

动物受热致死过程内毒素血症的研究

罗炳德 万为人 闫文生 张枫桐 华旭初 邹 飞 甄洪钧

摘 要 本文旨在探讨热暴露是否可引起兔内毒素 (LPS)血症并观察其生理反应及病理生理学变化。在干球温度 (42 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 湿球温度 (35 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (60 ± 5)% 条件下, 测定了24只热暴露兔的心率、平均动脉压、呼吸频率、肛温及血浆 LPS浓度等指标。结果: (1) 在动物热暴露过程中, 其血浆 LPS浓度明显增加, 临近死亡时, I、II组分别由实验前的 $0.139 \pm 0.131 \text{ ng/ml}$ 升高至 $0.285 \pm 0.249 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.01$); (2) 当 T_{r} 升至 43°C 左右时, I、II组动物的 HR MAP 分别达到或接近峰值水平, 而呼吸频率已开始下降, 此时血浆 LPS浓度与实验前相比, 已出现有意义的升高; (3) 中暑 LPS血症的发生与高温时内脏血流的减少和热的直接损伤有关。上述结果提示, LPS在中暑的病理生理学过程中是一个值得重视的因素。

关键词 热暴露 中暑 内毒素 LPS血症

A Study on Endotoxemia in Heatstroke-Causing Death in Animals Luo Bingde, Wan Weiren, Yan Wensheng, et al. Department of Tropical Medicine, The First Military Medical University. Guangzhou 510515

Abstract This paper aimed to study whether heat exposure could cause endotoxemia and its main physiological response and pathophysiological changes. Heart rate, arterial blood pressure, respiratory rate, rectal temperature and plasma level of lipopolysaccharide (LPS) were measured in 24 rabbits exposed to heat at an average dry bulb temperature of (42 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ wet bulb temperature of (35 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of (60 ± 5)%. Results showed that (1) plasma LPS level in rabbits increased obviously during their heat exposure and reached 0.285 and 0.249 ng/ml before death from 0.139 and 0.131 ng/ml before exposure for Groups I and II, respectively ($P < 0.01$); (2) as temperature rising to about 43°C , rabbits' heart rate and mean arterial blood pressure reached or approached to the peak, respiratory rate lowered, and plasma LPS concentration rose to a significant level, as compared with that before exposure both in Groups I and II; (3) occurrence of endotoxemia in heatstroke was due to decrease in animal's splanchnic blood flow and direct thermal damage. It suggested that LPS played an important role in pathophysiological process of heatstroke.

Key words Heat exposure, Heatstroke, Endotoxemia, Lipopolysaccharide

重症中暑是以体温过高、意识突然丧失、循环衰竭和广泛性组织损害与血管内凝血为其特征^[1,2]。上述多数特征与内毒素休克状态所伴随的症状相类似。目前, 国外学者认为内毒素血症在中暑的病理生理学过程中可能是一个起作用的因素^[3-6]。但详尽机理有待阐明,

而且国内在此方面尚乏研究。本文目的是探讨热暴露是否可引起兔内毒素血症, 观察其生理反应及其病理生理学变化, 为重症中暑防治寻找新的措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只新西兰兔, 雌雄各半, 体重 $2.18 \sim 3.11 \text{ kg}$ ($2.45 \pm 0.20 \text{ kg}$), 分为肛温 43°C 模型 (I组) 和肛温持续上升模型 (II组) 两组。

军队指令性课题资助项目

作者单位: 510515 广州 第一军医大学高温医学研究室

1. 2 生理指标测定

用日本产八导生理记录仪分别测定动物的心率 (HR)、肛温 (T_r)、平均动脉压 (MAP) 和呼吸频率 (R) 等。

1. 3 气象指标测定

用干球、湿球温度计分别测定干球温度 (T_d)、湿球温度 (T_w)，并以公式计算出相对湿度 (RH) 等气象指标。

1. 4 LPS测定方法

用鲎试剂微量检测法测定 LPS，所用试剂由上海临床医学检验所提供。

1. 4. 1 器材去热原处理 用于本检测试验在终止反应前，凡与鲎试剂接触物件均需去热原。玻璃器材清洗干净后要经 250°C 干热 2h 后方可使用；塑料制品清洗干净后在 30% 双氧水中浸泡 4h，再用无热原水冲洗后于 60°C 中烘干使用。

