

# 热应激对小鼠脾淋巴细胞活性及炎症基因表达的影响

李 萍, 罗 雪, 何根林, 张晓亮, 罗 珍, 申婷婷, 杨 举, 李文晶, 刘 军, 王 宫, 杨学森

**【摘要】 目的** 热射病是病死率较高的致命性急症。系统性炎症反应综合征是中暑发生发展过程中的一个重要环节。作为机体最大的淋巴器官,文章研究将探索热应激对于脾脏功能的影响。**方法** 体内实验中,将 66 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组以及热应激 0 h、1 h、2 h、6 h、12 h、20 h、24 h、3 d、5 d、7 d 组,每组 6 只。对照组小鼠不受热应激。热应激组小鼠于人工环境模拟舱进行加热,当直肠温度达到 41.5 ℃ 时,核心温度维持在 (41.5℃±0.2)℃,持续 30 min。热应激后,各组小鼠分别在不同时间点观察体重、脾重量、脾系数的变化。体外实验中,9 只 12 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠于无菌条件下摘除脾,分离出小鼠原代脾淋巴细胞。原代淋巴细胞分别采用 37 ℃ (37 ℃ 组,作为对照)和 42 ℃ (42 ℃ 组,热应激)进行培养。实时定量聚合酶链反应 (PCR) 法检测 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12p70 的表达变化。采用流式细胞仪检测细胞表面 CD69 的表达。**结果** 与对照组比较,除 12 h 和 5 d 组之外,各热应激组小鼠  $\Delta$  重量显著下降 ( $P<0.05$ ),热应激可致动物出现明显的脱水现象。体外实验显示,42 ℃ 组小鼠脾原代淋巴细胞中 IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-12p70 基因的表达水平较 37 ℃ 组显著增加 ( $P<0.05$ ),并且还能促进 CD69 的表达 ( $P<0.01$ )。**结论** 热应激对脾功能具有促进作用,能够增强脾淋巴细胞的炎症因子的基因以及 CD69 表达,为阐释热射病所致全身炎症反应的可能机制提供了基础参考。

**【关键词】** 热应激;炎症因子;脾;淋巴细胞;CD69

**【中图分类号】** R134.3

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X(2019)02-0113-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.001

## Effects of heatstroke on splenic lymphocyte activity and expression of inflammatory genes in mice

LI Ping, LUO Xue, HE Gen-lin, ZHANG Xiao-liang, LUO Zhen, SHEN Ting-ting, YANG Ju, LI Wen-jing, LIU Jun, WANG Gong, YANG Xue-sen

(Department of Tropical Medicine, College of Military Preventive Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

**【Abstract】 Objective** Heat stroke is a fatal disease with high mortality. Systemic inflammatory response syndrome is a key process in the development of heatstroke. As the largest lymph organ of the body, this study will explore the effect of heatstroke on the function of the spleen. **Methods** In vivo, randomized 66 healthy male BALB/c mice into control groups and heat stress 0 h, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 20 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d group, six in each group. The mice in the control group were not subjected to heat stress, random grouping of male BALB/c mice were exposed to heat in an environment-controlled chamber. When the rectal temperature reaches 41.5 ℃, the core temperature was maintained at (41.5±0.2)℃ for 30 minutes. After heat stress, the changes of body weight, spleen

weight and spleen coefficient were observed at different time points. In vitro, spleen were removed from the mice under sterile conditions and the primary splenic lymphocytes were isolated from mice. Primary lymphocytes were cultured at 37 ℃ (37 ℃ group, control) and 42 ℃ (42 ℃ group, heat stress) respectively. Real time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was

基金项目:国家自然科学基金(81302413)

作者单位:400038 重庆,陆军军医大学军事预防医学系热带医学教研室(李 萍、罗 雪、何根林、张晓亮、罗 珍、申婷婷、杨 举、李文晶、刘 军、王 宫、杨学森)

通信作者:杨学森, E-mail: xuesenyi@hotmail.com

used to detect the expression changes of IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-12p70. The expression of CD69 on the cell surface was detected by flow cytometry. **Results** In contrast with the control group, the weight of heat stress mice was significantly reduced except for the 12 h and 5 d groups ( $P < 0.05$ ). Heat stress can lead to noticeable dehydration in mice. In vitro, heat stress could significantly increase the expression of IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , and IL-12p70 genes in the spleen primary lymphocytes of mice ( $P < 0.05$ ), and also promote the expression of CD69 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Heat stress can promote the spleen function and enhance the gene of inflammatory factors and the expression of CD69 in spleen lymphocytes. Our study provides a laboratory reference for the explanation of the possible mechanism of systemic inflammation induced by heatstroke.

