DOI:10.16016/j.2097-0927.202306123

经典型及劳力型热射病大鼠心肌损伤对比研究

张伯翼[1,2],罗 雪[1,2],罗 珍[1,2],王泽泽[1,2],谭雨龙[1,2],何根林[1,2],李 萍[1,2],申婷婷[1,2],刘晓倩[1,2],杨学森[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):军事预防医学系热带医学教研室[1],极端环境医学教育部重点实验室[2]

[摘要] **目的** 比较劳力型热射病(exertional heat stroke, EHS)与经典型热射病(classical heat stroke, CHS)大鼠动物模型心肌损伤的差异,为热射病心肌损伤的临床治疗提供可能的实验室依据。**方法** 80 只 SD 大鼠按随机数表法随机分为对照组($n=10$)、运动对照组(EXC,$n=10$)、经典热射病组(CHS,$n=30$)和劳力型热射病组(EHS,$n=30$)。对照组和 EXC 组大鼠置于温度(25±0.5)℃,相对湿度(50±5)%环境中;EHS 组和 CHS 组大鼠置于模拟热气候动物舱内,舱内环境温度(39±0.5)℃,相对湿度(50±5)%;EHS 组和 EXC 组大鼠给予跑台运动处理,跑步速度设置为 12 m/min,坡度为 0°,每运动 8 min 休息 2 min,以监测大鼠直肠温度等。核心体温达到 42.3 ℃或出现瘫倒(掐尾反射消失)作为热射病的开始,之后将大鼠移至常温环境复温。采用超声心动图仪检测大鼠心功能指标,生化法检测血清心肌酶(AST、LDH、CK-MB、CK)水平,苏木精-伊红(HE)染色法检测大鼠心肌组织病理,TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡情况。采用蛋白免疫印迹法检测大鼠心肌组织中醌氧化还原酶 1(Nrf2)、切割半胱天冬氨酸蛋白酶(Cl-Caspase-3)、抗凋亡蛋白(Bcl-2)、促凋亡蛋白(Bax)、血红素加氧酶-1(HO-1)的蛋白表达水平。**结果** 与 CHS 组大鼠比较,EHS 组大鼠热射病潜伏期显著缩短($P<0.01$),且诱发热射病所需的热负荷显著减少($P<0.01$)。CHS 组大鼠的脱水率显著大于 EHS 组($P<0.01$),但 EHS 组大鼠的脱水速率显著高于 CHS 组($P<0.01$)。两组大鼠热射病发生时的直肠温度无显著差异($P>0.05$)。超声心动图提示,EHS 组大鼠的左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)显著低于 CHS 组大鼠($P<0.05$)。EHS 组大鼠的 AST 和 LDH 水平显著高于 CHS 组大鼠($P<0.01$)。两组大鼠均出现急性心肌损伤的病理改变,表现为心肌细胞水肿、肌纤维排列混乱、断裂,可见炎性浸润,且 EHS 组心肌损伤病理评分高于 CHS 组($P<0.05$),EHS 组心肌细胞凋亡比率亦显著高于 CHS 组($P<0.05$)。氧化应激相关信号通路中,EHS 组大鼠心肌组织的蛋白质表达水平显著高于 CHS 组。**结论** 高温同时复合运动有更高的热射病易感性,EHS 介导的心功能异常及心肌细胞凋亡较 CHS 更重,且可能与氧化应激相关信号通路活化相关。

[关键词] 经典型热射病;劳力型热射病;心肌损伤;超声心动图;凋亡

[中图法分类号] R322.11;R361;R594.1 [文献标志码] A

Comparison on myocardial injury in rats with classic versus exertional heat stroke

ZHANG Boyi[1,2], LUO Xue[1,2], LUO Zhen[1,2], WANG Zeze[1,2], TAN Yulong[1,2], HE Genlin[1,2], LI Ping[1,2], SHEN Tingting[1,2], LIU Xiaoqian[1,2], YANG Xuesen[1,2] [1]Department of Tropical Medicine, [2]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the differences in myocardial injury in rat models of exertional heat stroke (EHS) and classic heat stroke (CHS) in order to provide possible laboratory basis for clinical treatment of heat stroke. **Methods** A total of 80 SD rats were randomly divided into control group ($n=10$),

[通信作者] 杨学森,E-mail:xuesenyyy@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

exercise group (EXC, $n=10$), classic heat stroke group (CHS, $n=30$) and exertional heat stroke group (EHS, $n=30$). The rats in the control and EXC groups were exposed to a condition of ambient temperature of (25±0.5) ℃ and relative humidity of (50±5)%, and those of the EHS and CHS groups were placed in a simulated hot climate chamber with an ambient temperature of (39.0±0.5) ℃ and a relative humidity of (50±5)%. The rats in the EHS and EXC groups were administered to treadmill exercise treatment under a running speed of 12 m/min and a slope of 0°, and rested for 2 min in every 8 min of exercise to monitor rectal temperature. When the core body temperature reached 42.3 ℃ or collapsed (tail pinching reflex disappeared), the rats were taken to normal temperature and rewarmed. Echocardiography was used to detect the cardiac function, and serum myocardial enzymes (AST, LDH, CK-MB and CK) were detected by biochemical analyzer. HE staining was used to detect the pathological changes of rat myocardial tissue. The apoptosis of cardiomyocytes was detected by TUNEL staining. The expression levels of quinone oxidoreductase 1 (Nrf2), cleaved Caspase-3, anti-apoptotic protein (Bcl-2), pro-apoptotic protein (Bax) and heme oxygenase-1 (HO-1) were detected by Western blotting. **Results** Compared with the CHS group, the EHS group had significantly shortened latent period ($P<0.01$) and reduced heat load in heat stroke ($P<0.01$). The CHS group obtained obviously higher dehydration rate ($P<0.01$) but lower dehydration velocity ($P<0.01$) than the CHS group. There was no significant difference in rectal temperature between the 2 heat stroke groups ($P>0.05$). Echocardiography indicated that statistically lower left ventricular ejection fraction (LVEF) ($P<0.05$) and higher AST and LDH levels ($P<0.01$) were observed in the EHS group than the CHS group. The pathological changes of acute myocardial injury including myocardial cell edema, disordered and broken muscle fibers, and inflammatory infiltration, were observed in both groups, but the pathological score of myocardial injury was notably higher in the EHS group than the CHS group ($P<0.05$), so was the apoptotic rate of cardiomyocytes ($P<0.05$). The protein levels of oxidative stress-related signaling pathway-related proteins were significantly higher in the EHS group than the CHS group. **Conclusion** High ambient temperature combined with exercise has a higher susceptibility to heat stroke. EHS-mediated abnormal cardiac dysfunction and myocardial apoptosis were more severe than CHS inducement, which may be related to the activation of oxidative stress-related signaling pathways.

