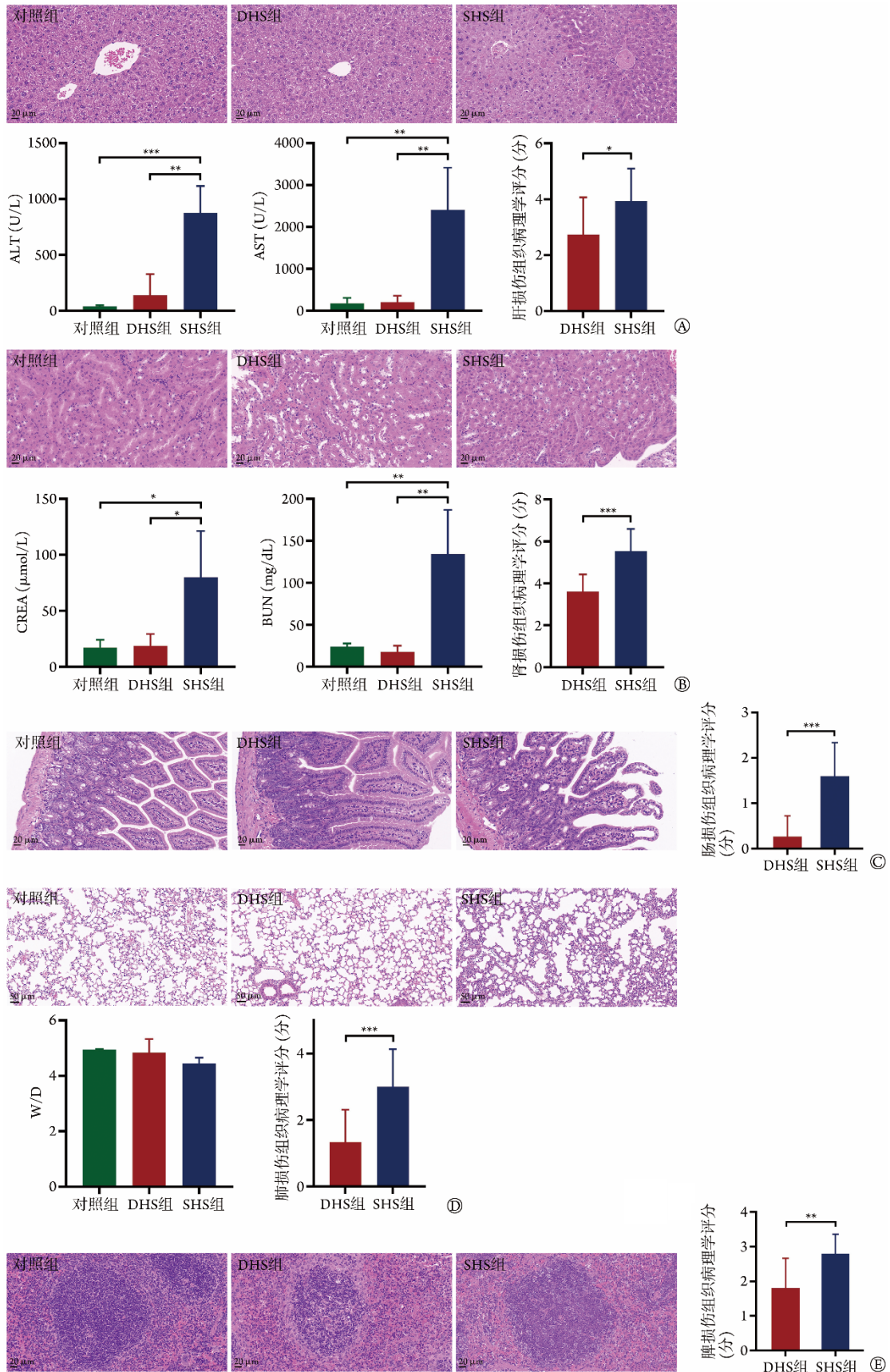
2.5 肺湿/干重比、肺组织病理学变化及损伤评分 三组间 W/D 差异无统计学意义 (4.94 ± 0.03 vs. 4.84 ± 0.49 vs. 4.45 ± 0.20 , $P>0.05$)。对照组小鼠肺泡及间质结构清晰, 未见明显病理损伤改变; 经热打击后, 部分肺泡间隔及肺泡中含有大量红细胞, 可见炎症细胞浸润肺间质, 肺间质增厚, 部分肺泡结构无法辨认, 且 SHS 组肺损伤组织病理学评分明显高于 DHS 组 (3.00 ± 1.13 vs. 1.33 ± 0.98 , $P<0.001$, 图3D)。

