

# 热射病猪血管内皮细胞损伤的病理变化及相关黏附分子表达

胡玲玲<sup>1</sup>, 倪军<sup>2</sup>, 付刚<sup>2</sup>, 张静<sup>2</sup>

<https://doi.org/10.12307/2023.146>

投稿日期: 2022-03-03

采用日期: 2022-05-09

修回日期: 2022-07-05

在线日期: 2022-07-26

中图分类号:

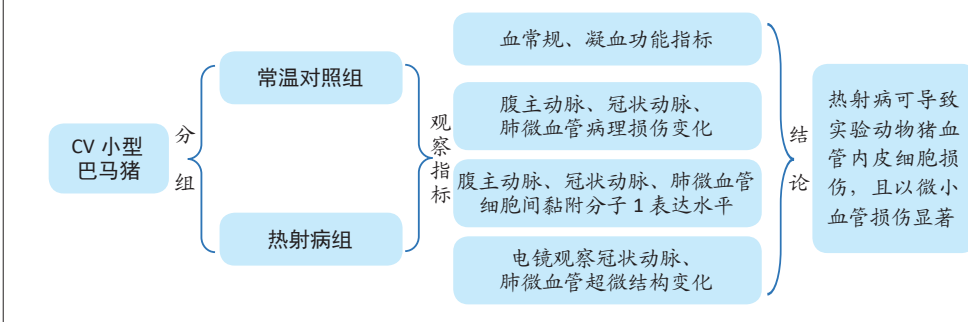
R459.9; R318; R363

文章编号:

2095-4344(2023)17-02644-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 热射病可导致小型猪血管内皮细胞损伤



文题释义:

**血管内皮细胞:** 分布在动脉、毛细血管和静脉壁的管腔内面, 具有多种不同的生理功能, 诸如增加血管通透性、舒张血管、增加白细胞外渗以及控制凝血和血栓形成的作用。在静息状态下, 完整的内皮细胞具有抗血栓作用, 而病理条件下刺激物可激活内皮细胞发挥促血栓形成的功能。血管内皮细胞通过抑制血栓的形成及控制血管炎症反应的进程, 从而维持血管平衡。

**细胞间黏附分子1:** 是免疫球蛋白超家族之一, 可在各类细胞表面表达, 广泛分布于细胞因子活化的内皮细胞及上皮细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞表面, 其中最主要表达于血管内皮细胞上, 是介导血管内皮细胞与白细胞黏附的最重要的黏附分子, 在炎症反应、血液凝固、免疫识别中发挥重要作用, 是反映血管内皮细胞损伤的特异性标志物之一。

摘要

**背景:** 热射病是一种死亡率极高的疾病, 是由高温引起的广泛内皮细胞损伤及多脏器功能衰竭的临床综合征, 常见的并发症是凝血功能异常, 而血管内皮病变在重度中暑引发的凝血功能紊乱中发挥关键作用。

**目的:** 观察热射病猪血管内皮细胞损伤的病理变化特点及相关黏附分子1的表达。

**方法:** 选取12只普通级健康雄性巴马小型猪, 体质量15~20 kg, 采用随机数字表法分为常温对照组及热射病组, 每组6只。热射病组建立高温高湿环境下重度中暑猪模型, 而常温对照组小猪置于恒温恒湿气候舱中。采集两组实验前、后静脉血, 检测血常规、凝血功能指标; 取相同部位的腹主动脉、冠状动脉、肺组织标本, 苏木精-伊红染色观察两组标本病理损伤变化; 采用免疫组织化学染色对比两组细胞间黏附分子1的表达水平; 高倍透射电子显微镜观察冠状动脉及肺组织超微结构变化。

**结果与结论:** ①常温对照组实验前、后活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、血浆D-二聚体、纤维蛋白原降解产物水平及红细胞、血小板计数比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ②热射病组实验后红细胞计数、活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、血浆D-二聚体、纤维蛋白原降解产物水平高于实验前, 且高于常温对照组; 血小板计数低于实验前, 且低于常温对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ③苏木精-伊红染色: 常温对照组腹主动脉、冠状动脉、肺微血管组织病理结构正常; 热射病组腹主动脉内皮细胞轻度水肿, 未见明显异常; 冠状动脉可见血栓形成、内皮细胞脱落、坏死, 数量减少; 肺微血管弥漫性出血、内皮细胞数量明显减少; ④免疫组织化学染色结果显示: 常温对照组腹主动脉、冠状动脉、肺组织观察到内皮细胞浆膜上有数量较多、呈棕黄色线状的细胞间黏附分子1阳性表达; 热射病组内皮细胞浆膜上染色数量明显减少, 或表达缺如, 呈浅黄色的细胞间黏附分子1弱阳性表达; 热射病组血管组织中细胞间黏附分子1平均吸光度值低于常温对照组( $P < 0.05$ ); ⑤电镜观察超微结构: 热射病组冠状动脉组织可见细胞核形状不规则, 线粒体肿胀; 热射病组肺组织可见少量细胞核及线粒体肿胀; ⑥提示热射病可导致小型猪血管内皮细胞损伤, 且以微小血管损伤表现显著。

**关键词:** 热射病; 血管内皮细胞损伤; 细胞间黏附分子1; 凝血功能

**缩略语:** 细胞间黏附分子1: intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1

## Pathological changes and expression of related adhesion molecules in vascular endothelial cell injury in heatstroke pigs

Hu Lingling<sup>1</sup>, Ni Jun<sup>2</sup>, Fu Gang<sup>2</sup>, Zhang Jing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China; <sup>2</sup>The 83<sup>rd</sup> Army Hospital of Chinese PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China

<sup>1</sup>新乡医学院研究生处, 河南省新乡市 453000; <sup>2</sup>中国人民解放军陆军第八十三集团军医院, 河南省新乡市 453000

**第一作者:** 胡玲玲, 女, 1993年生, 新乡医学院临床学院在读硕士, 主要从事内分泌学方面的研究。

**通讯作者:** 倪军, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 中国人民解放军陆军第八十三集团军医院, 河南省新乡市 453000

**并列通讯作者:** 付刚, 副主任医师, 中国人民解放军陆军第八十三集团军医院, 河南省新乡市 453000

<https://orcid.org/0000-0002-1858-1048> (胡玲玲)

**基金资助:** 军队后勤科研计划项目(CJ20J026), 项目负责人: 倪军

**引用本文:** 胡玲玲, 倪军, 付刚, 张静. 热射病猪血管内皮细胞损伤的病理变化及相关黏附分子表达 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(17):2644-2650.