1. 4. 2 检测步骤 吸取 0. 1ml 样品与 0. 05ml 鲎试剂轻轻混匀，置于 37°C 水浴 25min，再加入 0. 05ml 鲎三肽，置于 37°C 水浴 3min，取出后加入 0. 5ml 亚硝酸钠溶液，混匀后加入 0. 5ml 氨基磺酸铵轻摇，最后加入 0. 5ml 萘乙二胺混匀，10min 后于波长 545nm 比色读数。计算公式： $\text{OD} = \text{OD}_s - (\text{OD}_b - \text{OD}_{bb})$ ，按该式求得 OD 值，再查对 LPS 标准曲线求得 LPS 含量，如果 OD 值超出曲线范围，可将试样稀

表 1 动物热暴露过程血浆 LPS 含量的变化均值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	热暴露 总时间 (min)	$T_r 43^{\circ}\text{C}$ 后持续时间 (min)	血浆 LPS 含量 (ng/ml)			
				实验前	$T_r 43^{\circ}\text{C}$ 时	死亡前	增加值
I	12	220 ± 43	135 ± 30	0.139 ± 0.020	0.195 ± 0.028	0.285 ± 0.032	0.146 ± 0.035
II	12	$120 \pm 12^{\blacktriangle}$	$6 \pm 13^{\blacktriangle}$	0.13 ± 0.018	$0.180 \pm 0.025^*$	0.249 ± 0.028	$0.118 \pm 0.032^{\blacktriangle}$

* 组内比较 $P < 0.05$, $\blacktriangle$ 组间比较 $P < 0.05$

2. 3 兔热暴露过程的生理指标变化值

2. 3. 1 T_r I、II 组动物分别在热暴露的 100 和 60min 时， T_r 从实验前的 40°C 逐渐升高而达到或接近 43°C 水平 (见表 2, 3)。此时立即降低 I 组动物的气象条件，以使 T_r 持续保持在

释后再测定。

1. 5 方法步骤

动物按常规先行手术，切开气管、股动脉分别予以插管，无菌采 1ml 耳动脉血样，然后移至人工微温度箱内，待动物安静后，记录各项指标 1 次，试验过程每隔 10min 记录 1 次，并于 $T_r 43^{\circ}\text{C}$ 和死亡前由股动脉插管采集血样各 1 次，立即离心 (500r/min , 10min)，然后将血浆储存于 -60°C 冰箱待测。

2 结果

2. 1 热暴露过程的气象条件

干球和湿球温度分别控制在 (42 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 和 (32 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 (60 ± 5)%。II 组动物在上述气象条件下持续受热至死亡 (为 T_r 持续上升模型)；而 I 组动物，当 T_r 达 43°C 时，立即调低气象条件，以使动物 T_r 维持在 43°C 的水平，继续受热至死亡 (为 $T_r 43^{\circ}\text{C}$ 模型)。

2. 2 热暴露过程兔血浆 LPS 含量变化值

表 1 结果显示，当动物 T_r 由实验前的 40°C 升高到 43°C 时，I、II 组兔血浆 LPS 浓度即明显升高，分别与实验前比， P 均小于 0.05。动物临死前则分别升达 0.285、0.249ng/ml。无论是峰值或增加值，I 组结果均高于 II 组。从而表明，热暴露过程动物血浆 LPS 水平与受热持续时间关系密切。

43°C 左右之水平。而 II 组动物的 T_r 持续升高，于热暴露 120min 时，即达 (44.2 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ ，尔后不久即死亡。结果表明，降低环境气象条件 (即控制动物的体温升高) 可使 I 组动物的热暴露时间明显长于 II 组。

表 2 I 组动物热暴露过程生理指标变化均值 ($\bar{x} \pm s$)

指标名称	时 间 过 程 (min)											
	Pre	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220
Tr(℃)	40.0±0.8	41.1±0.8	42.2±0.6	42.8±0.4	42.9±0.2	43.0±0.1	43.0±0.1	43.0±0.1	43.1±0.1	43.0±0.1	43.0±0.1	43.1±0.2
R(T/min)	17±101	22±157	31±138	33±116	28±131	23±110	22±92	18±92	15±81	15±58	16±113	5±55
HR(b/min)	249±43	257±59	271±51	328±47	342±47	345±47	346±40	333±30	318±79	315±31	293±30	189±104
MAP(kPa)	11.9±2.1	12.0±1.8	11.6±1.5	12.4±1.9	12.4±2.3	12.5±2.4	11.7±2.6	10.6±3.3	10.4±3.5	10.0±2.3	9.5±3.9	4.4±2.4