2.6 脾组织病理学变化及损伤评分 对照组小鼠脾脏未见明显异常, 骨髓、红髓之间界限清晰。经热打击后, 骨髓内可见明显的、由易染体巨噬细胞吞噬的核碎裂淋巴细胞及部分细胞碎片。SHS 组脾损伤病理评分明显高于 DHS 组 (2.80 ± 0.56 vs. 1.80 ± 0.86 , $P<0.01$), 且发生坏死的淋巴细胞更多, 易染体巨噬细胞占骨髓的比例更高(图3E)。

2.7 热打击对生化指标及外周血炎症因子的影响 DHS 组 IL-6 明显高于对照组 ($P<0.01$), IL-1 β 明显低于对照组 ($P<0.001$)。SHS 组 ALP、LDH、CK-MB、MCP-1、IL-6 明显高于对照组 ($P<0.05$), IL-1 β 及 TGF- β 明显低于对照组 ($P<0.001$); SHS 组 LDH、CK-MB、MCP-1 明显高于 DHS 组 ($P<0.05$), TGF- β 明显低于 DHS 组 ($P<0.001$, 图4)。

3 讨论

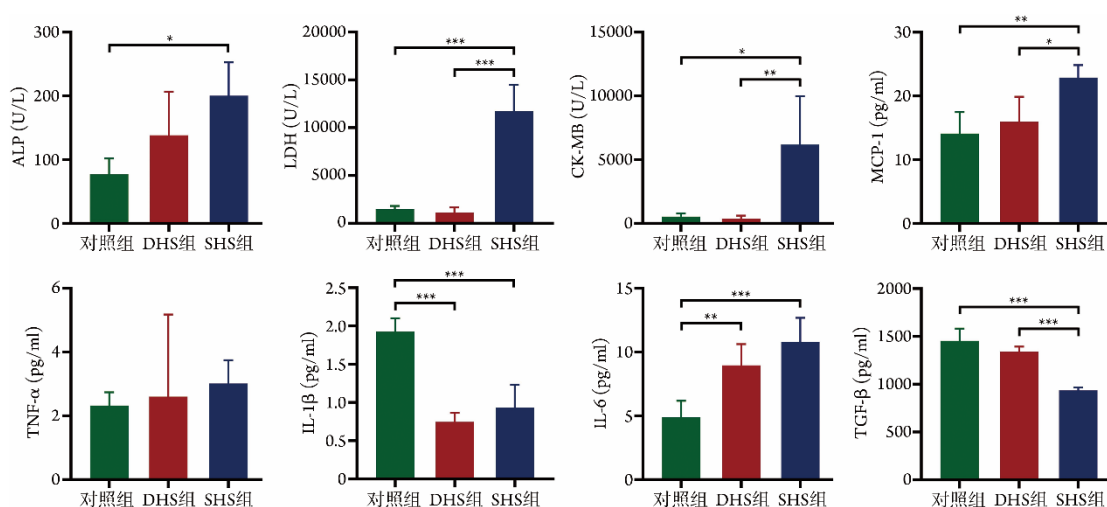
HS 是以 Tc 升高、中枢神经系统紊乱为典型特征, 常造成多器官损伤的一种严重热相关疾病^[32]。经过重症监护病房(intensive care unit, ICU)救治后, CHS 患者的病死率仍高于 60%^[3], 且早期 ICU 患者的死因多为并发无法逆转的 MODS, 一旦 MODS 开始, 临床常用治疗措施很难阻止这一过程^[33]。因此, 及早应对、阻止 HS 发病早期的器官损伤是降低病死率的重要手段。建立一个与 HS 患者实际情况相符且较稳定的动物模型, 对 HS 发病机制及药物干预效果的



HS. 热射病; DHS. 直接热打击; SHS. 逐步升温热打击; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; CREA. 肌酐; BUN. 尿素氮; W/D. 肺湿/干重比; A. 肝脏; B. 肾脏; C. 肠组织; D. 肺组织; E. 脾组织; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图3 HS小鼠各脏器功能指标、组织病理学变化及损伤评分