**[Key words]** heat stress; inflammatory factors; spleen; lymphocytes; CD69

## 0 引言

中暑是一种由于机体长时间处于高温高湿环境中所引发的疾病,热射病(heatstroke, HS)属于中暑中最为严重的情况,主要表现为核心体温超过 41℃,水、电解质平衡失调,中枢神经系统功能紊乱<sup>[1-2]</sup>。热射病发病后迅速出现系统性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)以及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[2-4]</sup>,是病死率较高的致命性急症。

目前关于热射病的发病机制尚不清楚,早期针对发病机制的研究集中于心血管、肝、肾和神经系统。现在有研究提出 SIRS 是热射病发生发展过程中的一个重要环节。脾与炎症相关疾病有极大的相关性。作为机体最大的淋巴器官,脾含有大量的免疫细胞,是细胞免疫和体液免疫的中心,在免疫反应中发挥重要作用。因此,本研究以脾作为研究对象,通过 Balb/c 小鼠和小鼠原代脾细胞建立体内体外热应激模型,旨在观察高温应激所致免疫功能的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 12 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠(由陆军军医大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK 渝 2012-0002),体重(29.1±0.6)g,饲养室温度 22~23℃,环境湿度 50%,喂以标准的小鼠饮食。

**1.2 试剂和仪器** 主要试剂:Eastep 总 RNA 提取试剂盒购自美国 romega 公司,Prime Script™ RT reagent Kit with cDNA Eraser 试剂盒购自中国天津

TaKaRa 司,通用型 SYBR 快速荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Kapa biosystems 公司, FITC 标记的抗小鼠 CD69 单克隆抗体购自美国 BioLegend 公司。主要实验仪器:特定环境智能型模拟实验舱购自中国天津合普公司,电子体温计购自中国杭州华安医疗保健用品有限公司,电子体重秤购自中国上海精密科学仪器有限公司。

**1.3 体内实验** 66 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分为 11 组:对照组以及热应激 0 h、1 h、2 h、6 h、12 h、20 h、24 h、3 d、5 d、7 d 组,每组 6 只。对照组小鼠不受热应激。热应激是每 5 min 直肠温度升高约 1℃。当直肠温度达到 41.5℃时,核心温度维持在(41.5±0.2)℃,持续 30 min。然后将加热垫取出,使小鼠在室温下(24℃)恢复。热应激后,小鼠分别在 0 h、1 h、2 h、6 h、12 h、20 h、24 h、3 d、5 d、7 d,观察体重、脾重量、脾系数的变化。热应激对小鼠体重的影响,通过Δ重量的变化来观测。计算公式:

$$\text{脾系数} = (\text{脾重量} \times 100) \div \text{体重}$$

$$\Delta \text{重量} = (\text{热应激后的体重} - \text{热应激之前的体重}) \div \text{热应激之前的体重}$$

**1.4 体外实验** 9 只 12 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠,体重(29.1±0.6)g,无菌条件下摘除脾,分离出小鼠原代脾淋巴细胞。原代淋巴细胞分别采用 37℃(作为对照)和 42℃(热应激)进行培养。分别热应激 0.5 h、1 h、2 h 后,采用佛波酯(phorbol ester, PMA)(50 ng/mL)和离子霉素(ionomycin, 1 μmol/L)刺激 24 h。由于 PMA 与离子霉素均需要二甲亚砜(DMSO)进行溶解,因此实验中设计单纯加入 DMSO 试剂作为空白对照。收集细胞,实时定量聚合酶链反应(PCR)法检测 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、