表 3 II 组动物热暴露过程生理指标变化均值 ($\bar{x} \pm s$)

指标名称	时 间 过 程 (min)							
	Pre	20	40	60	80	100	120	
Tr(℃)	40.1±0.8	41.3±0.6	42.2±0.5	42.9±0.5	43.5±0.5	43.9±0.6	44.2±0.5	
R(T/min)	97±47	140±88	292±190	281±162	197±81	145±27	50±45	
HR(b/min)	270±46	272±67	298±71	352±40	368±39	306±111	177±101	
MAP(kPa)	12.0±1.6	12.1±1.2	11.2±1.7	12.3±2.0	12.1±1.5	7.7±3.6	3.2±2.1	

2.3.2 HR 热暴露 40min 时,即 Tr 升至 42.2℃左右,I、II 组动物的平均 HR 分别由开始的 249、270b/min 逐渐增加到 271、298b/min (表 2,3)。此后一段时间内其增加比较明显。当 Tr 升到 43℃以上,即 I、II 组动物的热暴露时间分别为 120、80min 时,其平均 HR 分别增加到 346 和 368b/min 的最大值(与实验前相比,P 均小于 0.01)。之后,I 组的 HR 逐渐减慢,至热暴露 200min,临近低血压休克时,才快速降低直至死亡。而 II 组动物自热暴露 80min 后,其平均 HR 即呈现快速下降趋势,且持续受热时间明显短于 I 组动物。从而表明,动物 HR 明显加快阶段,恰值 Tr 接近 43℃(42.8~42.9℃),此时血浆 LPS 浓度已出现有意义的变化(见表 1)。

2.3.3 MAP 表 2 结果显示,I 组动物在热暴露 40min Tr 从实验前的 40℃升至 42.2℃时,MAP 略有下降,其值为 11.6kPa 而后渐升,至受热 100min,Tr43℃时 MAP 达 12.5kPa 的峰值水平。继之开始下降。在受热 200min 后,MAP 降至 9.5kPa,与实验前相比,P<0.05 其后 20min 内,MAP 突然下降到 4.4kPa,不久动物死亡。II 组动物的 MAP (表 3)

在受热 40min 时的变化规律与 I 组结果基本一致。热暴露 60min 后 Tr 升至 42.9℃,MAP 即达峰值水平〔(12.3±2.0)kPa〕,但其相对稳定时间较短。在受热 100min Tr43.9℃时,即出现低血压休克(MAP7.7kPa)。热暴露 120min Tr44.2℃时,MAP 降为 3.2kPa,P<0.01 结果提示,MAP 的这种降低与血浆中 LPS 浓度的升高(Tr43℃左右时,I、II 组血浆 LPS 水平分别升高为 0.195、0.180ng/ml;死前达最高值,即分别为 0.285、0.249ng/ml,与实验前相比,P 均小于 0.05)以及热暴露持续时间有关。

2.3.4 R I、II 组动物的 R 分别在热暴露的 60~40min 时,快速增加达到峰值水平,即 338~292次/min (见表 2,3)。但当 Tr 升至 43℃左右,即开始明显减慢直到死亡。由此可见,血浆 LPS 浓度之升高对动物 R 的影响比较明显。

3 讨论

表 2 结果显示,I、II 组动物死亡前其血浆 LPS 浓度分别升达 (0.285±0.032)、(0.249±0.028)ng/ml,该值与肠缺血致 LPS 血症研究中所观察到的峰值 LPS 水平相类似^[7]。故

从本文测得的 LPS 含量来看,中暑兔 LPS 血症是存在的。文献报道,当 T_{r} 高于 42°C 时,由于 MAP 的降低使得内脏血流的减少更为严重,加之热的直接损伤,则可进一步损害肠粘膜,也可能损害毛细血管内皮。这样就不可避免地使肠腔中的 LPS 入血增加。在肠壁损害的证据中,象肠壁的糜烂、肠粘膜溃疡、坏死和上皮细胞脱落等在热应激狗 T_{r} 达 $43.0\sim 44.5^{\circ}\text{C}$ 时均已被观察到^[8]。另一方面的实验研究表明,在 $T_{\text{r}}42\sim 43^{\circ}\text{C}$ 时肝脏组织遭到损害^[2],此时体循环血中 LPS 迅速上升,其原因可能是由于 LPS 进入门脉循环的速率增加超过了已遭损害的肝脏之解毒能力,使其不能再有效地从门脉循环中清除 LPS。同时观察到,中暑所造成的肝脏损害在其形态学上与循环中存在有细菌和 LPS 所致的肝脏损害极为相似^[9]。业已发现,在伴随有休克、败血症、无尿等复杂情况的中暑病人血浆中存在有高浓度的 LPS。

本文结果证实,受热兔血浆的 LPS 浓度的确是升高的,其升高可能会对动物的生理反应(表 2, 3)产生一定影响。因 LPS 不仅本身可引起体温升高,且同时还可促进一些内源性致热质,如肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)、白细胞介素-1(IL-1)等的合成与分泌^[10, 11]。它们之间的相互作用,无疑会使受热动物的体温更趋恶化。另一方面,动物体 LPS 含量之增加,亦会对组织器官产生直接的损害,故血浆 LPS 增加不但可加剧受热动物的生理反应,而且严重时还可使重要的组织器官发生病理性改变,此在有关的研究中已获证实^[2, 9]。

目前,有关中暑的病理生理学过程提出了两种不同观点,即外周机制与中枢机制。依据前者假说,Adolph 和 Fulton 认为,中暑是由最终导致休克的循环系统衰竭所引起;而 Malamud 等的中枢机制则认为,体温升高对靶器官

(组织),特别是对大脑体温调节中枢所造成的直接损伤,继之导致出汗及体温调节系统的衰竭,最终亦导致休克。依本文结果,我们认为循环(内脏血流降低)和热损伤(肠壁和肝脏)两种机制的结合共同作用,导致 LPS 血症,后者可加剧受热动物的生理反应并可造成其他组织器官的损伤,最终使其死亡。由此提示, LPS 在中暑的病理生理学过程中是一个起作用的值得重视的因素。为此,在中暑防治中,针对 LPS 的措施研究应予重视。

总之,动物在热暴露过程中,血浆 LPS 浓度是升高的,且达到影响其生理反应、病理生理学变化,最终导致动物死亡的较高水平。此可能与内脏血流的降低以及热的直接作用有关。

4 参考文献

- 1 Pankowski R, et al. A review of heatstroke. *Equine Prac*, 1984, 6: 44
- 2 Shih CJ, et al. Experimental study on the pathogenesis of heatstroke. *J Neurosurg*, 1984, 60: 1246
- 3 Gathiram P, et al. Prophylactic corticosteroid suppresses endotoxemia in heat-stressed primates. *Aviat Space Environ Med*, 1988, 59: 142
- 4 Gathiram P, et al. Prevention of endotoxemia by non-absorbable antibiotics in heat stress. *J Clin Pathol*, 1987, 40: 1364
- 5 Gathiram P, et al. Portal and Systemic Plasma lipopolysaccharide concentrations in heat-stressed primates. *Circ Shock*, 1988, 25: 223
- 6 Gathiram P, et al. Time course of endotoxemia and cardiovascular changes in heat-stressed primates. *Aviat Space Environ Med*, 1987, 58: 1071
- 7 Gathiram P, et al. Superior mesenteric artery occlusion shock in cats: modification of the endotoxemia by antilipopolysaccharide antibodies (Anti-LPS). *Circ Shock*, 1986, 19: 231
- 8 Bynum G, et al. An anesthetized dog heatstroke model. *J Appl Physiol*, 1977, 43: 292
- 9 Rubel LR, et al. The liver in fatal exertional heatstroke. *Liver*, 1983, 3: 249
- 10 Richard Brown. Is behavioural thermoregulation a factor in flea-to-human transmission of *Yersinia pestis*? *The Lancet*, 1995, 345 (8954): 931
- 11 Muyembe T, et al. Ebola haemorrhagic fever in Kikwit, Zaire. *The Lancet*, 1995, 345 (8962): 1448

(收稿: 1997-07-17 修回: 1998-01-25)