Fig.3 Function indicators, histopathological changes and damage scores of various organs in mice with heat stroke



HS. 热射病; DHS. 直接热打击; SHS. 逐步升温热打击; ALP. 碱性磷酸酶; LDH. 乳酸脱氢酶; CK-MB. 肌酸激酶同工酶MB; MCP-1. 单核细胞趋化蛋白-1; TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; IL-1β. 白细胞介素-1β; IL-6. 白细胞介素-6; TGF-β. 转化生长因子-β; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图4 HS小鼠生化指标及炎症因子水平比较

Fig.4 Comparison of biochemical indicators and inflammatory factors in mice with heatstroke

研究具有重要意义。

目前, 建立CHS动物模型主要包括3个要素: 高温诱导条件、动物体温测量及动物种类选择^[34]。本研究使用两种不同热打击策略建立CHS小鼠模型, 通过比较多项指标发现, 使用逐步升温法造模的小鼠在高温高湿环境中所受热打击时间较长, 造模成功率较高, 且造模成功的小鼠各器官损伤较重, 72 h死亡率较高。造成两种热打击策略出现损伤程度差异的内在机制可能有以下几点。(1)体温调节中枢的反应及效应时间不同: 小鼠皮肤无汗腺, 降温的主要方法是扩张皮肤血管, 增加对流散热及唾液分泌, 加强蒸发散热。DHS组小鼠受到短期、剧烈的环境热刺激, 会导致体温调节中枢迅速得到信号并及时做出降温反应, 此时小鼠的Tc尚处于正常范围内, 暂时处于“健康”状态, 体温调节引起的自发动作多; SHS组小鼠在实验开始时环境温度无异常, 并未激发降温反应, 缓慢升温过程中体温调定点会随环境温度逐渐上调, 待突破体温调定点的最高温度后, 才开始进行被动的降温反应^[35], 此时小鼠已进入“病理状态”, 分泌、涂抹唾液的自主活动明显减少, 与CHS患者的少汗症相似。(2)与机体脱水程度有关: 本研究中, SHS组小鼠较DHS组在热环境中的时间较长, 出舱后体重较低, 机体的脱水程度较高。严重脱水会造成循环血量明显降低, 组织器官血液流量及灌注量不足, 继发缺血-氧化应激反应。(3)与热应激反应有关: 热应激是指机体受到超过自身体温调节能力的过高温度刺激时产生的非特异性应答反应的总和^[3]。DHS组小鼠直接进入极端高温环境后, 机体快速出现对高热的反射性调节,

如机体自身产热减少、Tc及心率下降、呼吸加快, 以及产生热休克蛋白等反应^[36], 对组织器官及细胞均有一定的保护作用, 促进热量流失恢复至正常体温的保护性反应可能使DHS组小鼠各器官损伤较轻^[37-38]。(4)与热负荷总量有关: 由热负荷公式($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}$)=核心体温 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 的热暴露时间 \times (最大Tc- 39°C)^[10]可知, 热负荷总量与机体的热暴露时间及最大Tc密切相关。SHS组小鼠在 $\geq 39^{\circ}\text{C}$ 环境中的热暴露时间明显长于DHS组, 出舱时最大Tc较高, 这导致SHS组小鼠的热负荷总量高于DHS组, 因此其各器官受损较严重。

由于小鼠皮肤没有汗腺, 唾液分泌能力也有限, 热量损失无法与高温环境被动输入的热量相匹配, 持续一段时间后体温调节失败, 小鼠Tc迅速上升, 且血液重新分布时会导致器官血管持续收缩, 造成组织缺血, 上述持续性损伤会诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 并最终导致MODS。在不同的升温策略下, 机体的体温调节反应不同, 因此造成器官损伤的严重程度存在差异。大型动物往往因配合度、操作性差, 需进行麻醉、束缚等处理, 影响自发CHS的实验研究, 本研究选用体型小、清醒且可自由活动的雄性C57BL/6J小鼠, 排除了雌鼠体内雌激素水平波动对高温暴露的可能影响^[39-40], 且C57BL/6小鼠在空间学习记忆能力方面较其他品系小鼠更有优势^[41], 有利于后续开展CHS长期神经后遗症及其治疗的相关研究。