Hu Lingling, Master candidate, Graduate School, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan Province, China

**Corresponding author:** Ni Jun, Master, Associate chief physician, Master's supervisor, The 83<sup>rd</sup> Army Hospital of Chinese PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China

**Co-corresponding author:** Fu Gang, Associate chief physician, The 83<sup>rd</sup> Army Hospital of Chinese PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Heatstroke is a highly fatal syndrome characterized by extensive endothelial cell injury and multiple organ failure caused by high temperature. The common complication is abnormal coagulation function, and vascular endothelial disease plays a key role in the coagulation disorder caused by severe heatstroke.

**OBJECTIVE:** To observe the pathological changes of vascular endothelial cell injury in severe heatstroke pigs and the expression of intercellular cell adhesion molecule-1.

**METHODS:** Twelve healthy male Bama miniature pigs (conventional animals) weighing 15–20 kg were randomly divided into normal temperature control group ( $n=6$ ) and heatstroke group ( $n=6$ ). Severe heatstroke pig model was made in the heatstroke group under high temperature and humidity environment. The pigs in the normal temperature control group were placed in a constant temperature humidity chamber. Venous blood samples before and after the experiment was collected for blood routine and coagulation function examinations in the two groups. The abdominal aorta, coronary artery and lung tissue samples at the same position were taken, and the pathological changes of the samples in the two groups were observed by hematoxylin-eosin staining. Immunohistochemical staining was used to observe the level of intercellular adhesion molecule-1 in the two groups. The ultrastructural changes of the coronary artery and lung were observed by high-power transmission electron microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There were no significant changes in activated partial thromboplastin time, prothrombin time, plasma D-dimer, fibrinogen degradation product level and red blood cell and platelet counts in the normal temperature control group before and after the experiment ( $P > 0.05$ ). The red blood cell count, activated partial thromboplastin time, prothrombin time, plasma D-dimer and fibrinogen degradation products in the heatstroke group increased significantly after the experiment and were higher than those in the normal temperature control group. Whereas, the platelet count decreased in the heatstroke group after the experimental and was significantly lower than that in the normal temperature control group ( $P < 0.05$ ). Hematoxylin-eosin staining revealed that the pathological structure of abdominal aorta, coronary artery and pulmonary microvessels in the normal temperature control group was normal. Abdominal aortic endothelial cells in the heatstroke group were slightly edematous without obvious abnormalities; thrombosis, endothelial cell abscission, and necrosis were observed in the coronary artery, and the cell number decreased; and pulmonary microvascular diffuse hemorrhage and the number of endothelial cells decreased significantly. Immunohistochemical staining showed that the positive expression of intercellular adhesion molecule-1 with a large number of brownish yellow lines on the serosa of endothelial cells was observed in the abdominal aorta, coronary artery and lung of normal temperature control group; the number of endothelial cells on the serosa decreased significantly or the expression was absent and the light yellow intercellular adhesion molecule-1 was weakly positive in the heatstroke group; the average absorbance value of intercellular adhesion molecule-1 in vascular tissue in the heatstroke group was significantly lower than that in the normal temperature control group ( $P < 0.05$ ). Under the electron microscope, irregular nuclei and swollen mitochondria were observed in coronary artery tissue in the heatstroke group, as well as a small amount of swollen nuclei and mitochondria observed in the lung tissue. To conclude, heatstroke can cause an injury to vascular endothelial cells, especially microvascular injury, in miniature pigs.

**Key words:** heatstroke; vascular endothelial cell injury; intercellular adhesion molecule-1; coagulation function

**Funding:** Military Logistics Scientific Research Project, No. CLJ20J026 (to NJ)

**How to cite this article:** HU LL, NI J, FU G, ZHANG J. Pathological changes and expression of related adhesion molecules in vascular endothelial cell injury in heatstroke pigs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(17):2644-2650.

## 0 引言 Introduction

热射病是指高温高湿环境或剧烈活动下体内产热与散热失衡导致中枢神经系统异常的热相关性致命疾病，死亡率极高，易引起全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭，如神经功能缺损、心血管衰竭、肝衰竭和肾衰竭<sup>[1-5]</sup>。凝血功能障碍是热射病的常见并发症，严重时发展为弥散性血管内凝血，是热射病死亡的主要危险因素之一<sup>[6]</sup>。中暑导致凝血功能异常的机制主要包括炎症反应、内皮细胞损伤、血液浓缩学说、肝功能损伤、热休克蛋白水平变化<sup>[7]</sup>。由于内皮细胞不是分离血液和实质细胞的简单屏障，而是调节氧合、运输、通透性和血栓形成的重要界面，因此内皮病变在热射病引发的凝血功能障碍的发展中发挥关键作用，且是热射病相关的凝血功能障碍病理生理学的最重要特征<sup>[8-9]</sup>。细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是血管内皮细胞分泌的，同时也是血管内皮细胞损伤的特异性标志物<sup>[10]</sup>。目前国内外关于高温高湿环境下重度中暑相关血管内皮细胞损伤的研究多以鼠、兔或狒狒为模型<sup>[11]</sup>，上述模型受限于体型较小难以实施临床干预治疗或费用高昂不利于实验重复性。小型动物虽具有研究病理生理如炎症反应等机制方面的优势性，但由于物种间的差异，从小型实验动物中获得数据无法可靠地预测人类的反应。相关研究表明，小型巴马猪与人的体温调节及血液循环系统具有较好的相似性，且价格低

廉、容易获取易操作<sup>[12]</sup>，遗传特点与人类更为接近，因而此次研究在中国人民解放军陆军第八十三集团军医院恒温恒湿气候舱中建立小猪重度中暑模型的基础上，分析热射病猪血管内皮细胞损伤功能变化及相应特点，以期临床中加强热射病血管内皮细胞损伤的保护及早期抗凝提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验，两组间比较采用  $t$  检验。

**1.2 时间及地点** 实验于2019年8–10月及2021年6–11月在中国人民解放军陆军第八十三集团军医院血液内分泌科实验室完成。

**1.3 材料**

**1.3.1 实验动物** 由于雌激素对于耐热性和中暑相关器官损伤有明确的作用<sup>[13]</sup>，为避免对实验的影响，随机选取12头健康雄性巴马小型猪，普通级小型猪(CV)级别，体质量15–20 kg，四五月龄，由江苏亚东实验动物研究院有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK(苏)2016-0009。所有涉及动物的实验方案均由中国人民解放军陆军第八十三集团军医院动物实验伦理委员会审查和批准，且根据国家科学委员会的指导方针进行，审批编号：83yy2020-2-1。

小猪(1只/笼)被饲养于陆军第八十三集团军医院动物实验隔离中心2周，室内无特定病原体，温度设定在22–25℃，

湿度 45%–55%，并提供普通猪饲料、饮用水，允许自由进食水，连续 2 周固定时间内监测小猪的生理体温为 38–39 ℃。所有动物均无感染和寄生虫，同时检查全血细胞计数、凝血功能、肝肾功能均未见明显异常<sup>[14]</sup>。

**1.3.2 主要仪器及试剂** 盐酸艾司氯胺酮注射液 (江苏恒瑞医药股份有限公司，批号：210813BL)；罗库溴胺注射液 (浙江仙琚制药股份有限公司)；丙泊酚乳状注射液 (西安力邦制药有限公司，批号：22109152-2)；枸橼酸舒芬太尼注射液 (宜昌人福药业有限责任公司，批号：01B12011)；猪 ICAM-1 多克隆抗体免疫组织化学一抗试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司，货号：PAA548Po01)；兔二步法二抗试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司，货号：PV-6001)；苏木精-伊红染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司，货号：G1120)。改良型 F800-Z 恒温恒湿气候舱 (广州富宸电器有限公司)；全自动凝血分析仪 (美国贝克曼库尔特有限公司)；高灵敏度电子体温计、多参数心电监护仪 (湖南省瑞博科技有限公司，型号：PM-9000A)；数码医学图文分析系统 (厦门麦克奥迪销售有限公司；型号：Motic Med6.0)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 动物分组及模型** 根据作者所在课题组前期高温高湿环境下重度中暑猪模型的建立<sup>[12]</sup>，小猪直肠核心温度达到 42 ℃ 则视为造模成功。采用随机数字表法将 12 头 CV 级健康雄性巴马小型猪分成常温对照组、热射病组，每组 6 头。禁食水 12 h 后开始实验，为减轻动物实验过程中的痛苦，实验开始前于臀部肌肉注射 15 mg/kg 盐酸氯胺酮麻醉小猪，10 min 后麻醉生效，放置侧卧位，于小猪的右侧股动脉处通过股骨切口无菌放置 24G 静脉留置针，连接压力传感器，实时监测有创动脉压。行气管插管连接呼吸机辅助呼吸，通过颈内静脉切口无菌放置中心静脉导管，用于麻药和采取血样，整个实验过程中持续静脉输注罗库溴胺、丙泊酚及枸橼酸舒芬太尼联合麻醉诱导，同时耳缘静脉处输注 5 mL/(kg·h) 葡萄糖生理盐水，防止脱水和低血糖。将 5 个电极片连接到小猪腹部，将高灵敏度电子体温计插入肛门中。所有热射病组小猪均通过压力传感器与多参数心电监护仪监测生命体征，待生命体征稳定后，移置于预热的恒温恒湿气候舱，设定温度 44–47 ℃，相对湿度 (65±5)%；而常温对照组小猪置于恒温恒湿气候舱中，保持在 35–37 ℃，相对湿度 (65±5)%。

整个实验过程中密切观察小猪的生命体征变化。热射病组小猪在持续性热暴露下核心温度 > 42 ℃ 符合重度中暑诊断标准，即实验结束，将动物从恒温恒湿气候舱中移出。随后采集外周血送检血清血常规、凝血功能、肝肾功能；同时取腹主动脉、冠状动脉及肺组织行病理苏木精-伊红染色和透射电镜观察，分别由陆军第八十三集团军医院检验科及病理科检测分析并拍照。严格按照实验要求进行筛选入组，淘汰实验过程中死亡及热射病组核心体温 < 42 ℃ 的动物，以确保各组纳入分析的动物数量 ≥ 5 只。

#### 组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	观察热射病猪血管内皮细胞损伤的病理变化特点及细胞间黏附分子 1(ICAM-1) 的表达
选择动物的条件	体质量 15–20 kg，四五月龄，健康雄性
模型与所研究疾病的关系	通过建立高温高湿环境下重度中暑猪模型，模拟人类热射病时的状态，才能进一步观察各组织血管内皮细胞损伤的病理变化特点及黏附分子表达
动物来源及品系	巴马小型猪由江苏亚东实验动物研究院有限公司提供
造模技术描述	实验过程中麻醉诱导小型猪，将高灵敏度电子体温计插入肛门中。热射病组小猪生命体征稳定后，移置于恒温恒湿气候舱，设定温度 44–47 ℃，相对湿度 (65±5)%；而常温对照组小猪置于恒温恒湿气候舱中，保持在 35–37 ℃，相对湿度 (65±5)%；实验观察时间 4 h 左右。热射病组小猪在持续性热暴露下核心温度 > 42 ℃ 符合重度中暑诊断标准，即实验结束，将动物从恒温恒湿气候舱中移出
动物数量及分组方法	12 头小型猪按随机数字表法分为常温对照组及热射病组，每组 6 头
造模成功评价指标	参考作者所在课题组前期高温高湿环境下重度中暑猪模型的建立，小猪直肠核心温度达到 42 ℃ 认为造模成功
造模后观察指标	① 血常规、凝血功能指标分析；② 腹主动脉、冠状动脉、肺微血管组织切片观察病理特点；③ 腹主动脉、冠状动脉及肺微血管 ICAM-1 表达水平；④ 电镜观察腹主动脉、冠状动脉及肺微血管超微结构变化
造模后动物处理	造模结束后将麻醉的实验动物给予安乐死，取腹主动脉、冠状动脉、肺微血管进行相关指标观察
伦理委员会批准	实验经陆军第八十三集团军医院实验动物伦理委员会批准，批准号：83yy2020-2-1

#### 1.4.2 取材及样本检测

(1) 血清血常规、凝血功能检测：实验结束后，于颈内静脉处采集血液，取 3 mL 血样本放于柠檬酸钠管中，采用全自动凝血分析仪检测凝血功能指标，血常规检测于全自动血细胞分析仪上进行。

(2) 苏木精-伊红染色光镜观察：所有动物在实验结束后自发死亡或深度麻醉处死后立即进行解剖，无菌操作下分离并切取适当大小腹主动脉、冠状动脉、肺微血管组织，生理盐水冲洗后放入新鲜配制体积分数 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h，进行石蜡包埋和切片，切片厚度约 4 μm，苏木精-伊红染色后光镜下观察腹主动脉、冠状动脉、肺微血管病理变化，数码医学图文分析系统采图。

(3) 免疫组织化学观察 ICAM-1 的表达水平：取相同部位腹主动脉、冠状动脉、肺组织用体积分数 10% 中性甲醛溶液固定 24 h，常规行乙醇脱水、透明、石蜡包埋，切片 4 μm。经烘片、脱蜡至水、枸橼酸钠抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、一抗孵育 (一抗按 1 : 200 用 3% 非免疫血清的 PBS 稀释浓度为 5 mg/L，4 ℃ 孵育过夜，后于 37 ℃ 孵育 1 h 复温，用 PBS 冲洗 3 次，3 min/次)、二抗孵育 (滴加 100 μL 二抗工作液，工作液可直接使用，不用稀释，37 ℃ 孵育 30 min，后 PBS 冲洗 3 次，3 min/次)，DAB 显色 (室温



孵育 3 min), 复染, 脱水、透明、封固后, 显微镜观察拍照, 阳性染色为细胞膜或胞浆棕色颗粒。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析出各组的平均吸光度值。

(4) 切取冠状动脉、肺组织大小约 1.5 mm×1.5 mm 血管组织条, 立即放入新鲜配制的 2.5% 的戊二醛中, 将固定后的各血管组织送中国人民解放军陆军第八十三集团军医院病理科, 经四氧化锇固定、梯度脱水、Epon812 包埋及聚合后, 做 70 nm 超薄切片, 经醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色各 10 min, 用高倍透射电子显微镜观察冠状动脉及肺组织超微结构变化, 拍照并进行分析。

1.5 主要观察指标 ①采集两组实验前、后颈内静脉血样本, 检测凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、血浆 D-二聚体、纤维蛋白原降解产物、血小板计数; ②采用苏木精-伊红染色法观察两组腹主动脉、冠状动脉及肺微血管病理损伤变化; ③采用免疫组织化学法观察两组腹主动脉、冠状动脉及肺微血管的 ICAM-1 表达水平; ④采用高倍透射电子显微镜观察冠状动脉及肺微血管组织的超微结构变化。

1.6 统计学分析 所有数据应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用两独立样本的  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。文章统计学方法已经陆军第八十三集团军医院统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验中 12 头猪随机分为 2 组, 每组 6 头, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 两组小型猪实验前后凝血功能指标的变化 常温对照组实验前、后活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、血浆 D-二聚体、纤维蛋白原降解产物水平及红细胞、血小板计数比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。热射病组实验后红细胞计数、活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、血浆 D-二聚体、纤维蛋白原降解产物水平高于实验前, 且高于常温对照组; 血小板计数低于实验前, 且低于常温对照组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1-4。

表 1 | 两组小型猪实验前、后红细胞及血小板计数结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Table 1 | Comparison of red blood cell and platelet counts between the two groups before and after the experiment

组别	红细胞 ( $\times 10^{12} L^{-1}$ )				血小板 ( $\times 10^9 L^{-1}$ )			
	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值
常温对照组	5.73±0.27	5.96±0.32	0.951	> 0.05	578±42	567±36	0.344	> 0.05
热射病组	6.12±0.35	9.36±0.53	8.836	< 0.05	580±45	472±34	3.317	< 0.05
$t$ 值	1.528	9.512			0.056	3.323		
$P$ 值	> 0.05	< 0.05			> 0.05	< 0.05		

2.3 苏木精-伊红染色光镜观察结果 光镜下观察常温对照组腹主动脉组织结构正常; 热射病组腹主动脉结构轻度异常, 动脉壁痉挛、弹力纤维痉挛且明显收缩, 内皮细胞轻度水肿, 无变性、坏死、炎症细胞浸润, 见图 1。

光镜下观察常温对照组冠状动脉组织结构正常; 热射病

表 2 | 两组小型猪实验前、后凝血酶原时间比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ,  $s$ )  
Table 2 | Comparison of prothrombin time between the two groups before and after the experiment

组别	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值
常温对照组	9.05±1.34	10.27±1.52	1.043	> 0.05
热射病组	11.50±1.63	17.50±2.36	3.263	< 0.05
$t$ 值	2.011	4.461		
$P$ 值	> 0.05	< 0.05		

表 3 | 两组小型猪实验前、后活化部分凝血酶原时间比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ,  $s$ )  
Table 3 | Comparison of activated partial prothrombin time between the two groups before and after the experiment

组别	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值
常温对照组	11.25±1.46	13.21±2.75	1.090	> 0.05
热射病组	13.26±2.56	21.50±3.68	3.184	< 0.05
$t$ 值	1.181	3.216		
$P$ 值	> 0.05	< 0.05		

表 4 | 两组小型猪实验前、后 D-二聚体及纤维蛋白原降解产物水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Table 4 | Comparison of D-dimer and fibrinogen degradation products between the two groups before and after the experiment

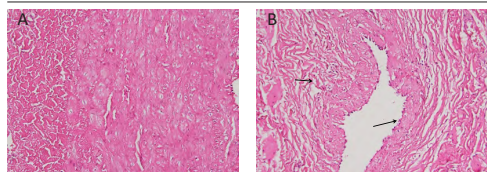
组别	血浆 D-二聚体 (mg/L)				纤维蛋白原降解产物 (mg/L)			
	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值	实验前	实验后	$t$ 值	$P$ 值
常温对照组	0.024±0.008	0.027±0.010	0.656	> 0.05	1.23±0.19	1.24±0.21	0.061	> 0.05
热射病组	0.025±0.006	0.587±0.081	11.985	< 0.05	1.25±0.56	2.85±0.26	8.344	< 0.05
$t$ 值	0.467	11.884			0.122	8.292		
$P$ 值	> 0.05	< 0.05			> 0.05	< 0.05		

组冠状动脉结构异常, 冠脉壁痉挛、弹力纤维痉挛且明显收缩, 周围有细胞水肿, 滋养血管扩张出血、伴周围大片出血, 内皮细胞数量较少, 平滑肌层紊乱、断裂, 未见明显炎症细胞浸润, 见图 2。

光镜下观察常温对照组肺组织结构正常; 热射病组肺组织结构明显异常, 肺泡壁毛细血管扩张出血, 多数小血管充血, 可见大片出血, 腔内有大量空泡形成, 肺间隔增厚, 小血管内蛋白血栓形成, 肺泡内、肺间质出现弥漫性出血, 伴少量炎症细胞浸润, 管腔内皮细胞数量明显减少、脱落、坏死, 图 3。

2.4 各血管组织中 ICAM-1 的表达 常温对照组腹主动脉、冠状动脉及肺组织 ICAM-1 呈阳性表达, 较多的内皮细胞浆膜染色, 呈深棕色颗粒状, 甚至为连续的深棕色线状; 热射病组 ICAM-1 弱阳性表达, 仅有少量内皮细胞的细胞浆膜染色, 甚至表达缺如, 呈浅黄色。热射病组 ICAM-1 阳性细胞平均吸光度值低于常温对照组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4-9。

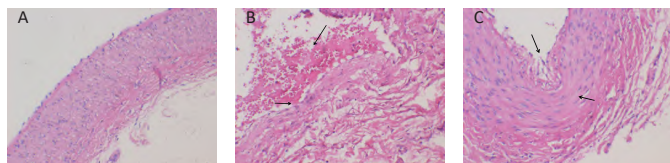
2.5 电镜观察冠状动脉、肺组织超微结构变化 透射电镜观察热射病组冠状动脉超微结构: 可见少量细胞核, 形态不一, 细胞质中可见细肌丝, 密体及细胞膜旁的密斑, 可见线粒体肿胀; 肺组织可见细胞核形状不规则, 线粒体肿胀, 也有线粒体空泡变性和结构完整线粒体, 毛细血管内皮与肺泡壁平行排列, 肺泡隔清晰可见, 见图 10。



图注：图 A 示常温对照组腹主动脉组织结构正常；图 B 可见热射病组腹主动脉组织结构轻度异常，动脉壁痉挛、弹力纤维痉挛且明显收缩（箭头所示），内皮细胞轻度水肿变性

图 1 | 两组小型猪腹主动脉光镜观察组织形态（苏木精-伊红染色， $\times 200$ ）

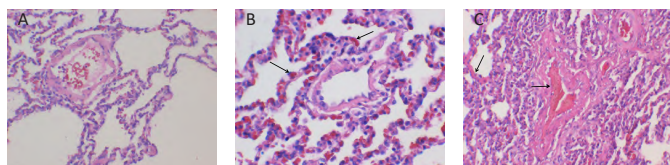
Figure 1 | Histomorphology of the abdominal aorta in miniature pigs under light microscope (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )



图注：图 A 示常温对照组冠状动脉组织结构正常；图 B 可见热射病组冠状动脉结构异常，冠脉壁、弹力纤维痉挛且明显收缩，早期纤维蛋白血栓形成，内皮细胞变性、坏死、脱落（箭头所示）；图 C 示热射病组冠状动脉结构异常，冠脉壁、弹力纤维痉挛且明显收缩、血管内皮细胞变性、坏死、脱落（箭头所示）

图 2 | 两组小型猪冠状动脉光镜组织形态（苏木精-伊红染色， $\times 200$ ）

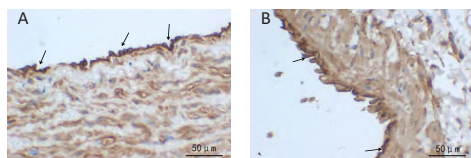
Figure 2 | Histomorphology of the coronary artery in miniature pigs under light microscope (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )



图注：图 A 示常温对照组肺组织结构正常；图 B 可见热射病组肺泡壁毛细血管扩张充血（箭头所示）；图 C 示热射病组肺组织血管内皮细胞数量明显减少、微小血管内有蛋白血栓形成（箭头所示）

图 3 | 两组小型猪肺组织光镜观察组织形态（苏木精-伊红染色， $\times 200$ ）

Figure 3 | Histomorphology of the lung in miniature pigs under light microscope (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )



图注：图 A 可见常温对照组腹主动脉 ICAM-1 呈阳性表达，较多的内皮细胞浆膜染色，甚至为连续的深棕色线状（箭头所示）；图 B 可见热射病组有少量内皮细胞的细胞浆膜染色，呈浅黄色（箭头所示）

图 4 | 两组小型猪腹主动脉组织中细胞间黏附分子 1(ICAM-1) 表达情况（免疫组织化学染色， $\times 400$ ）

Figure 4 | Interleukin cell adhesion molecule-1 expression in the abdominal aorta of miniature pigs (immunohistochemistry,  $\times 400$ )

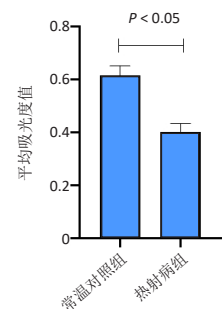
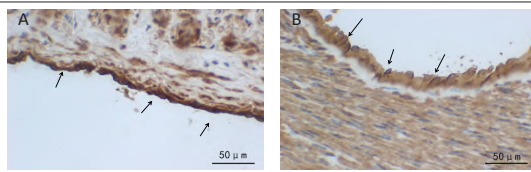


图 5 | 两组小型猪腹主动脉组织中细胞间黏附分子 1 表达水平比较

Figure 5 | The expression level of intercellular cell adhesion molecule-1 in the abdominal aorta of the two groups



图注：图 A 可见常温对照组冠状动脉 ICAM-1 呈阳性表达，数量较多的内皮细胞浆膜染色，甚至为连续的深棕色线状（箭头所示）；图 B 可见热射病组有少量内皮细胞的细胞浆膜染色，甚至表达缺如，呈浅黄色（箭头所示）

图 6 | 两组小型猪冠状动脉组织中细胞间黏附分子 1(ICAM-1) 表达情况（免疫组织化学染色， $\times 400$ ）

Figure 6 | Interleukin cell adhesion molecule-1 expression in the coronary artery of miniature pigs (immunohistochemistry,  $\times 400$ )

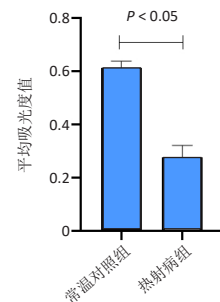
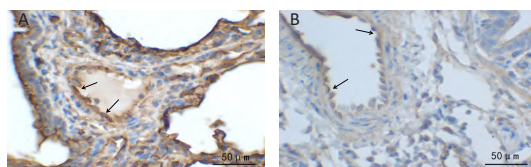


图 7 | 两组小型猪冠状动脉组织中细胞间黏附分子 1 表达水平比较

Figure 7 | Comparison of intercellular cell adhesion molecule-1 expression in the coronary artery of miniature pigs between the two groups



图注：图 A 可见常温对照组肺组织 ICAM-1 呈阳性表达，数量较多的内皮细胞浆膜染色，呈深棕色颗粒状（箭头所示）；图 B 可见热射病组有少量内皮细胞的细胞浆膜染色，甚至表达缺如，呈浅黄色（箭头所示）

图 8 | 两组小型猪肺组织中细胞间黏附分子 1(ICAM-1) 表达情况（免疫组织化学染色， $\times 400$ ）

Figure 8 | Interleukin cell adhesion molecule-1 expression in lung tissue of miniature pigs (immunohistochemistry,  $\times 400$ )

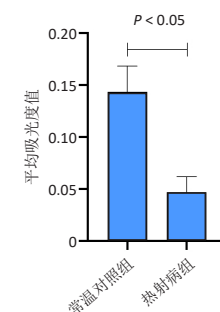
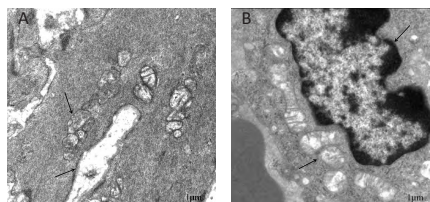


图 9 | 两组小型猪肺组织中细胞间黏附分子 1 表达水平比较

Figure 9 | Comparison of intercellular cell adhesion molecule-1 expression in lung tissues of miniature pigs between the two groups



图注：图 A 可见冠状动脉少量细胞核，形态不一，线粒体肿胀（箭头所示）；图 B 可见肺组织细胞核形状不规则，线粒体肿胀（箭头所示）

图 10 | 热射病组小型猪冠状动脉及肺组织超微结构变化（透射电镜， $\times 15\ 000$ ）

Figure 10 | Ultrastructural changes of the coronary artery and lung tissue of heatstroke miniature pigs (transmission electron microscope,  $\times 15\ 000$ )



### 3 讨论 Discussion

热射病是由高温引起的宿主应激功能障碍、广泛内皮损伤以及多器官功能衰竭的临床综合征。据文献报道,中暑的病死率为10%–15%,一旦病情加重发展至热射病,病死率可超过40%<sup>[15]</sup>。热射病可导致多器官功能障碍,甚至弥散性血管内凝血,这是最严重的并发症之一。研究表明,热射病时弥散性血管内凝血的发病率可达32.1%–48.0%,而热射病合并弥散性血管内凝血的死亡率更高,且弥散性血管内凝血是热射病患者死亡率增加的独立危险因素<sup>[16–18]</sup>。大量的动物实验研究表明,热射病时引起多脏器功能衰竭、弥散性血管内凝血的可能原因包括全身炎症因子的活化、广泛出血和血栓形成、广泛血管内皮细胞损伤,以上病理变化均作用于血管内皮细胞<sup>[19]</sup>。已有研究显示,在极端的热应激情况下可直接导致内皮细胞损伤<sup>[20]</sup>。血管内皮细胞受到损伤后,使内皮下胶原纤维暴露,激活凝血因子XII,进而激活纤维蛋白原形成纤维蛋白血栓,导致内源性凝血功能障碍<sup>[21]</sup>;同时内膜损伤后内皮细胞释放组织因子,激活凝血因子VII,导致外源性凝血功能障碍<sup>[7]</sup>。

此次实验中热射病组的小型猪凝血功能指标明显异常,即凝血酶原时间延长、部分活化凝血酶时间延长、D-二聚体增加、血小板计数明显降低。凝血过程中消耗大量凝血因子和血小板,造成凝血酶生成障碍,纤维蛋白溶解系统激活,继而引起纤维蛋白溶解亢进,同时血小板数量降低,这些均提示机体可能发生弥散性血管内凝血等一系列临床表现,进而导致多脏器功能衰竭。实验动物猪在实验过程中虽未观察到黏膜出血等临床表现,但凝血指标异常也提示实验动物中暑早期即出现凝血功能障碍,随着病程的延长,凝血指标的异常预示着发生弥散性血管内凝血的风险增加,此次实验与国内外其他实验动物观察到的凝血指标变化结果一致<sup>[22–23]</sup>。ROBERTS等<sup>[24]</sup>在中暑的狒狒模型中发现,热射病会导致包括肠道、肾脏和肺在内的多个部位内皮细胞结构和功能改变,且中暑时血管内皮细胞和凝血途径之间存在活跃的体内交互作用。周仁鸥<sup>[25]</sup>对沙漠干热环境中暑大鼠模型进行研究发现,各中暑阶段中,肝脏血管内皮细胞均出现损害,而热射病时,热应激可诱导明显的肝血管窦内皮细胞损伤、严重的肝脏微循环障碍,以及肝血管窦内皮细胞上血栓相关标志物的表达。刘亚楠等<sup>[26]</sup>研究观察到,中暑时肺微血管内皮细胞凋亡,肺间隙增宽,肺间质血管显著扩张充血,肺泡上皮细胞损伤、脱落致肺泡结构紊乱,整个热打击过程中肺组织病变存在进行性加重。周仁鸥等<sup>[27]</sup>研究显示,中暑时肾组织呈现出血管扩张充血、血栓形成、出血、蛋白管型、内皮细胞损伤等病理学变化,且以热射病阶段损伤最严重。而此次研究通过高温高湿环境模拟制作热射病模型,在持续高温状态下观察各血管标本,发现热射病组中腹主动脉出现轻度损伤,而冠状动脉及肺组织出现明显重度损伤,以肺微血管病变尤其显著;腹主动脉中动脉壁及弹力纤维痉挛且明显收缩,内皮细胞轻度水肿、无坏死、脱落;冠状动脉中冠脉壁及弹力纤维

痉挛且明显收缩,周围有细胞水肿,滋养血管扩张出血、伴周围大片出血,内皮细胞数量减少,平滑肌层紊乱、断裂、水肿、黏液样变性,未见炎性细胞浸润。肺微血管肺泡内、肺间质弥漫性出血,中小静脉广泛的微血栓形成,腔内有大量空泡形成,肺间隔增宽,小血管蛋白血栓形成且周围伴少量炎性细胞浸润,管腔内皮细胞数量明显减少、坏死。此次研究结果表明,随着热打击的时间延长及中暑强度的加重,机体的大中小血管都存在不同程度的内皮损伤,这提示内皮细胞的损伤可能会诱发热射病早期的凝血功能障碍进而导致弥散性血管内凝血的形成。

ICAM-1是一种位于细胞膜表面的黏附蛋白,表达于白细胞、内皮细胞等,尤其在血管内皮细胞中表达最高,主要的作用是在炎症过程中介导白细胞与内皮细胞的黏附和聚集,并引导白细胞穿过血管壁<sup>[28–29]</sup>。一系列的细胞系和动物模型的研究表明,高温产生的热细胞毒性作用可直接导致组织损伤和细胞死亡<sup>[28–29]</sup>。研究显示,当动物处于41.8℃热打击的情况下,正常细胞在高温下缺氧出现损伤效应,而极端温度(49–50℃)会对大多数细胞结构及其功能造成损害,导致细胞在不到5 min内坏死,丧失分子生物学活性<sup>[24, 30]</sup>。根据此次实验免疫组织化学染色结果观察到热射病组中腹主动脉、冠状动脉及肺组织的ICAM-1与常温对照组相比呈现低水平表达,差异有显著性意义,提示中暑对于大血管、中小血管及微循环在蛋白分子水平上均损伤显著。中暑类似于“类脓毒症反应”,可造成多器官功能衰竭<sup>[31]</sup>。谢敏崇等<sup>[32]</sup>、汤文等<sup>[33]</sup>在脓毒症模型中研究发现,脓毒症促使机体释放大量的炎性递质,使肺组织中ICAM-1高水平表达,引起内皮细胞与中性粒细胞之间相互黏附,进而导致细胞损伤,诱发多器官功能障碍综合征。该结果与此次实验结果相反,考虑可能与病理模型差异性相关;通过光镜观察到热射病组冠状动脉及肺组织中内皮细胞存在明显脱落、坏死,内皮细胞数目减少,未见明显的炎症细胞浸润,提示在热射病急性反应期炎症递质作用并不明显,而高温热打击在组织损伤中起关键性作用。

热射病时大、中、微小血管内皮细胞损伤的超微结构变化国内外目前尚未见系统性的报道。此次实验结合苏木精-伊红染色光镜下观察病理组织,发现腹主动脉轻度损伤,以冠状动脉及肺微血管损伤明显,因此行冠状动脉及肺组织透射电镜观察热射病时的组织超微结构变化。结果表明,冠状动脉可见少量细胞核,形态不一,细胞质中可见细肌丝、密体及细胞膜旁的密斑,线粒体肿胀;肺组织可见细胞核形状不规则,线粒体肿胀,也有线粒体空泡变性和结构完整线粒体,毛细血管内皮与肺泡壁平行排列,肺泡隔清晰可见;此实验结果更好地证实了热射病时冠状动脉及肺微血管均出现显著损伤。

综上所述,目前国内外对于热射病血管内皮细胞损伤的研究缺乏较系统的评估。此次动物模型立足于腹主动脉、冠状动脉及肺组织反应全身大、中小及微循环血管状况,通过

病理苏木精-伊红染色、ICAM-1 免疫组织化学表达及电镜超微结构, 观察小猪热射病时不同部位的血管损伤特点, 较为系统地研究了小型猪在热射病时机体血管的内皮细胞变化, 结果表明, 热射病时血管内皮细胞存在显著损伤, 并伴有微血管血栓形成, 这为热射病早期临床抗凝治疗提供了重要的实验依据。

**致谢:** 十分感激病理科王会英、杨廷桐教授传授我丰富的病理学知识和耐心指导我阅片, 同时感谢血液内分泌科杨彦文、毛玉玲老师、常林遇师妹帮助我共同参与整个实验过程的实施。

**作者贡献:** 倪军、付刚、张静、胡玲玲负责实验设计, 付刚、张静、胡玲玲负责实验实施, 倪军、张静负责实验评估, 胡玲玲负责资料收集及数据分析并成文, 倪军、张静负责审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] KRUGER-GENGE A, BLOCKI A, FRANKE RP, et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4411.
- [2] IBA T, CONNORS JM, NAGAOKA I, et al. Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC. *Int J Hematol.* 2021;113(1):24-33.
- [3] 李晓洁. 血管细胞黏附分子-1 在过敏性休克大鼠器官中的作用及其表达规律 [D]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [4] HERPERTZ GU, NYKAMP L, RADKE OC. Lethal Heatstroke with Disseminated Intravascular Coagulopathy. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2022;57(1):68-78.
- [5] LIU SY, SONG JC, MAO HD, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of heat stroke in China. *Mil Med Res.* 2020;7(1):1.
- [6] 彭娜, 耿焱, 童华生, 等. 重症中暑凝血功能障碍的诊断和治疗 [J]. *中国实用内科杂志*, 2021,41(6):480-485.
- [7] 高铁婴, 杨文超, 宋青. 中暑伴随的凝血功能紊乱 [J]. *中国卫生标准管理*, 2018,9(20):52-54.
- [8] IBA T, CONNORS JM, LEVI M, et al. Heatstroke-induced coagulopathy: Biomarkers, mechanistic insights, and patient management. *E Clin Med.* 2022;44:101276.
- [9] 胡丹凤, 叶文. 热射病相关弥散性血管内凝血的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019,25(8):1593-1597.
- [10] ZHANG Q, ZHANG W, LIU J, et al. Lysophosphatidylcholine promotes intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells via an orphan G protein receptor 2-mediated signaling pathway. *Bioengineered.* 2021;12(1):4520-4535.
- [11] 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.
- [12] 乔泽渊, 倪军, 张静, 等. 重度中暑猪早期胰岛功能的变化 [J]. *中国医药导报*, 2021,18(23):4-7,32, 封 3.
- [13] GENG Y, LI R, HE SX, et al. Dexmedetomidine Attenuates Acute Lung Injury Induced by Heatstroke and Improve Outcome. *Shock.* 2019;52(5):532-539.
- [14] 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.
- [15] ZHONG L, WU M, LIU Z, et al. Risk Factors for the 90-Day Prognosis Of Severe Heat Stroke: a Case-Control Study. *Shock.* 2021;55(1):61-66.
- [16] HIFUMI T, KONDO Y, SHIMAZAKI J, et al. Prognostic significance of disseminated intravascular coagulation in patients with heat stroke in a nationwide registry. *J Crit Care.* 2018;44:306-311.
- [17] ZHONG L, WU M, WANG C, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with severe heatstroke complicated with disseminated intravascular coagulation: A case-control study. *Thromb Res.* 2021;197:120-123.
- [18] 郑琦涵, 赵晓成, 徐进, 等. 普通肝素治疗重度中暑合并凝血功能障碍的疗效 [J]. *中华卫生应急电子杂志*, 2017,3(6):365-366.
- [19] BOUCHAMA A, ABUYASSIN B, LEHE C, et al. Classic and exertional heatstroke. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):8.
- [20] UMEMURA Y, OGURA H, MATSUURA H, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy can attenuate systemic inflammation in rat heatstroke. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2018;26(1):97.
- [21] LIU J, ZHU G, XU S, et al. Analysis of miRNA expression profiling in human umbilical vein endothelial cells affected by heat stress. *Int J Mol Med.* 2017;40(6):1719-1730.
- [22] 童华生, 段鹏凯, 旋学智, 等. 肠系膜淋巴管结扎对重症中暑大鼠凝血功能的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2016,41(2):94-96.
- [23] 殷惠梅, 陆勇, 施学智, 等. 重症中暑大鼠血小板计数和功能动态变化研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2018,43(5):398-402.
- [24] ROBERTS GT, GHEBEH H, CHISHTI MA, et al. Microvascular injury, thrombosis, inflammation, and apoptosis in the pathogenesis of heatstroke: a study in baboon model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(6):1130-1136.
- [25] 周仁鸥. 沙漠干热环境中中暑大鼠模型的建立及肝肾损伤的机制研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [26] 刘亚楠, 徐秋林, 郭晓华, 等. MAPKs 家族在中暑小鼠肺微血管内皮细胞凋亡中的作用及机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2017,42(4):279-284.
- [27] 周仁鸥, 刘江伟, 张东, 等. 沙漠干热环境中中暑大鼠肾脏损伤性变化的研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2014,23(11):1228-1233.
- [28] WISOLEK HL, BUI TM, LEE JJ, et al. Intercellular Adhesion Molecule 1 Functions as an Efferocytosis Receptor in Inflammatory Macrophages. *Am J Pathol.* 2020;190(4):874-885.
- [29] LANG PP, BAI J, ZHANG YL, et al. Blockade of intercellular adhesion molecule-1 prevents angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Lab Invest.* 2020;100(3):378-386.
- [30] 许书添, 李世军. 热射病的病理生理与救治进展 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2021,30(3):258-262.
- [31] 古正涛, 刘志锋, 苏磊. 血管内皮细胞损伤与中暑发病机制关系的研究进展 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2013,22(7):809-811.
- [32] 谢敏崇, 杜剑文, 张海天, 等. 脓毒症继发急性肺损伤患者肺组织和血清细胞因子变化及临床意义 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018,32(4):344-346.
- [33] 汤文, 许慧, 黄成蛟, 等. 儿童脓毒症血栓弹力图指标、黏附分子与多器官功能障碍综合征及预后的关系 [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2021,13(11):81-86.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)