IL-12p70 的表达变化。采用流式细胞仪检测细胞表面 CD69 的表达。

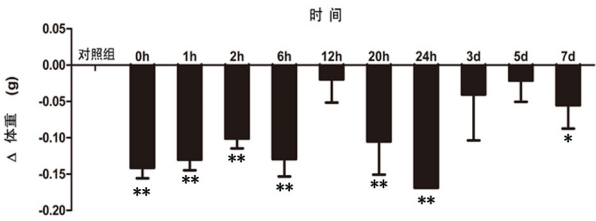
**1.4.1 Real-time PCR 检测脾组织和脾原代淋巴细胞炎症因子和相关转录因子** Eastep 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。按 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明进行反转录合成 cDNA。按 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 试剂盒进行基因定量分析。20 μL 反应体系：KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) 10 μL，正义链 (10 μmol/L) 0.4 μL，反义链 (10 μmol/L) 0.4 μL，无 RNAase 水 8.7 μL，cDNA 溶液 0.5 μL。实时荧光定量 PCR 仪上进行两步法扩增。引物序列及大小见表 1。每个样本设 3 个复孔。本研究引物为 Takara 公司(大连)合成。

**1.4.2 流式细胞法检测 CD69 的表达** 原代脾淋巴细胞 (1×10<sup>6</sup>) 用 FACS 缓冲液 (PBS, pH 值 7.2, 含 0.4% 牛血清白蛋白) 进行清洗。采用 FITC 标记的抗小鼠 CD69 单克隆抗体 (BioLegend 公司) 或非特异性染色控制单克隆抗体 (BioLegend 公司) 进行染色，然后通过 FASCalibur 流式细胞仪检测。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 进行数据分析，数据表述采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用单因素方差分析 (One way ANOVA) 分析组间差异，以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

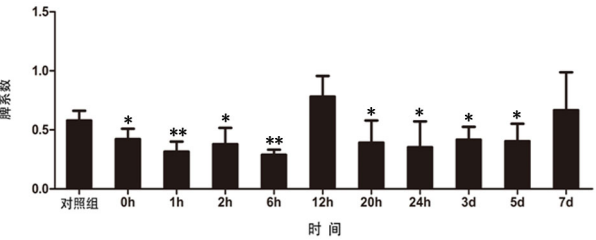
**2.1 热应激对体重的影响** 与对照组比较，除 12 h 和 5 d 之外，热应激小鼠 Δ 重量显著下降 ( $P < 0.05$ )，说明热应激可致动物出现明显的脱水现象。见图 1。



与对照组比较, \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$

图1 热应激对小鼠体重的影响

**2.2 热应激对脾的影响** 除了 12 h 组，HS 小鼠的脾系数较对照组呈降低趋势，而 12 h 组的脾系数异常升高应该与该组小鼠体重较低有关，见图 2。在体重降低的情况下，脾系数呈现出了同样的下降趋势，说明在高温应激状态下脾重量减轻，出现了脱水萎缩的情况。