本研究在造模过程发现, 两组小鼠出舱时达到的最高体温越高、热打击持续时间越长, 各器官的

损伤越重, 后续死亡率也越高。Leon等^[27]设置终点体温相差0.3℃的三组小鼠, 生存率分别为100%、92%、46%, 且小鼠出舱前达到的最高体温也越高, 恢复低体温所需时间就越长, 死亡风险也越高。因此对小鼠Tc的精准监测也是造模成功的要点。本实验中衡量造模终点的指标除Tr外, 还综合了小鼠的意识状态及生命体征, 避免了间断监测Tr时已达到出舱标准却漏判的情况。模拟气候舱的温度、湿度均可控, 能够较好地模拟CHS发生时高温高湿的自然环境, 且造模过程中小鼠处于清醒状态, 与CHS患者自然发病的状态类似, 从可视窗中还可以观察小鼠的精神及活动状态。

中枢神经系统功能障碍是HS的主要特征。神经细胞对高温损伤极为敏感, HS后神经损伤及长期神经后遗症的问题引起了广泛关注^[12, 42-43]。本研究中DHS组及SHS组小鼠在出舱时均有严重意识障碍, 对外界刺激几乎无反应, 中枢神经系统严重受损。临床研究表明, 急性肝损伤是HS后最严重的并发症, 若发展为难治性肝衰竭并发多器官损伤, 还需考虑肝移植治疗^[44]。本研究结果显示, SHS组小鼠的肝脏损伤较DHS组更重; DHS组小鼠部分肝细胞水肿, 出现点状坏死, 其ALT、AST与对照组差异无统计学意义, 提示该程度热打击造成的肝损伤较轻; 而SHS组中沿肝小叶分布的肝细胞有明显大片坏死及大量炎症细胞浸润, 病理损伤评分明显高于DHS组, 肝功能指标较对照组明显升高, 提示逐步升温造成的小鼠肝损伤较高热直接打击更严重。本研究发现, 在恢复24h后DHS组小鼠CREA、BUN水平与对照组差异无统计学意义, 而SHS组小鼠较对照组明显增高, 且BUN水平已达小鼠急性肾损伤的诊断标准^[29]。病理检查结果显示, SHS组造模后小鼠肾脏皮、髓交界处肾小管上皮细胞大量坏死, 肾小管明显扩张, 可见大量管型形成, 肾小球毛细血管及肾间质血管扩张, 肾髓质内可见大量血栓及炎症细胞浸润, 肾脏病理损伤评分明显高于DHS组, 提示逐步升温造成的小鼠肾损伤更严重。肠道屏障损伤是引发CHS后SIRS的关键机制。高热首先破坏肠黏膜屏障, 导致肠内各种细菌对肠细胞的损伤加重, 细菌释放的毒素又从破坏的肠黏膜屏障处入血, 造成继发性脓毒症。本研究热打击后DHS组、SHS组小鼠肠内有不同程度的损伤, 但DHS组肠损伤评分明显低于SHS组。SHS组小鼠肠段明显水肿, 不排便或排便稀, 表明此时肠道炎症反应较强, 肠黏膜受到过度刺激后全段充血水肿, 甚至发生肠坏死, 但DHS组小鼠肠道水肿不明显。经热打击后, DHS组及SHS组小鼠均出现肺损伤病理改变, 但三组W/D差异无统计学意义, 表明恢复24h时HS