[**Key words**] classic heat stroke; exertional heat stroke; cardiac injury; echocardiography; apoptosis

Corresponding author: YANG Xuesen, E-mail: xuesenyyy@hotmail.com

热射病(heat stroke)是一种危及生命的疾病,临床诊断为严重的体温升高,伴有中枢神经系统功能障碍[1]。根据引发热射病原因及是否伴随劳力性因素,分为经典型热射病(classic heat stroke,CHS)和劳力型热射病(exertional heat stroke,EHS)[1-3]。两者的潜在机制不同,CHS 是由于暴露在热环境且散热机制差,因此,多发于老年人和体温调节尚未发育完全的儿童。而 EHS 则与体力活动相关,是由于代谢热量的过度产生超过了生理散热机制,因此运动员、工人、消防员等发病率较高[4]。虽然 EHS 和 CHS 患者均可出现不同程度的器官功能障碍,但 EHS 患者较 CHS 患者表现出更多器官、系统功能障碍,预后也较 CHS 差[5],因此研究两者发病机制及器官损害的差异是必要的。

在竞技体育中,EHS 被认为是运动员非创伤性死亡的第二大原因[6],2009-2018 年日本高中生运动相关死亡的流行病学调查显示,EHS 致死高达 22.2%,仅次于心脏相关死亡及创伤性死亡[7]。在美国军队中,1998-2017 年临床诊断的 EHS 发病率为(2.7±0.5)/10 000[8]。然而,该项流行病学调查基于准确的临床诊断,EHS 导致的死亡率估计在真实世界要高得多[4]。虽然 EHS 是公认最古老的医学疾病之一,但目前仍缺乏一个普遍接受的定义,EHS 的主要特征之一是在运动过程中骨骼肌收缩产生的代谢热不能迅速消散,骨骼肌收缩只有 20%的效率(即能量用于从 ADP 重新合成 ATP),因此 80%的能量以热量的形式释放在体内,在失代偿条件下,高心排血量无法维持,如得不到及时救治,最终发展为多器官功能衰竭甚至死亡[9-10]。高温复合运动的病理生理反应主要表现为细胞热休克、缺血和心血管反应,其中心血管反应包括内脏血管收缩,皮肤血管扩张,导致器官(肠、肾、肝、脾

等)低灌注,缺血后产生活性氧[11]。

心血管系统是热损伤的重要靶点之一[12]。在热射病的快速进展过程中,心肌损伤会增加死亡的风险[13]。刘志峰等[14]对2008-2019年劳力型热射病致心肌损伤的患者进行回顾性研究,结果显示53.7%的热射病患者合并心肌损伤,与非心肌损伤的热射病患者相比,心肌损伤的热射病患者更为严重,心肌损伤组的90 d死亡率显著增高。还有研究报道,热射病能够对心脏造成急性永久性损伤,并产生慢性及远期影响。热射病患者心血管疾病的发生率远远高于其他热致相关疾病患者及对照组患者[15-16]。EHS小鼠中发生的迟发性代谢紊乱与动脉粥样硬化的形成和心力衰竭的发展有关[17-18]。热射病除了造成心脏急性损伤,还对远期预后存在深远影响。但目前对CHS和EHS发生发展过程中,心脏功能的变化规律及对应的病理生理和分子机制仍知之甚少。因此,我们对比研究EHS和CHS大鼠急性心脏损伤的特点,探索两种热射病动物模型心肌损伤的差异,为热射病心肌损伤的临床治疗提供可能的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 动物

所有SPF级雄性SD大鼠,体质量220~250 g,均购自陆军军医大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(渝)2022-0011,使用许可证号:SYXK(渝)2022-0018。购入后正常饮食饮水,适应性饲养1周后进行后续实验。实验动物相关方案通过动物伦理学委员会批准。

实验动物分组80只SD大鼠按随机数表法随机分为对照组(CON,$n=10$)、运动对照组(EXC,$n=10$)、经典热射病组(CHS,$n=30$)和劳力型热射病组(EHS,$n=30$)。

1.2 主要仪器与设备

高温复合多因素环境模拟舱(烟台豪特氧业设备有限公司,中国),5道小动物跑台(Harvard Apparatus,美国),Visual sonic VEVO 2100超高频高分辨率小动物超声成像仪(加拿大Visual Sonics公司),四道热电偶直肠温度测量仪(台湾群特)。

1.3 方法

1.3.1 核心体温测量 将涂有润滑油的动物四道肛温仪电偶探头插入大鼠肛门,电偶探头插入深度3~5 cm,间断测量大鼠直肠温度(Tr),以Tr代表核心体温(Tc)。

1.3.2 适应性训练 实验开始前所有大鼠均接受模拟热气候动物舱适应性训练。大鼠连同饲养笼置于环境模拟舱中,环境温度25 ℃,湿度(50±5)%,1次/d,每次8 h,连续1周,期间自由进食、水。适应性运动训练:将大鼠置于跑台,跑台放置于环境模拟舱中,设置跑台速度为12 m/min,坡度0°,运动时间为10 min,1次/d,连续5 d,保证所有运动组动物正确使用跑台,运动期间禁食水。适应性训练结束后洗脱2 d,避免运动训练对后续实验的干扰,洗脱期间仍将动物置于多气候模拟舱中适应环境。

1.3.3 热射病动物模型构建 动物模型构建前30 min,实验动物禁食水,监测体重、直肠温度。待直肠温度(初始Tr,Tr,ini)稳定在37.0 ℃以下,多气候模拟舱稳定在目标环境条件后将动物置于舱内,作为实验开始起点(0 min)。热暴露组(EHS组和CHS组)大鼠置于环境温度(39.0±0.5)℃,相对湿度(50±5)%。EHS组大鼠给予强迫跑台运动,强迫方式为电击,电击强度0.8 mA,跑台为恒定速度12 m/min,坡度为0°,每运动8 min休息2 min,以测量直肠温度[19]。当Tr接近最大Tr(Tr,max=42.3 ℃)时,间隔1~3 min测量直肠温度。CHS组实验动物不接受强迫运动。热暴露组达到42.3 ℃或出现瘫倒(掐尾反射消失),作为热射病发生标志并终止实验。常温组(对照组和EXC组)置于环境温度25±0.5 ℃,湿度(50±5)%条件下。EXC组运动及电击强度与EHS组相同,动物力竭瘫倒时(掐尾反射消失)终止实验。对照组不接受强迫运动。用摄像机连续监测大鼠行为。实验期间,所有实验动物禁食、水。实验终止后,恢复自由食、水,置于原饲养环境中复温。

1.3.4 热暴露负荷面积计算 “热暴露负荷面积”被用作“热应激”或“热剂量”的估计值,根据LEON等人[20]的定义进行计算。从数学上讲,约等于温度变化曲线下的面积。时长的计算,系热暴露开始(0 min)至热射病发生(Tr=42.3 ℃或出现瘫倒)所持续的时间。升温速率(℃/min)=[(Tr,max-Tr,ini)/热暴露时间]×100%。热暴露负荷(℃.min)=Tr≥39.5 ℃的热暴露时间×(Tr,max-39.5 ℃),选择39.5 ℃作为截断值,是由于环境温度保持在(39.0±0.5) ℃,当大鼠Tr≥39.5 ℃时,无法单独通过辐射排出多余热量[21]。