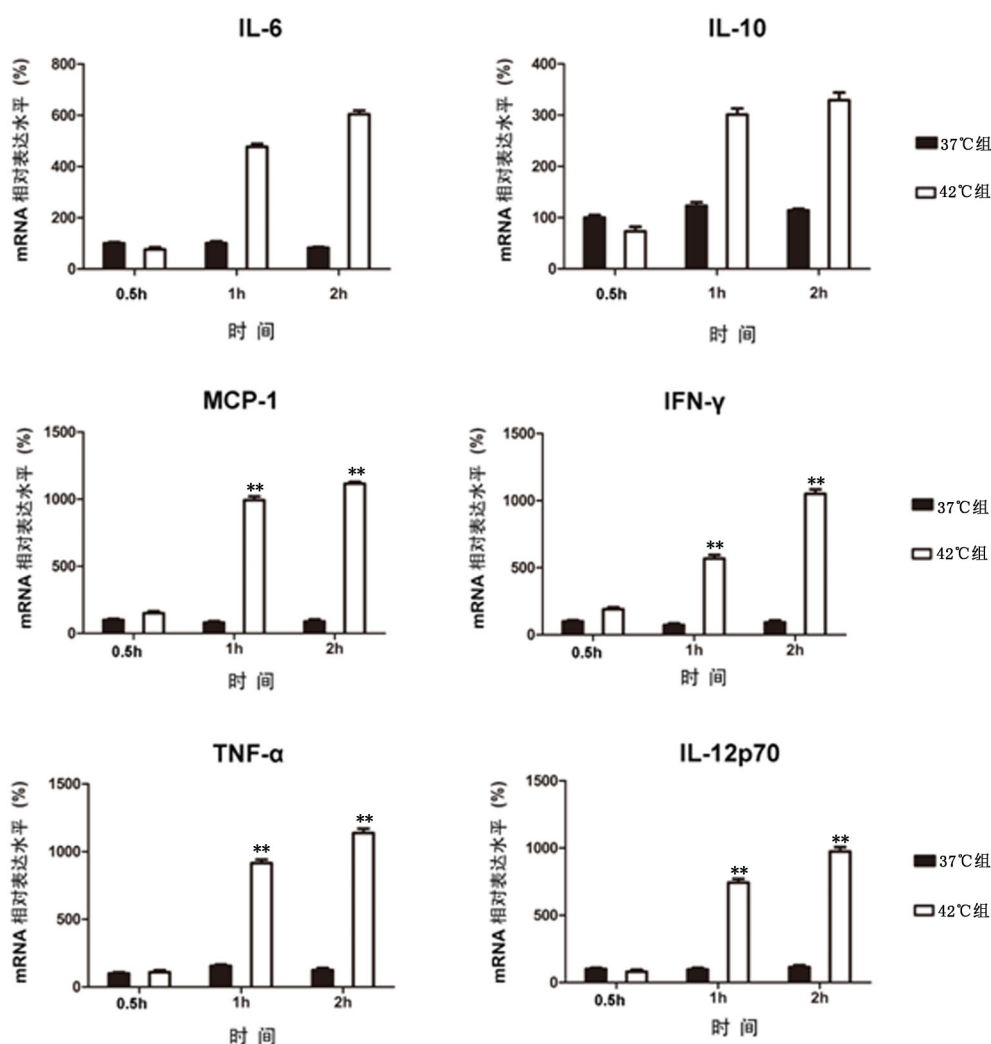
与对照组比较, \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$

图2 热应激对小鼠脾系数的影响

**2.3 热应激对原代脾淋巴细胞炎症细胞因子基因表达的影响** 与 37℃ 组比较，42℃ 组小鼠脾原代淋巴细胞中 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN-γ、TNF-α 和 IL-12p70 基因的表达水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
IL-6	CACGGCCTTCCTACTTCAC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
IL-10	AGTACAGCCGGGAAGACAAT	AAGGCTTGGCAACCCAAGTAA
MCP-1	GATGCAGTTAACGCCCACT	AGCTTCTTTGGGACACCTGC
IFN-γ	AGGCCATCAGCAACAACATAAGCG	GGCGCTGGACCTGTGGGTTG
TNF-α	ACAGAAAGCATGATCCGCGA	CGATCACCCGAAGTTCAGT
IL-12p70	TTGCCATCGTTTTTGCTGGTG	CACTGTTTCTCCAGGGGCAT

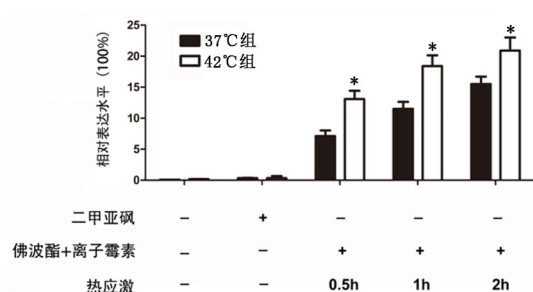


与 37℃ 组同时时间点比较, \* $P < 0.01$

图 3 热应激对原代脾淋巴细胞炎症细胞因子基因表达的影响

## 2.4 热应激能够促进原代脾淋巴细胞 CD69 的表达

在佛波酯和离子霉素共刺激的条件下, 42℃ 组原代脾淋巴细胞 CD69 的表达显著增加 ( $P < 0.01$ ), 见图 4。



与 37℃ 组比较, \* $P < 0.01$

图 4 热应激对原代脾淋巴细胞 CD69 表达的影响

## 3 讨论

高温环境军事训练容易导致中暑等各种热损伤的发生。严重热损伤(如:热射病)是降低热区部队作业能力,造成战时非战斗减员的主要原因。热射病可以导致严重的中枢神经系统障碍,包括抽搐、谵妄、惊厥以及昏迷,同时还会引起弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)、横纹肌溶解、肝/肺损伤、急性肾功能衰竭以及多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[5-6]</sup>。国外流行病学调查显示中暑的平均病死率为 10%~15%,我国的文献报道病死率为 5.6%~33.3%。一旦发展为重症中暑合并 MODS,则病死率可达 40% 以上,即使存活亦有 30%