小鼠未发生肺水肿。引发HS后急性肺损伤的原因既包含热打击直接损伤肺组织及细胞的结构与功能, 也有继发的内毒素血症及炎症因子风暴对肺组织的间接损伤^[45]。临床研究显示, CHS后免疫系统受损严重, 外周血免疫球蛋白水平明显下降, 常有继发感染^[46], 而脾脏作为促使B细胞成熟的关键器官, 对产生具有正常功能的抗体非常重要。研究表明, SHS组坏死淋巴细胞及易染体巨噬细胞比例明显高于DHS组。因此尽早控制CHS后脾脏损伤, 防止免疫细胞进一步凋亡、坏死, 对维持机体正常免疫功能至关重要。CHS小鼠在恢复24h时全身多器官损伤较重, 体内炎症反应明显失衡。本实验中DHS组、SHS组小鼠全身损伤指标ALP、趋化因子MCP-1及细胞因子IL-6水平较对照组均明显上升, 抗炎因子TGF- β 水平则明显下降。有研究表明, IL-6是判断HS患者临床危重程度的指标^[47], 在HS前低剂量使用外源性IL-6有利于保护肠黏膜屏障, 可降低HS后的全身炎症水平^[48]。IL-1 β 作为早期促炎因子, 在本实验中却明显低于正常值, 似乎与常规认为的HS后发生高炎症反应状态并不相同。事实上, IL-1 β 在HS发生时常呈现时相性变化趋势, 其水平在恢复1h时即快速上升, 3~5h达到峰值, 后续内源性补充不足导致下降, 到恢复24h时已降至正常水平^[49-50]。Leon等^[20]的研究也观察到HS小鼠在恢复24h后循环血浆内的TNF- α 与IL-1 β 无法检测到或低于正常值, 狒狒模型中也出现类似结果^[7]。造成这种现象可能的机制是HS后骨骼肌(以及其他可能的实质细胞)为应对体温过高早期产生急性应激反应, 导致小鼠血浆中IL-6及IL-10在体温升高阶段就已明显上升^[51]。而这种应激诱导的细胞因子反应可能具有抑制随后局部或全身促炎症信号的功能, 因为IL-6的抗炎作用能抑制TNF- α 、IL-1 β 及刺激抗炎的IL-1ra、IL-10的产生^[52-55]。TGF- β 检测对HS患者的预后判断有重要价值, TGF- β 越低, 预后越差^[56]。SHS组小鼠LDH、CK-MB、MCP-1水平均明显高于DHS组, TGF- β 水平明显低于DHS组, 表明采用逐步升温法造模的CHS小鼠较直接热打击法全身损伤更严重, 全身炎症水平更高。

本研究仍存在局限性: 只选择了恢复24h这一个时间点来评价HS对小鼠的损伤, 尚不能掌握损伤的时程规律, 且HS对神经系统的损伤除需根据小鼠的精神及行为状态初步判定外, 还应同时使用组织病理学检查及动物行为学实验进行判定。另外, SHS组中达到造模条件但出舱后死亡的小鼠呼吸节律改变、咯血、窒息等肺损伤表现更严重, 也具有研究价值。