1.3.5 超声心动图仪检测大鼠心功能指标 动物模型构建后1~3 h,采用加拿大VisualSonics公司的VeVo2100型高分辨小动物超声仪检测各组大鼠左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)及左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)。LVEF指每搏输出量占心室舒张末期容积量

的百分比,正常值为50%~70%,是判断心力衰竭类型的重要指征之一。LVFS是指左心室舒张末期与收缩末期的内径差,再比上左心室的舒张末期内径所得的百分比数值,正常范围值为25%~45%,通常在临床上需结合LVEF等指标来综合判断心脏的收缩功能[22-23]。因此,本研究以LVEF<50%作为诊断左室收缩功能异常的标准。

超声心动图由陆军军医大学第一附属医院超声科具有小动物超声操作经验的实验技师实施检测。各组检测大鼠吸入异氟醚麻醉后,仔细脱去大鼠胸前毛发,充分暴露胸骨和左胸廓位置,然后行M型超声心动图检测。

1.3.6 样品的采集与制备 1%戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,并将大鼠仰卧位固定于手术台上,于腹主动脉采血。立即在4 ℃下,3 000转/min离心20 min,取上层血清待测。采血后打开胸腔,取出心脏组织,在冰上除去心房组织,留取左心室或心尖部组织,生理盐水冲洗,立即浸泡于4%多聚甲醛中固定72 h,进行常规脱水、透明、石蜡包埋等,切成4 μm的石蜡切片备用。每组剩余心肌组织保存于-80 ℃备用。

1.3.7 血清心肌酶学检测 基于采集的血清,采用微纳芯生化试剂盒检测血清AST、LDH、CK、CK-MB水平。

1.3.8 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin,HE)观察大鼠心肌组织病理变化 取左心室组织石蜡切片,二甲苯脱蜡后进行常规HE染色。乙醇脱水、二甲苯透明处理后用中性树脂封片,置于显微镜下观察心肌组织的病理变化。

1.3.9 TUNEL染色观察大鼠心肌细胞凋亡情况 取石蜡切片采用二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水后,用蛋白酶K处理。按照TUNEL试剂盒说明书进行后续操作。二甲苯透明处理后用中性树脂封片后在显微镜下观察细胞凋亡情况。视野中红色颗粒即为凋亡细胞。

1.3.10 蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测心肌组织中内质网应激及线粒体凋亡相关蛋白表达水平 心肌组织采用心肌蛋白提取试剂盒提取蛋白上清液。采用BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性后采用SDS-PAGE凝胶电泳分离目的蛋白。将蛋白转移至PVDF膜上,采用抗体结合后,经ECL发光试剂显色。

1.4 统计学分析

本研究的实验数据均采用SPSS 22.0版软件统计分析。其中符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,多组计量资料之间的比较采用ANOVA方差分析,两两比较采用LSD-t检验。两组间比较采用独立样本t检验。24 h存活率分析采用Kaplan-Meier法,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种热射病模型中体温调节反应及总体表现

各组实验动物热应激反应生理指标如表1所示。所有实验动物实验前初始体重无统计学差异,将各组动物放置(25.0±0.5)℃,相对湿度(50±5)%,待动物初始基础体温稳定在37 ℃以下(表1)方可开始运动和(或)热暴露实验,经过跑台强迫运动和(或)热暴露实验后。EXC组运动表现(运动距离 & 运动时间)显著优于EHS组($P<0.01$)。CHS组到达Tr,max(或出现神经症状)的时间显著长于EHS组($P<0.01$)。EXC组、CHS组、EHS组体重丢失总量均高于对照组($P<0.01$)。CHS组体重丢失率高于EXC组及EHS组($P<0.01$),EXC组高于EHS组,但两者无统计学差异($P>0.05$)。值得注意的是,EHS组的热暴露时间及运动时间远远低于CHS组和EXC组,因此本研究计算了各组体重丢失速率(g/min),即单位时间内的体重丢失。结果显示EHS组的体重丢失速率远远高于CHS组($P<0.01$)和EXC组($P<0.01$)。提示高温复合运动使受热动物在短时间内大量脱水,因此推断高温复合运动对有效循环血量的急性影响,远远大于静息状态下受热及常温运动。

表1 各组动物模型相关生理指标

热反应指标	对照组	EXC组	CHS组	EHS组
初始体温(℃)	36.39±0.36	36.54±0.28	36.65±0.12	36.56±0.17
最高体温(℃)	36.52±0.43^{cfh}	39.03±0.29^{afh}	42.36±0.25^{bd}	42.48±0.23^{bd}
脱水率(%)	3.06±0.51^{dfh}	8.09±2.42^{bf}	14.09±1.45^{bdh}	6.83±2.63^{bf}
脱水速率(g/h)	1.18±0.24^{dfh}	4.99±0.90^{ah}	5.54±0.87^{bh}	13.19±4.64^{bdf}
热暴露时间(min)	-	-	359.69±32.99^{h}	81.58±36.34^{f}
运动时间(min)	-	237.88±78.47^{h}	-	45.90±14.04^{d}
运动距离(m)	-	3277.12±549.27^{h}	-	526.67±175.85^{d}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与EXC比较;e:$P<0.05$,f:$P<0.01$,与CHS比较;g:$P<0.05$,h:$P<0.01$与EHS比较