以上的患者遗留长期的神经系统等各类后遗症<sup>[7-8]</sup>。作为中暑中最为严重的情况,致死率极高的热射病的发病率也逐年增加<sup>[9]</sup>。目前关于热射病的发病机制尚无确切定论,但由于热射病的病程发展与败血症相似,使得人们将目光集中于热射病发生时体内出现的大量炎症因子以及其所引发的 SIRS。作为机体免疫系统中最大的免疫器官,本研究以脾为视角探查高温应激对免疫功能的影响。

高温应激状态下,温度感受器在接收到体内外温度变化的刺激后将相关信息传递给下丘脑,位于下丘脑的体温调节中枢为维持体温保持在正常阈值会对机体做出相应调整,主要通过增加心输出量、改善皮肤血液循环以及加快皮肤表面汗液蒸发来排除体内多余的热量<sup>[10]</sup>。但是大量进入皮肤血液循环的血液会减少体内多种器官的血流量,同时大量汗液的流失会导致血浆容量的下降以及组织器官脱水萎缩,致使体重发生变化。Pumchandh 等<sup>[11]</sup>监测了 191 名基础军事训练过程中发生热射病的泰国皇家军队新兵的体温和体重,发现发病的新兵体重呈现了降低的趋势,其中有 30 名新兵的体重较之发病前降低了 10% 以上。

本研究也发现,除了 12 h 组,热射病小鼠的体重较之对照组整体呈现明显的降低趋势,高温应激明显对小鼠的体重产生影响。脏器系数作为长期毒性实验中一项较为敏感的检测指标能够反应出实验过程中脏器的基本状况,我们通过体重和脾重量计算了小鼠的脾系数比,发现除了 12 h 组,HS 小鼠的脾系数较之对照组呈降低趋势,而 12 h 组的脾系数异常升高应该与该组小鼠体重较低有关。在体重降低的情况下,脾系数呈现出了同样的下降趋势,说明在高温应激状态下脾重量减轻,出现了脱水萎缩的情况。以上结果均证实高温应激会对机体生理状况和免疫系统造成不同程度的影响。

既往研究证实,热射病发生时发生 DIC 的患者外周血中 IL-6、IL-10 以及 TNF- $\alpha$  的浓度均明显升高,而出现器官衰竭的患者 IL-6 的表达水平很高<sup>[12-14]</sup>。组织因子(tissue factor, TF)广泛表达于各种组织,是凝血过程的启动者,IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 促进 TF 表达,能引起 HS 患者出现 DIC,而

抑制性因子 IL-10 则起到抑制 TF 出现的作用<sup>[1,15-17]</sup>。我们检测了外周血当中 IL-12p70、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 的表达情况,发现出舱后 IL-12p70 的浓度明显升高,12 h 后浓度恢复到了正常水平, TNF- $\alpha$  和 MCP-1 均呈现出了类似的先升高后降低的趋势。而 IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-10 则在出舱后浓度持续升高至 12 h,之后表达水平恢复至正常水平,但在出舱后 5d 和 7d 均又呈现小幅回升。我们还检测了热射病小鼠脾中 IL-12p70、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 mRNA 的表达情况,得到了相似的结果。在遭受高温应激后,IL-12p70、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 等促炎因子的表达水平均出现了明显上升,结合脾系数和 HE 染色的结果,说明热射病发生时机体免疫系统受到了明显的影响,脾出现了一定程度的损伤。Bouchama 等<sup>[18]</sup>研究证实热应激会刺激抗炎细胞因子如 IL-10、IL-8 的表达水平显著上升,我们的结果也发现热刺激后 IL-10 表达升高,说明机体在高温应激产生强烈的促炎反应同时也启动了抗炎反应。在热刺激 12 h 后,炎症因子的表达开始出现不同程度的降低,说明在热刺激 12 ~ 20 h 之后机体开始了缓慢恢复,这是热射病自然转归的结果。