综上所述, 无论是使用直接热打击法还是逐步

升温法, 均能成功构建CHS小鼠模型。但使用逐步升温法造模的小鼠更接近真实的CHS发生环境, 后续可造成多器官功能损伤(特别是肝脏和肾脏的急性损伤)及体内炎症反应失衡的状态, 两种造模方式结果的差异可能与小鼠体温调节能力有关, 但具体的作用机制尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Liu SY, Song JC, Mao HD, *et al.* Expert consensus on the diagnosis and treatment of heat stroke in China[J]. *Mil Med Res*, 2020, 7(1): 1.
- [2] Wang SK, Zhang XT, Li L, *et al.* Research progress on the protective effect and mechanism of dietary supplements on heat stroke[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(11): 1148-1152. [王少康, 张笑婷, 李磊, 等. 膳食补充剂对热射病的防护作用及机制研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(11): 1148-1152.]
- [3] Bouchama A, Abuyassin B, Lehe C, *et al.* Classic and exertional heatstroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 8.
- [4] Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, *et al.* Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: a review[J]. *J Therm Biol*, 2019, 79: 120-134.
- [5] Frosini M. Changes in CSF composition during heat stress and fever in conscious rabbits[J]. *Prog Brain Res*, 2007, 162: 449-457.
- [6] Yang YW, Zhang J, Mao YL, *et al.* Establishment of a severe heatstroke pig model under high-temperature and high-humidity environment. [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(17): 2678-2684. [杨彦文, 张静, 毛玉玲, 等. 高温高湿环境下重度中暑模型猪的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(17): 2678-2684.]
- [7] 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* (1985), 2005, 98(2): 697-705.
- [8] Lin XJ, Lin CH, Liu RX, *et al.* Myricetin against myocardial injury in rat heat stroke model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110194.
- [9] Yuan FF, Cai JZ, Wu JF, *et al.* Z-DNA binding protein 1 promotes heatstroke-induced cell death[J]. *Science*, 2022, 376(6593): 609-615.
- [10] Geng Y, Fu W, Liu YN, *et al.* Comparison of classical heat stroke between conscious and unconscious rat models [J]. *Med J Chin PLA*, 2013, 38(8): 615-619. [耿焱, 付炜, 刘亚楠, 等. 清醒与麻醉状态经典型热射病大鼠模型比较[J]. *解放军医学杂志*, 2013, 38(8): 615-619.]
- [11] Miyamoto K, Suzuki K, Ohtaki H, *et al.* A novel mouse model of heatstroke accounting for ambient temperature and relative humidity[J]. *J Intensive Care*, 2021, 9(1): 35.
- [12] Li P, Shen TT, Luo X, *et al.* Modulation of microglial phenotypes by dexmedetomidine through TREM2 reduces neuroinflammation in heatstroke[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13345.
- [13] Ji JJ, Hong XX, Su L, *et al.* Proteomic identification of hippocalcin and its protective role in heatstroke-induced hypothalamic injury in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3775-3789.
- [14] Yi JF, He GL, Yang J, *et al.* Heat acclimation regulates the autophagy-lysosome function to protect against heat stroke-induced brain injury in mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 101-114.
- [15] Xu QL, Liu JX, Guo XH, *et al.* Xuebijing injection reduces organ injuries and improves survival by attenuating inflammatory responses and endothelial injury in heatstroke mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 4.
- [16] He GL. HSP90 β regulates microglial M1 polarization associated to CNS neuroinflammation in heat stroke[D]. Chongqing: Chinese PLA Army Medical University, 2018. [何根林. HSP90 β 调节小胶质细胞M1型活化在热射病中枢炎症中的作用及机制研究[D]. 重庆: 陆军军医大学, 2018.]
- [17] Huang W, Xie WD, Zhong HH, *et al.* Cytosolic p53 inhibits parkin-mediated mitophagy and promotes acute liver injury induced by heat stroke [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 859231.
- [18] Tsai HY, Hsu YJ, Lu CY, *et al.* Pharmacological activation of aldehyde dehydrogenase 2 protects against heatstroke-induced acute lung injury by modulating oxidative stress and endothelial dysfunction [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 740562.
- [19] Xia ZN. The protective effect of dexmedetomidine on heatstroke mice and its mechanism based on intestinal barrier[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2017. [夏振娜. 右美托咪啶对热射病小鼠的保护作用及基于肠道屏障的机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.]
- [20] Leon LR, Blaha MD, DuBose DA. Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2006, 100(4): 1400-1409.
- [21] Leon LR, Gordon CJ, Helwig BG, *et al.* Thermoregulatory, behavioral, and metabolic responses to heatstroke in a conscious mouse model[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299(1): R241-R248.
- [22] Geng Y, Chen LY, Li R, *et al.* The role and mechanism of neutrophil extracellular traps in the acute liver injury of heatstroke mice [J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(12): 1209-1216. [耿焱, 陈丽羽, 李茹, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在热射病小鼠急性肝损伤中的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(12): 1209-1216.]
- [23] Hubbard RW, Bowers WD, Matthew WT, *et al.* Rat model of acute heatstroke mortality[J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1977, 42(6): 809-816.
- [24] Wright GL. Critical thermal maximum in mice[J]. *J Appl Physiol*, 1976, 40(5): 683-687.
- [25] Jiang LY, Zhang YX, Zhang ZH, *et al.* Role of autophagy in acute lung injury in rats with exertional heat stroke [J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(5): 427-434. [江利亚, 张玉想, 张志华, 等. 自噬在劳力性热射病大鼠急性肺损伤中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(5): 427-434.]
- [26] He SX, Li R, Yang HH, *et al.* Optimization of a rhabdomyolysis model in mice with exertional heat stroke mouse model of EHS-rhabdomyolysis [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 642.
- [27] Leon LR, DuBose DA, Mason CW. Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(1): R197-R204.
- [28] Dai CS, Xiao XL, Li DW, *et al.* Chloroquine ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice *via* the concomitant inhibition of inflammation and induction of apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1164.
- [29] Wei QQ, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(11): F1487-F1494.
- [30] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, *et al.* Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.

- [31] Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, *et al.* Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(11): 1888-1897.
- [32] Xia DM, Wang XR, Zhou PY, *et al.* Research progress of heat stroke during 1989-2019: A bibliometric analysis[J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(3): 384-394.
- [33] Pease S, Bouadma L, Kermarrec N, *et al.* Early organ dysfunction course, cooling time and outcome in classic heatstroke[J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(8): 1454-1458.
- [34] Du LW, Shi YW, Xu ZJ. The review of animal models of heat stroke [J]. *Modern Pract Med*, 2019, 31(4): 563-565. [杜力文, 石永伟, 许兆军. 热射病动物模型综述[J]. *现代实用医学*, 2019, 31(4): 563-565.]
- [35] Tokizawa K, Yoda T, Uchida Y, *et al.* Estimation of the core temperature control during ambient temperature changes and the influence of circadian rhythm and metabolic conditions in mice[J]. *J Therm Biol*, 2015, 51: 47-54.
- [36] Zhang XH. Mechanism of heat shock protein 70 and heat tolerance [J]. *J Prev Med Chin PLA*, 2001, 19(1): 73-75. [张旭辉. 热休克蛋白70与热耐受的机制[J]. *解放军预防医学杂志*, 2001, 19(1): 73-75.]
- [37] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(25): 1978-1988.
- [38] Epstein Y, Roberts WO. The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2011, 21(6): 742-748.
- [39] Chen SH, Chang FM, Niu KC, *et al.* Resuscitation from experimental heatstroke by estrogen therapy[J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(4): 1113-1118.
- [40] Garcia CK, Mattingly AJ, Robinson GP, *et al.* Sex-dependent responses to exertional heat stroke in mice[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2018, 125(3): 841-849.
- [41] Xue D, Xu SP, Liu JX, *et al.* Comparison of learning and memory abilities among three species of mice tested in morris water maze[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2010, 18(2): 149-152. [薛丹, 徐淑萍, 刘进修, 等. 水迷宫实验中三种品系小鼠学习记忆能力的比较[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(2): 149-152.]
- [42] Chen SH, Niu KC, Lin MT. Cerebrovascular dysfunction is an attractive target for therapy in heat stroke[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(8): 663-672.
- [43] Lin YF, Liu TT, Hu CH, *et al.* Expressions of chemokines and their receptors in the brain after heat stroke-induced cortical damage[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 318: 15-20.
- [44] Ichai P, Laurent-Bellue A, Camus C, *et al.* Liver transplantation in patients with liver failure related to exertional heatstroke[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3): 431-439.
- [45] Xia XY, Li L, Wang SK, *et al.* Related factors and treatment progress of lung injury caused by heat stroke[J]. *Chin J Crit Care Med*, 2021, 41(11): 994-997. [夏新宇, 李磊, 王少康, 等. 热射病肺损伤相关因素及治疗进展[J]. *中国急救医学*, 2021, 41(11): 994-997.]
- [46] Yang QY, Liu WM, Yu JF, *et al.* Effect of prealbumin level on mortality in heatstroke patients[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 3053-3060.
- [47] Hammami MM, Bouchama A, Al-Sedairy S, *et al.* Concentrations of soluble tumor necrosis factor and interleukin-6 receptors in heatstroke and heatstress[J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(8): 1314-1319.
- [48] Phillips NA, Welc SS, Wallet SM, *et al.* Protection of intestinal injury during heat stroke in mice by interleukin-6 pretreatment[J]. *J Physiol*, 2015, 593(3): 739-752.
- [49] Dehbi M, Uzzaman T, Baturcam E, *et al.* Toll-like receptor 4 and high-mobility group box 1 are critical mediators of tissue injury and survival in a mouse model for heatstroke[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44100.
- [50] Helwig BG, Leon LR. Tissue and circulating expression of IL-1 family members following heat stroke[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(19): 1096-1104.
- [51] Welc SS, Clanton TL, Dineen SM, *et al.* Heat stroke activates a stress-induced cytokine response in skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013, 115(8): 1126-1137.
- [52] Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, *et al.* Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans[J]. *FASEB J*, 2003, 17(8): 884-886.
- [53] Xing Z, Gauldie J, Cox G, *et al.* IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(2): 311-320.
- [54] Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease[J]. *Eur J Clin Invest*, 2017, 47(8): 600-611.
- [55] Steensberg A, Fischer CP, Keller C, *et al.* IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(2): E433-E437.
- [56] Xu SL, Ma J, Lan NX, *et al.* The value of blood TGF-β level detection in prognosis judgement of patients with heat stroke [J]. *Clin Res Pract*, 2020, 5(1): 42-43. [徐少丽, 马骥, 兰乃祥, 等. 血TGF-β水平检测对热射病患者预后判断的价值[J]. *临床医学研究与实践*, 2020, 5(1): 42-43.]

(责任编辑: 熊晓然)