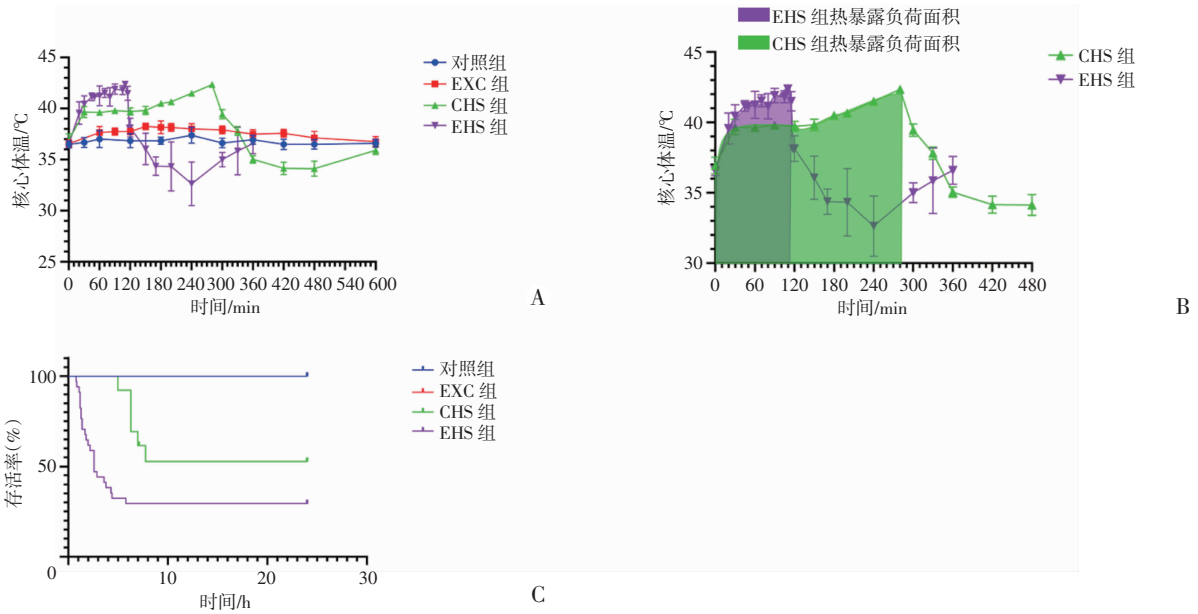
实验期间各组体温变化曲线如图 1 所示。结果显示,CHS 组较短时间内 Tr 即上升到较高温度,随即稳定在 39℃-40.0℃这一平台期,持续数小时,最后于 Tr,max 附近,核心体温迅速上升并出现神经症状,Tr,max 几乎于神经症状出现的数分钟后达到。EHS 组的核心体温动态时相变化曲线趋势与 CHS 类似,即运动早期核心体温迅速上升,随即稳定在平台期,在 Tr,max 附近再次迅速上升,实验动物在瘫倒并停止自主运动时几乎已达到 Tr,max。与 CHS 不同的是,EHS 组在热暴露早期,迅速升至 41.0 ℃左右并稳定在这一水平,平台期较 CHS 明显缩短(图 1A)。对此可能的解释是,高温复合运动后,大量代谢热的产生远远超出了大鼠机体散热代偿能力,导致 EHS 组快速达到 Tr,max。相比热暴露组(CHS 和 EHS),对照组体温在正常范围内波动,平均 Tr,max=(36.53±0.43) ℃(表 1)。EXC 组的变化幅度在 2.5 ℃内波动,平均 Tr,max=(39.03±0.29) ℃。造模成功后,热暴露组在放置室温后,恢复期体温出现不同的时相变化:①体温迅速降至低体温范围(Tr<35.0 ℃),其中部分动物体温呈双相变化,表现为低体温期持续 1~3 h 后恢复至基线水平;②部分体温持续处于低体温期,未出现反弹,直至死亡(图 1A)。比较热暴露组热负荷面积,结果表明 EHS 组大鼠热暴露负荷面积显著低于 CHS 组大鼠(P<0.05,图 1B)。各组 24 h 存活率显示对照组和 EXC 组全部存活,CHS 组存活率 52%,EHS 存活率 36%,两者差异具有统计学意义(P<0.05,图 1C)。

2.2 超声心动图评估心脏收缩功能结果

各组动物(n=9)行超声心动图检测,入选标准为收缩功能正常(即 LVEF>50%)。热射病发生后 1~3 h,再次评估心脏收缩功能,如前所述,判定左室收缩功能异常的标准为 LVEF<50%。

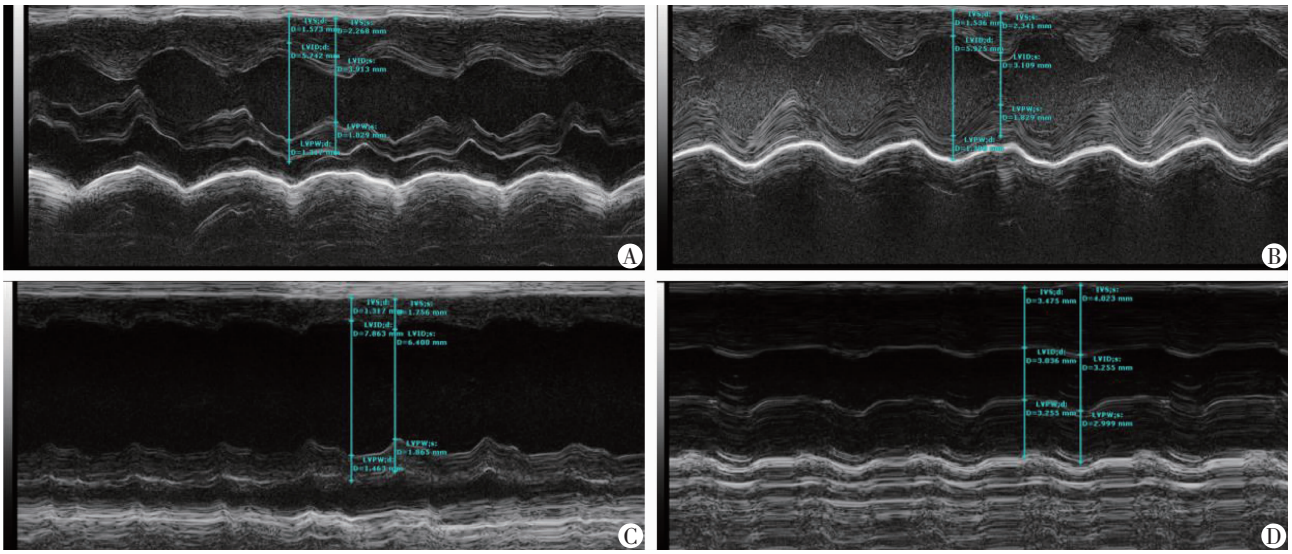
表 2 所示各组造模成功后 LVEF 及 LVFS 情况,结果显示,对照组及 EXC 组大鼠 LVEF、LVFS 均正常,且 EXC 组大鼠显著高于其他各组(P<0.05)。热暴露组 LEVF 和 LVFS 较对照组显著减低(P<0.05),其中,EHS 组 LVEF 低于 CHS 组,差异具有统计学意义(P<0.05),但两者 LVFS 无统计学差异。

如图 2 所示,对照组和 EXC 组心腔结构及心功能正常。CHS 组可见心腔扩大,EHS 可见左室后壁与室间隔同向运动。两种热射病模型均有心功能异常发生,CHS 组有 3 只大鼠(3/9)呈现左室收缩功能异常,EHS 组大鼠有 5 只大鼠(5/9)出现左室收缩功能异常。有趣的是,对上述实验动物进行 24 h 监测,CHS 组及 EHS 出现收缩功能异常的大鼠均在 24 h 内死亡,无心功能异常的存活时间均超过 24 h,此结果与各组大鼠 24 h 存活率一致,说明热射病后心功能异常可能与 24 h 内的急性期死亡相关。



A:动物升温曲线;B:动物热暴露负荷面积;C:动物存活率

图 1 各组动物中体温变化曲线、热暴露负荷面积及存活率



A:对照组;B:EXC 组;C:CHS 组;D:EHS 组

图 2 两种热射病模型超声心动图代表性结果,对照组、EXC 组心功能正常,未见心脏结构性改变;CHS 组可见左室舒张内径增大,提示心室扩张;EHS 组可见左室后壁与室间隔呈同向运动

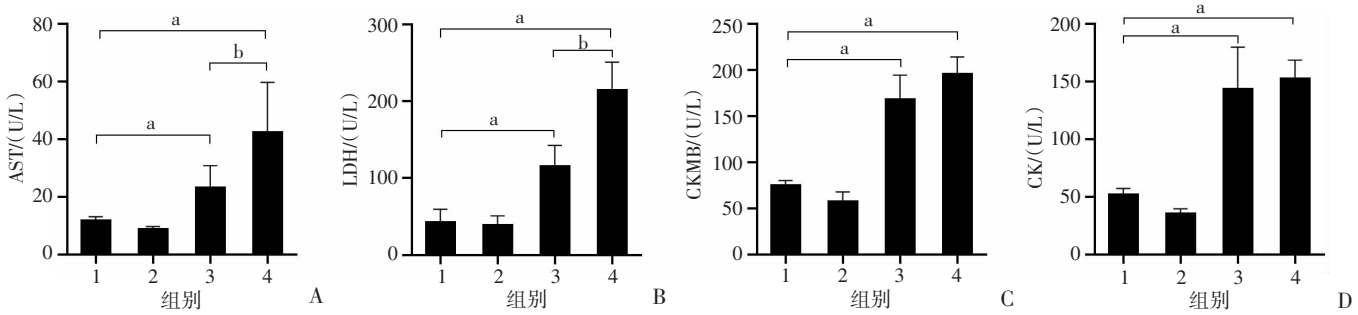
表 2 各组动物模型心功能指标

心功能指标	对照组	EXC 组	CHS 组	EHS 组
射血分数(%)	66.68±5.45^{cfh}	78.43±6.69^{afh}	53.77±9.87^{bdg}	44.06±13.12^{bde}
短轴缩短率(%)	37.67±4.51^{deh}	48.14±7.40^{bfh}	29.08±6.56^{ad}	22.34±8.68^{bd}

a:P<0.05,b:P<0.01,与对照组比较;c:P<0.05,d:P<0.01,与 EXC 比较;e:P<0.05,f:P<0.01,与 EHS 比较;g:P<0.05,h:P<0.01,与 CHS 比较

2.3 血清心肌酶学水平

基于生存曲线,EHS 组和 CHS 组在热射病发生后 1~6 h 死亡较多。因此,心肌酶学检测选择热射病发生后 3 h 收集血清标本。结果表明,EHS 组 AST 水平高于对照组(P<0.01,图 3A)和 EXC 组(P<0.01,图 3A)。EHS 组 AST 水平显著高于 CHS 组(P<0.01,图 3A)。LDH 水平 EHS 组高于其他 3 组(P<0.01,图 3B)。EHS 和 CHS 组的 CK-MB 和 CK 水平显著高于对照组和 EXC 组(P<0.01,图 3C,D),而 EHS 组和 CHS 组间无统计学差异(P>0.05,图 3C,D)。



1:对照组;2:EXC 组;3:CHS 组;4:EHS 组;a:P<0.01,与对照组比较;b:P<0.01,与 CHS 组比较

A:血清 AST 含量;B:血清 LDH 含量;C:血清 CKMB 含量;D:血清 CK 含量

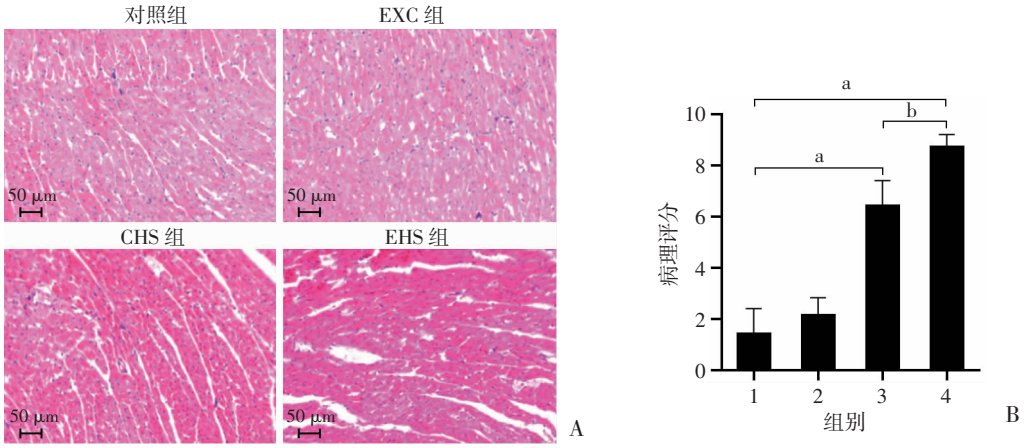
图 3 两种热射病模型对血清心肌酶学水平的影响

2.4　组织病理学结果

心肌组织病理学改变是明确心肌损伤的重要依据。对照组心肌纤维染色均匀,细胞边界清晰。而EXC组小鼠心脏病理学切片显示,心肌纤维排列稍紊乱,可见少量炎症细胞浸润。CHS组心肌纤维边界较紊乱,细胞水肿。EHS组心肌纤维界限不清,细胞严重水肿,均质红染(图4A)。此外,不同组的组织学评分表明,EHS组和CHS组心肌病理损伤重于EXC组和对照组($P<0.01$,图4B)。EHS组心肌病理损伤重于CHS组($P<0.05$,图4B)。

2.5　心肌细胞凋亡检测

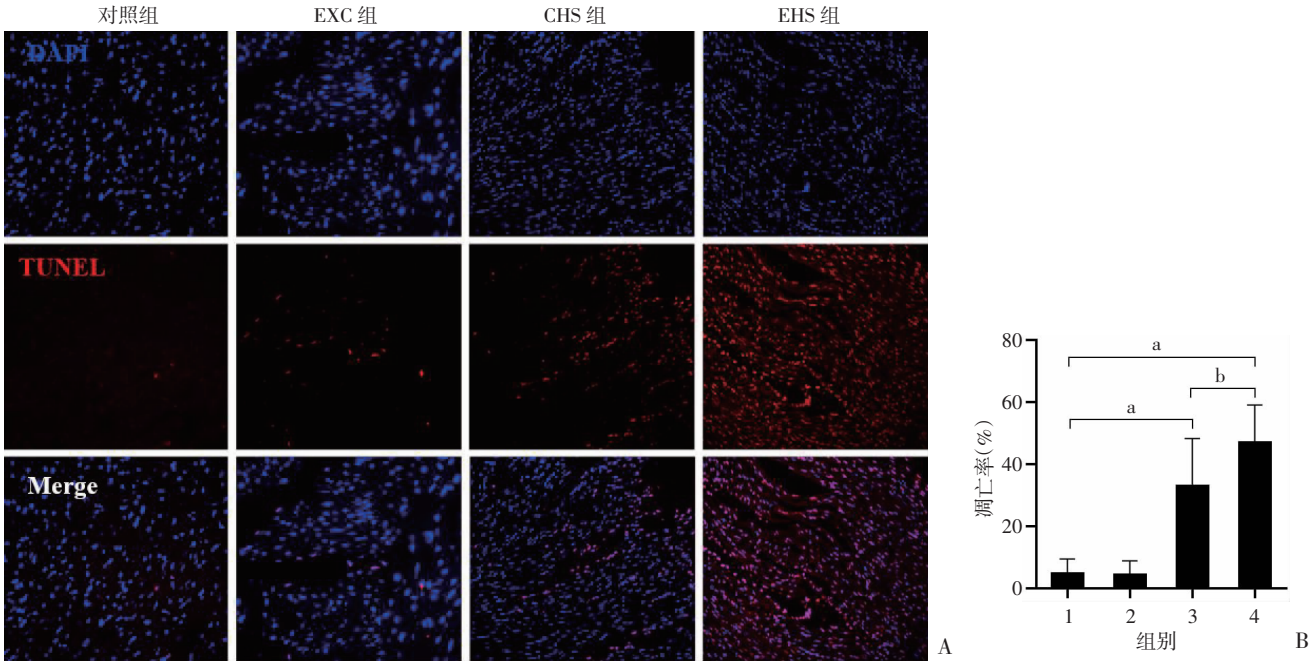
通过TUNEL检测心肌细胞凋亡。对照组和EXC组未见明显凋亡;CHS组及EHS组可见大量心肌细胞凋亡(图5A),且EHS组凋亡比率显著高于CHS组($P<0.05$,图5B)。



a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与CHS组比较

A: 动物心肌组织HE染色; B: 病理学评分　1:对照组;2:EXC组;3:CHS组;4:EHS组

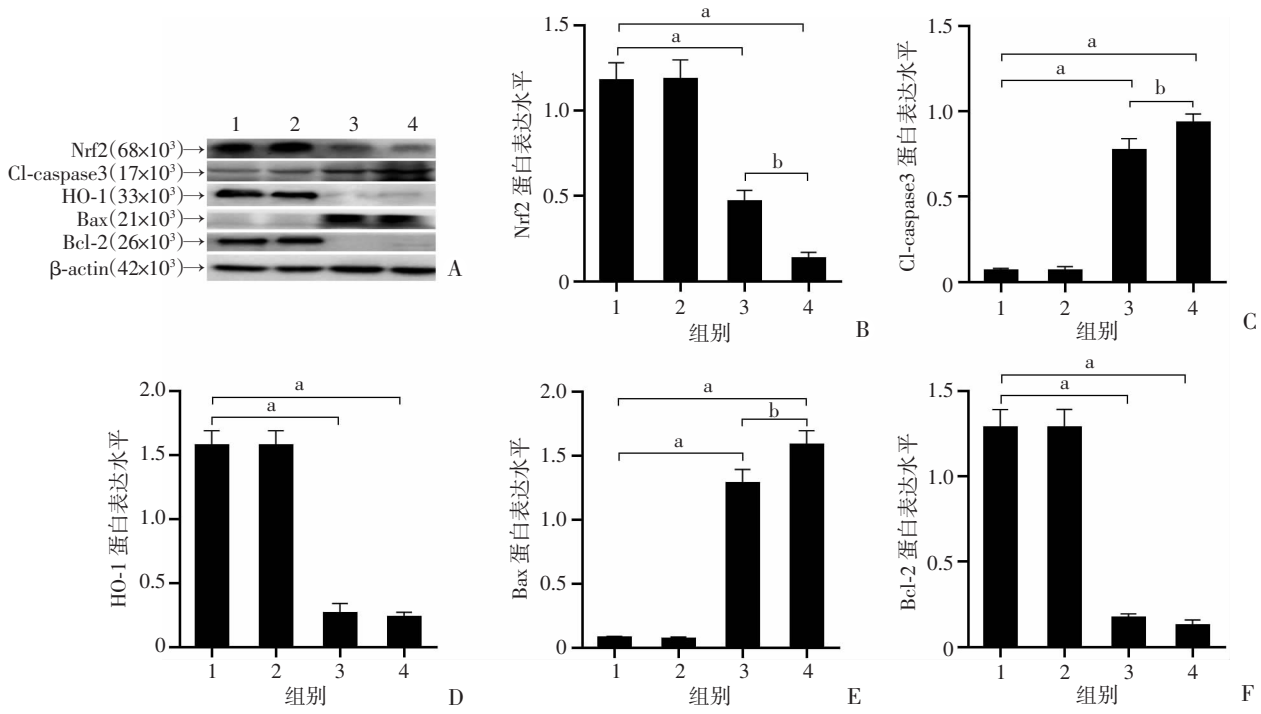
图4　两种热射病模型中大鼠左心室心肌组织病理切片图



a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与CHS组比较

A: 动物心肌组织TUNLE染色; B: 心肌细胞凋亡率　1:对照组;2:EXC组;3:CHS组;4:EHS组

图5　两种热射病模型中大鼠左心室心肌组织TUNLE染色图



1:对照组;2:EXC 组;3:CHS 组;4:EHS 组;a: $P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 CHS 组比较

A: 动物心肌组织蛋白条带图; B: Nrf2 蛋白表达水平;C: Cl-caspase3 蛋白表达水平;D: HO-1 蛋白表达水平;E: Bax 蛋白表达水平;F: Bcl-2 蛋白表达水平

图 6 两种热射病模型中大鼠左心室心肌组织蛋白表达

2.6 热射病导致凋亡相关蛋白表达上调

如图 6 所示,与对照组相比,CHS 组、EHS 组大鼠心肌组织的 Nrf2、HO-1、Bcl-2 水平降低,Cl-Caspase3、Bax 水平升高。与 CHS 组相比,EHS 组大鼠心肌组织的 Nrf2 水平降低,Cl-Caspase3、Bax 水平升高。

3 讨论

随着全球气候变暖,热射病发病率逐渐升高[24]。心血管系统在热射病过程中参与全身的散热反应与器官灌注。在热射病多脏器功能障碍患者中,心血管功能障碍发生的比例可高达 43.4%~65.2%,且心脏被认为是热射病易受损的重要脏器之一[25-27]。与 CHS 相比,EHS 除了高温环境这一危险因素,还复合了高强度运动,因此心脏负荷相对更大。临床流行病学亦提示,EHS 病情更为凶猛,发展迅速,病残率及病死率更高[5, 15]。因此,对比 CHS 和 EHS 所导致的心肌损伤的研究就显得尤为必要。

本研究中,相同体质量、相同核心体温的健康大鼠,如果仅仅给予运动负荷,而没有复合高温环境,大鼠未发生热射病,即大鼠的核心体温不会达到 42.3℃或出现神经症状。单纯的热暴露,大鼠可出现热射病(即 Tr,max≥42.3 ℃或出现神经症状),但需要相对较长的热暴露时间[(359.69±32.99) min,表 1]。而当高温复合运动时,大鼠的核心体温快速升高,在较短时间内[(81.58±36.33) min,表 1]即可达到热射病标准。因此,我们推断,静息状态下受热,CHS 的散热机制可以在较长时间内代偿机体产热。相比 CHS,EHS 在复合高温及高强度运动条件下,骨骼肌大量产热以及心脏负荷增大[28],导致机体在较短时间内即进入散热失代偿状态,表现为平台期较短,平台期体温较 CHS 显著增高(图 1A)。

机体可通过辐射、传导和对流以及蒸发等物理方式散热。散热的速度主要取决于机体与环境之间的温度差。机体温度越高或环境温度越低,则散热越快。当环境温度与皮肤温度接近或相等时,辐射、传导和对流这 3 种散热方式便无效[3],机体只能依靠蒸发进行散热。蒸发散热会引起机体脱水,因此我们观察了 CHS 组和 EHS 组的脱水率。有趣的是,CHS 组的脱水率是高于 EHS 组的。出现这样的现象,我们认为是因为 EHS 组总的热暴露时间远远短于 CHS 组,机体进

行蒸发散热的时间较短。因此,我们通过脱水速率(g/h)来计算,这个计算方法排除了热暴露时长对脱水的影响,只观察单位时间的脱水量,结果发现 EHS 组每小时脱水量远远高于 CHS 组(表 1)。由此推断 EHS 快速脱水,导致有效循环血量在短期内急剧下降,是 EHS 心功能障碍发生率大于 CHS 的原因之一。

体温升高迫使机体散热增加,这种需求是通过增加心输出量,以支持皮肤血流量的增加实现的,这种改变导致内脏灌注减少,从而介导组织损伤和多器官功能衰竭[28-29]。有研究发现,机体受热复合运动时,心血管系统须承担更大的负荷[28]。本研究结果亦显示,虽然 CHS 和 EHS 均会导致不同程度的心功能障碍,但 EHS 发生心功能障碍的几率更大——如 CHS 组的 9 只大鼠中,有 3 只大鼠出现了射血分数减低,EHS 组的 9 只大鼠中,有 5 只大鼠出现射血分数减低。并且,我们还发现 CHS 组及 EHS 出现收缩功能异常的大鼠均在 24 h 内死亡,心功能正常大鼠的存活时间均超过 24 h,此结果与各组大鼠 24 h 存活率一致。上述结果说明,高温复合运动,增加了热射病和心功能障碍的易感性,表现为较少的热负荷即可导致热射病,以及更高的心功能障碍发生率。

心肌酶是存在于心肌的多种酶的总称,包括天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LD 或 LDH)、肌酸激酶(CK)及同工酶(CKMB)等。急性心肌梗死时因心肌细胞坏死而释放出心肌内多种酶,因此测定血清中心肌酶对了解心肌细胞的损伤有一定的价值。本研究发现,仅给予运动负荷,而没有复合高温环境,不会导致血清中心肌酶的增加。而两种热射病模型均会导致血清中心肌酶的增加,提示二者均会引起心肌细胞的损伤,但是,EHS 大鼠 AST、LDH 显著高于 CHS,可能说明 EHS 介导的心肌损伤更严重。除此之外,心脏组织的病理学结果也提示两种热射病模型均可导致心肌组织出现心肌纤维界限不清,细胞水肿等改变。EHS 组的病理学评分高于 CHS 组,且具有统计学差异。

心脏主要通过线粒体产生大量的 ATP,以维持高耗能需求及心脏功能,除了作为心肌细胞的动力站,线粒体在调节心肌细胞死亡(凋亡、坏死)中发挥重要作用。心肌细胞作为高耗能细胞,富含大量线粒体,过去有报道心肌细胞线粒体损伤可激活线粒体凋亡途径,导致心肌细胞大量凋亡[30-32]。有证据表明,体温过高通过线粒体 Bax 易位和细胞色素 c 释放到细胞质激活启动子 caspase-9,进而激活下游效应子 caspases-3,从而介导细胞凋亡[31]。本研究通过心肌细胞凋亡检测,发现热暴露组(CHS 组和 EHS 组)凋亡比率明显高于非热暴露组(对照组和 EXC 组),且 EHS 组凋亡率高于 CHS 组。并且在蛋白表达水平上,热暴露组(CHS 组和 EHS 组)Caspase3、Bax 水平升高,Bcl-2 水平降低。提示心肌细胞发生了以细胞凋亡为特征的心肌损伤。Nrf2 通路在抗氧化应激中具有重要作用,当细胞内氧自由基增多时,Nrf2 会被激活进入细胞核,诱导下游的 HO-1 等内源性保护因子表达[33-35]。本研究中,热暴露组(CHS 组和 EHS 组)大鼠心肌组织的 Nrf2、HO-1 水平降低,提示心肌细胞还遭受了氧化应激损伤。

综上所述,EHS 组较 CHS 组具有更高的脱水速率和心功能障碍发病率。EHS 组的心功能损伤和心肌组织损伤显著高于 CHS 组,且 EHS 组心肌细胞凋亡较 CHS 严重。EHS 组大鼠心肌损伤可能与氧化应激相关信号通路的活化相关。这对于开发新的有针对性的 EHS 治疗策略提供了实验基础。由于 EHS 发病机制的复杂性,且本研究对此问题仅是热射病发病后短期的观察研究,因此相关的实验结果还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] LEON L R, BOUCHAMA A. Heat stroke[J]. Compr Physiol, 2015, 5(2): 611-647. DOI: 10.1002/cphy.c140017.

[2] HIFUMI T, KONDO Y, SHIMIZU K, *et al*. Heat stroke[J]. J Intensive Care, 2018, 6(1): 1-8. DOI: 10.1186/s40560-018-0298-4.

[3] EPSTEIN Y, YANOVICH R. Heatstroke[J]. N Engl J Med, 2019, 380(25): 2449-2459. DOI: 10.1056/NEJMra1810762.

[4] BOUCHAMA A, ABUYASSIN B, LEHE C, *et al*. Classic and exertional heatstroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1): 8. DOI: 10.1038/s41572-021-00334-6.

[5] 耿焱, 苏磊, 彭娜, 等. 劳力型与经典型热射病大鼠急性肺损伤的病理特点及时程变化比较[J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(7): 550-554. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.07.06.
GENG Y, SU L, PENG N, *et al*. Comparison of lung injuries in pathological features and time-course changes between exertional and classic heatstroke rats[J]. Med J Chin PLA, 2016, 41(7): 550-554. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.07.06.

[6] PÉRIARD J D, DEGROOT D, JAY O. Exertional heat stroke in sport and the military: epidemiology and mitigation[J]. Exp Physiol, 2022, 107(10): 1111-1121. DOI: 10.1113/EP090686.

[7] YAMANAKA M S, HOSOKAWA Y, AYUSAWA M, *et al*. Epidemiology of sports-related fatalities during organized school sports in Japanese high schools between 2009 and 2018[J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0256383. DOI: 10.1371/journal.pone.0256383.

[8] KNAPIK J J, EPSTEIN Y. Exertional heat stroke: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention[J]. J Spec Oper Med, 2019, 19(2): 108-116. DOI: 10.55460/5P2Q-1MBQ.

[9] LAITANO O, LEON L R, ROBERTS W O, *et al*. Controversies in exertional heat stroke diagnosis, prevention, and treatment[J]. J Appl Physiol (1985), 2019, 127(5): 1338-1348. DOI: 10.1152/japplphysiol.00452.2019.

[10] LAITANO O, MURRAY K O, LEON L R. Overlapping mechanisms of exertional heat stroke and malignant hyperthermia: evidence *vs*. conjecture[J]. Sports Med, 2020, 50(9): 1581-1592. DOI: 10.1007/s40279-020-01318-4.

[11] LEE J K W, TAN B, OGDEN H B, *et al*. Exertional heat stroke: nutritional considerations[J]. Exp Physiol, 2022, 107(10): 1122-1135. DOI: 10.1113/EP090149.

[12] 娄云鹏,林慧艳,王洪萍,等. 热射病心肌损害的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(10): 1304-1306. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.025.
LOU Y P, LIN H Y, WANG H P, *et al*. Research progress in the heatstroke-induced myocardial injury[J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31(10): 1304-1306. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.025.

[13] WEI D Y, GU T J, YI C H, *et al*. A nomogram for predicting patients with severe heatstroke[J]. Shock, 2022, 58(2): 95-102. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001962.

[14] ZHONG L, JI J J, WANG C L, *et al*. Clinical characteristics and risk factors of male exertional heatstroke in patients with myocardial injury: an over 10-year retrospective cohort study[J]. Int J Hyperthermia, 2021, 38(1): 970-975. DOI: 10.1080/02656736.2021.1941312.

[15] WALLACE R F, KRIEBEL D, PUNNETT L, *et al*. Prior heat illness hospitalization and risk of early death[J]. Environ Res, 2007, 104(2): 290-295. DOI: 10.1016/j.envres.2007.01.003.

[16] WANG J C, CHIEN W C, CHU P, *et al*. The association between heat stroke and subsequent cardiovascular diseases[J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0211386. DOI: 10.1371/journal.pone.0211386.

[17] NZVERE F P, TARIQ E, NISHANTH K, *et al*. Long-term cardiovascular diseases of heatstroke: a delayed pathophysiology outcome[J]. Cureus, 2020, 12(8): e9595. DOI: 10.7759/cureus.9595.

[18] LAITANO O, GARCIA C K, MATTINGLY A J, *et al*. Delayed metabolic dysfunction in myocardium following exertional heat stroke in mice[J]. J Physiol, 2020, 598(5): 967-985. DOI: 10.1113/JP279310.

[19] GENG Y, PENG N, LIU Y N, *et al*. Physical effort affects heatstroke thermoregulatory response and mortality in rats[J]. Shock, 2015, 44(2): 149-156. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000387.

[20] LEON L R, DUBOSE D A, MASON C W. Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288(1): R197-R204. DOI: 10.1152/ajpregu.00046.2004.

[21] KING M A, LEON L R, MUSTICO D L, *et al*. Biomarkers of multiorgan injury in a preclinical model of exertional heat stroke[J]. J Appl Physiol (1985), 2015, 118(10): 1207-1220. DOI: 10.1152/japplphysiol.01051.2014.

[22] 宋军, 高东梅, 冯海艳, 等. 超声心动图技术及参数评价左心功能的研究[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 650-652. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2017.04.046.
SONG J, GAO D M, FENG H Y, *et al*. Advances in left ventricular function evaluation of echocardiographic technique and parameters[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2017, 33(4): 650-652. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2017.04.046.

[23] 甘建红, 李炜. M型超声心动图中左室射血分数自动计算方法[J]. 成都信息工程大学学报, 2021, 36(6)624-628. DOI: 10.16836/j.cnki.jcuit.2021.06.007
GAN J H, LI W. Automatic calculation method of left ventricular ejection fraction in M-mode echocardiography[J]. J Chengdu Univ Inf Technol, 2021, 36(6)624-628. DOI: 10.16836/j.cnki.jcuit.2021.06.007

[24] IBA T, CONNORS J M, LEVI M, *et al*. Heatstroke-induced coagulopathy: Biomarkers, mechanistic insights, and patient management[J]. eClinicalMedicine, 2022, 44: 101276. DOI: 10.1016/j.eclinm.2022.101276.

[25] CRANDALL C G, GONZÁLEZ-ALONSO J. Cardiovascular

function in the heat-stressed human[J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 199(4): 407-423. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02119.x.

[26] QUINN C M, DURAN R M, AUDET G N, *et al*. Cardiovascular and thermoregulatory biomarkers of heat stroke severity in a conscious rat model[J]. J Appl Physiol (1985), 2014, 117(9): 971-978. DOI: 10.1152/japplphysiol.00365.2014.

[27] MARCHAND M, GIN K. The cardiovascular system in heat stroke[J]. CJC Open, 2022, 4(2): 158-163. DOI: 10.1016/j.cjco.2021.10.002.

[28] GONZÁLEZ-ALONSO J, CRANDALL C G, JOHNSON J M. The cardiovascular challenge of exercising in the heat[J]. J Physiol, 2008, 586(1): 45-53. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.142158.

[29] SCHLADER Z J, DAVIS M S, BOUCHAMA A. Biomarkers of heatstroke-induced organ injury and repair[J]. Exp Physiol, 2022, 107(10): 1159-1171. DOI: 10.1113/EP090142.

[30] NGUYEN B Y, RUIZ-VELASCO A, BUI T, *et al*. Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(22): 4302-4318. DOI: 10.1111/bph.14431.

[31] ESTAQUIER J, VALLETTE F, VAYSSIERE J L, *et al*. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 157-183. DOI: 10.1007/978-94-007-2869-1_7.

[32] BOCK F J, TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100. DOI: 10.1038/s41580-019-0173-8.

[33] CHRISTEN F, DESROSIERS V, DUPONT-CYR B A, *et al*. Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 116: 11-18. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.037.

[34] SLIMEN I B, NAJAR T, GHRAM A, *et al*. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review[J]. Int J Hyperthermia, 2014, 30(7): 513-523. DOI: 10.3109/02656736.2014.971446.

[35] PEOPLES J N, SARAF A, GHAZAL N, *et al*. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1-13. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7.

(**收稿**:2023-06-30;**修回**:2023-07-18)

(编辑 邓强庭)