T 淋巴细胞作为机体免疫系统的一种重要免疫细胞,其分化和成熟的程度、数量和功能的改变与免疫系统状态密切相关。为了探索热应激对原代脾 T 淋巴细胞活化的作用,我们检测了热应激对原代脾淋巴细胞 CD69 表达的影响。CD69 属于  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性 II 型凝集素样超家族跨膜受体,在早期活化的 T 细胞表面可以大量表达。佛波酯可通过细胞膜进入胞内,模拟二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)的结构直接作用于蛋白激酶 C(PKC)的调节部位,从而激活 PKC。离子霉素是  $\text{Ca}^{2+}$  载体,可使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,两者协同作用,共同促进 T 淋巴细胞活化。我们在体外实验中利用佛波酯和离子霉素促进 T 淋巴细胞的活化,检测 CD69 的表达水平。结果发现随着热刺激时间的增加,CD69 的表达水平也不断增加,IL-12p70、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 mRNA 的表达也呈现出了类似的时间依赖的表达递增。此外 42  $^{\circ}\text{C}$  组、二甲亚砜组的 CD69 表达均高于

37℃组,说明热应激本身就有激活T淋巴细胞、促进CD69表达的作用。以上结果符合热射病的表现特征,也与热射病的病程发展具有一致性。但因为热射病的发生是环境-机体多因素共同作用、全身多器官受到影响导致的结果,所以我们认为单纯的脾细胞热刺激不能反映整体免疫系统受到的影响,但是该结果为了解热应激对小鼠脾的影响提供了参考。

# 参考文献

- [1] Leon LR, Bouchama A. Heat Stroke[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2):611-647.
- [2] Bouchama A, Knochel JP. Heat Stroke[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(24):1978-1988.
- [3] Roth J, Rummel C, Barth SW, *et al*. Molecular aspects of fever and hyperthermia[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2009, 29(2):229-245.
- [4] Meehl GA, Tebaldi C, *et al*. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century[J]. *Science*, 2004, 305(5686):994-997.
- [5] 李莉,古正涛,刘志锋,等.泛素羧基末端水解酶-1在重症中暑小鼠脑损伤组织中的表达[J].*医学研究生学报*, 2015, 28(2):118-122.
- [6] 张波,刘江伟,张东,等.沙漠干热环境中暑大鼠肺损伤相关研究[J].*医学研究生学报*, 2014, 27(11):1148-1151.
- [7] 于晓华,郭建斌,卜爱文.夏季5 km武装越野训练预防中暑的几个关键环节[J].*东南国防医药*, 2014, 16(1):102-104.
- [8] 谭晓风,丁颖.中暑预防的研究进展[J].*东南国防医药*, 2009, 11(6):530-533.
- [9] 苏磊,童华生,重症中暑转化医学研究回顾与展望[J].*解放军医学杂志*, 2017, 42(2):103-108.
- [10] 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.
- [11] Pumchandh N, Tedsana V, Ngow S, *et al*. Monitoring of the bed time body temperature and body weight to prevent the occurrence of heat stroke in the Royal Thai Army recruits, Lopburi Province, Thailand[J]. *J Med Assoc Thai*, 2012, 95(Suppl 5):S1-5.
- [12] 郑春雨,张伟,梁永刚.热应激大鼠早期炎症因子水平及乌司他丁干预的效果[J].*医学研究生学报*, 2011, 24(1):25-28.
- [13] Wada H, Ohiwa M, Kaneko T, *et al*. Plasma level of tumor necrosis factor in disseminated intravascular coagulation[J]. *Am J Hematol*, 1991, 37(3):147-151.
- [14] Wada H, Tanigawa M, Wakita Y, *et al*. Increased plasma level of interleukin - 6 in disseminated intravascular coagulation [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1993, 4(4):583-590.
- [15] Herbert JM, Savi P, Laplace MC, *et al*. IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes[J]. *FEBS Lett*, 1992, 310(1):31-33.
- [16] Neumann FJ, Ott I, Marx N, *et al*. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(12):3399-3405.
- [17] Pradier O, Gerard C, Delvaux A, *et al*. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide[J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23(10):2700-2703.
- [18] Bouchama A, Ollivier V, Roberts G, *et al*. Experimental heat-stroke in baboon; analysis of the systemic inflammatory response [J]. *Shock*, 2005, 24(4):332-335.

(收稿日期:2018-06-12; 修回日期:2018-07-31)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕锋)