

体外培养人肠上皮细胞株接受脂多糖联合热打击后白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 的释放

孙杰, 陈蕊, 董家辉, 姜巧, 孙照琨, 郭振辉(解放军广州军区广州总医院MICU科, 广东省暨广州市老年感染与器官功能支持重点实验室, 广东省广州市 510010)

文章亮点:

1 肠上皮细胞遭受热打击和肠道细菌及其由细菌产生的毒素共同作用下经历了怎样的分子生物学变化, 一直缺乏切实、可靠实验依据。基于此, 课题组模拟了中暑肠上皮细胞的病理环境, 研究了热打击和脂多糖联合刺激对人肠上皮细胞损伤和炎症因子的释放效应。

2 结果说明, 热打击和脂多糖单独作用均可引起细胞损伤, 增加炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 表达, 并且二者之间存在协同效应。实验为理解重症中暑病理过程中, 肠道功能障碍、肠道细菌和内毒素移位进而引发多脏器功能衰竭的病理机制提供了客观的实验依据。

关键词:

组织构建; 组织工程; 脂多糖; 热打击; 肠上皮细胞; 炎症因子

主题词:

脂多糖类; 上皮细胞; 白细胞介素6; 肿瘤坏死因子 α

基金资助:

广州市科技计划项目(2014J4100033); 解放军总后勤部专项基金(132000273); 课题名称: 老年脓毒症功能障碍的临床评估与干预

孙杰, 男, 1966年生, 江苏省镇江市人, 汉族, 1989年解放军第二军医大学毕业, 副主任医师, 主要从事老年重症医学研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.51.008

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)51-08238-05

稿件接受: 2014-11-21

摘要

背景: 对于肠上皮细胞遭受高热和肠道细菌以及由细菌产生的内毒素等多重打击后经历了怎样的分子生物学变化, 一直缺乏切实、可靠实验依据。

目的: 观察脂多糖联合热打击对人肠上皮细胞损伤及炎症因子白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 释放的影响。

方法: 体外培养人肠上皮细胞株(SW 480), 将 3×10^5 细胞种入实验用培养皿。实验分组为: 对照组(37°C), 热打击组(43°C 2 h), 脂多糖刺激组(1 mg/L 脂多糖 6 h), 热打击联合脂多糖刺激组(43°C +脂多糖)。采用WST-1法观察细胞毒效应和细胞存活率; 同时采用ELISA法观察各组炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平。

结果与结论: 与对照组相比, 热打击组具有细胞毒效应, 其细胞活率明显下降, 细胞炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平也有所增高。脂多糖组单独作用也具有细胞毒效应, 细胞活力、细胞增殖率也明显下降, 同时白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平明显升高。而热打击和脂多糖联合打击后, 可观察到两者的协同作用。结果说明, 热打击和脂多糖单独作用均可引起细胞损伤, 增加炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 表达, 并且二者之间存在协同效应。实验结果为理解重症中暑病理过程中, 肠道功能障碍、肠道细菌和内毒素移位进而引发多脏器功能衰竭的病理机制提供了客观的实验依据。

孙杰, 陈蕊, 董家辉, 姜巧, 孙照琨, 郭振辉. 体外培养人肠上皮细胞株接受脂多糖联合热打击后白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 的释放[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51):8238-8242.

Effect of lipopolysaccharide stimulation combined with heat stress on release of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α from human intestinal epithelial cells cultured *in vitro*

Sun Jie, Chen Rui, Dong Jia-hui, Jiang Qiao, Sun Zhao-kun, Guo Zhen-hui (Department of MICU, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: There is no practical and reliable experimental evidence for changes in molecular biology of intestinal epithelial cells suffering from heat stress, intestinal bacteria and endotoxin produced by bacteria.

OBJECTIVE: To observe the effect of lipopolysaccharide stimulation combined with heat stress on human intestinal epithelial cell injury and release of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α .

METHODS: Human intestinal epithelial cell lines (SW 480) cultured *in vitro* was seeded into culture dishes at a density of 3×10^5 , and then divided randomly into four groups: control group was cultured in an incubator of 37°C ; heat stress group was cultured in the incubator of 43°C for 2 hours; lipopolysaccharide group was stimulated

Sun Jie, Associate chief physician, Department of MICU, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-11-21

by 1 mg/L lipopolysaccharide for 6 hours; lipopolysaccharide+heat stress group (combination group) was subjected to heat stress for 2 hours followed by lipopolysaccharide stimulation for 6 hours. WST-1 method was used to investigate the cytotoxic effect and cell survival rate, and ELISA assay was used to investigate the levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-α.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the cytotoxic effect increased, and the cell survival rate reduced as well as the level of interleukin-6 and tumor necrosis factor-α increased in the heat stress and lipopolysaccharide groups. Synergistic effects were visible in the combination group. These findings indicate that lipopolysaccharide and heat stress alone can both induce cell injury, increase the levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-α, and there is a synergistic effect between them. Experimental findings from this study may be an objective experimental basis for understanding the pathogenesis of multiple organ failure caused by bowel dysfunction, intestinal bacteria and endotoxin translocation during the pathological process of severe heat stroke.

Subject headings: lipopolysaccharides; epithelial cells; interleukin-6; tumor necrosis factor-α

Funding: the Science and Technology Project of Guangzhou, No. 2014J4100033; the Special Fund of PLA General Logistics Department, No. 132000273

Sun J, Chen R, Dong JH, Jiang Q, Sun ZK, Guo ZH. Effect of lipopolysaccharide stimulation combined with heat stress on release of interleukin-6 and tumor necrosis factor α from human intestinal epithelial cells cultured in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8238-8242.

0 引言 Introduction

中暑是在高温伴随高湿或暴露在烈日环境过久的情况下, 由于机体中枢性体温调节功能异常, 导致机体体温调节障碍, 水、电解质代谢紊乱以及神经系统功能损害而发生的一组急性热病。主要表现为中心体温急剧升高超过 40 °C 及中枢神经系统功能障碍引起谵妄、惊厥或者昏迷等症^[1]。在高温高湿地区和季节, 中暑是一种高发病率和病死率的疾病, 随着全球范围变暖, 以及热浪袭击频率和强度的增加, 其发病率还将进一步上升^[2-3]。

近年来的研究表明, 中暑的病理生理学反应不仅由热暴露的直接损伤引起, 而更为重要的是继发于热损伤之后的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 进而引发多器官功能不全综合征^[4-5]。在这一过程中肠道作为人体内最大“储菌库”和“内毒素库”, 以其在体内独特的生理环境参与全身炎症反应综合征和多器官功能不全综合征的病理生理过程^[6-7]。

中暑热打击过程中, 各种刺激可引起肠道屏障改变, 使肠免疫功能受到抑制, 肠内细菌移位, 内毒素、细菌、抗体递质不断进入血液和淋巴液, 导致多种炎症递质释放, 引发和加重失控性炎症反应综合征, 而全身炎症反应综合征的发生更加重了肠道损伤, 形成恶性循环, 最终导致多器官功能障碍综合征^[8-9]。

Gathiram等^[10]在研究中暑动物时发现, 直肠温度升至 42 °C 时, 血浆脂多糖一直维持在较低水平, 之后随着直肠温度的增加脂多糖浓度开始缓慢增加, 至死亡前迅速升高至原水平的5倍。Shapiro等^[11]将¹²⁵I 标记的内毒素注入来源于正常大鼠的游离肠段, 然后分别孵育于 37 °C 或者 45 °C, 结果发现, 孵育于 45 °C 的大鼠肠段的内毒素渗漏是 37 °C 肠段的3倍。他们还发现, 直接取出热应激大鼠的肠段的内毒素渗漏率也是非应激大鼠的3倍。这些结果表明存在肠道黏膜受到热损伤后会有微生物内毒素由肠道向外渗漏增加, 这可能有利于对中暑过程中毒血症形成机制的

理解。

研究已发现高热可引起肠上皮细胞损伤, 表现为细胞形态发生明显改变, 细胞骨架发生重组, 细胞间间隙增大, 联合脂多糖打击后细胞损伤进一步加重, 然而以往研究仅仅限于表象观察。在这一过程中, 作为肠黏膜机械屏障重要组成部分的肠上皮细胞遭受热打击和肠道细菌及其由细菌产生的毒素共同作用下经历了怎样的分子生物学变化, 一直缺乏切实、可靠实验依据。基于此, 课题组模拟了中暑肠上皮细胞的病理环境, 研究了热打击和脂多糖联合刺激对人肠上皮细胞损伤和炎症因子的释放效应。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照观察。

时间及地点: 实验于2014年5至9月在解放军广州军区广州总医院医学实验科完成。

材料:

脂多糖联合热打击对肠上皮细胞损伤及白细胞介素6、肿瘤坏死因子α 释放的影响实验所用细胞及试剂:

细胞及试剂	来源
人肠上皮细胞株(SW 480)	南方医院消化研究所馈赠
RPMI 1 640 培养基(含体积分数 10%胎牛血清, 10×10 ⁴ U/L 青霉素 100 mg/L 链霉素)	美国 Gibco 公司
脂多糖(LPS)	美国 Sigma 公司
人白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α ELISA 检测试剂盒分别	中国 ExCell 和 CUSABIO 公司
WST-1 检测试剂盒及乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒	中国碧云天公司

实验方法:

细胞复苏培养与实验分组: 人肠上皮细胞株(SW480)复苏后, 将细胞移入离心管中, 800 r/min离心10 min, 弃上清液, 使用含体积分数20% FBS的RPMI 1 640培养液重悬细胞, 调整细胞浓度至100×10⁴/cm², 将细胞移入培养

皿中, 在 37 °C, 体积分数5% CO₂条件下培养。次日换液, 以后根据细胞生长情况每两三天换培养液1次, 每7 d 传代一两次。实验前1 d, 将 3×10^5 个细胞种入实验用培养皿。实验分组为: 对照组(37 °C), 热打击组(43 °C 2 h), 脂多糖刺激组(1 mg/L脂多糖, 6 h), 热打击联合脂多糖刺激组(43 °C+脂多糖)。

细胞毒效应及细胞存活率检测: 细胞毒性实验采用LDH释放检测试剂盒, 具体操作为: 对数生长期细胞按加入100 μ L约含 5×10^3 /孔个细胞铺入96孔板, 培养24 h后, 更换为100 μ L/孔无血清RPMI 1640培养液。细胞予以热打击和脂多糖刺激后, 将细胞培养板用多孔板离心机400 $\times$ g离心5 min。尽吸除上清, 加入150 μ L用PBS稀释 $\times 10$ 试剂盒提供的LDH释放试剂, 摇晃培养板混匀后, 继续在细胞培养箱中孵育1 h。将细胞培养板用多孔板离心机400 $\times$ g离心5 min。分别吸取各孔上清液120 μ L, 加入一新96孔板相应孔中, 随即进行样品测定。细胞活力检测按WST-1试剂盒说明进行: 对数生长期细胞按 5×10^4 /孔的密度铺入96孔板。细胞增殖实验每孔加入100 μ L约含 52×10^3 /孔个细胞。培养24 h后, 更换为100 μ L/孔无血清RPMI 1640培养液。细胞按不同处理方式刺激后, 每孔培养细胞上清中加入10 μ L的 WST-1后, 置于37 °C细胞孵箱中继续培养2 h, 光镜下观察细胞形态学变化。将96孔板放入酶标仪中测波长在450 nm测定吸光度(A值)。操作每组设3个复孔, 实验重复3次。

热打击联合脂多糖刺激后炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子a水平测定: 对数生长期细胞按 5×10^4 /孔的密度接种于60 mm $\times$ 15 mm的细胞培养皿, 待细胞生长至单层融合后, 更换1.5 mL/皿无血清RPMI1640培养液。按不同处理方式刺激细胞后, 分别收集各处理组的细胞上清液, 分装并置于-80 °C保存, 采用双抗体夹心ELISA方法检测白细胞介素6和肿瘤坏死因子a水平。具体操作按照试剂盒说明进行, 采用100 μ L反应体系, 每组设2个复孔, 用酶联免疫检测仪于450 nm处读取A值。每个独立实验重复3次。

主要观察指标: 热或脂多糖以及两者联合的细胞毒效应, 其对细胞活力以及细胞释放炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子a的影响。

统计学分析: 使用Graphpad Prism 6.0 及SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 服从或近似正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 在方差齐性的基础上应用单因素方差分析, 组间差异采用LSD法比较, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞毒效应和细胞活力检测结果 热打击和脂多糖各自和联合刺激细胞后, 细胞毒效应使用乳酸脱氢酶法检测(图1)。表现为代表细胞毒的指标乳酸脱氢酶的释放与热打击及脂多糖相关, 与对照组相比, 单独的热打击及脂多糖刺激均可使乳酸脱氢酶明显增加, 而热打击联合脂多糖

后起协同作用。这一结果说明, 热打击联合脂多糖刺激可明显增加细胞毒效应, 引起细胞损伤。

荧光显微镜下观察, 与对照组相比较, 单独热打击和脂多糖刺激后, 细胞出现轮廓变圆, 伪足变短, 细胞间隙增大, 而联合刺激后, 上述情况更加明显。WST-1 检测显示, 热打击后细胞存活率明显下降, 而联合脂多糖刺激后, 细胞活率下降更为显著, 见图2。

2.2 炎症因子白细胞介素6及肿瘤坏死因子a水平检测结果 正常情况下, 细胞存在一定的白细胞介素6和肿瘤坏死因子a基础表达量。与对照组比较, 单独热打击和脂多糖刺激后, 肠上皮细胞白细胞介素6表达明显增高, 然而单独热打击和脂多糖之间没有显著差异, 两者联合刺激后, 白细胞介素6的表达增高幅度为单独热打击和脂多糖刺激的近1倍左右, 见图3。

单独热打击和脂多糖刺激后肠上皮细胞肿瘤坏死因子a的表达也明显增高, 但与白细胞介素6的表达所不同的是, 两者联合刺激后肿瘤坏死因子a的表达与单独热打击或脂多糖刺激相比较无明显改变, 见图3。

3 讨论 Discussion

传统观点认为核心体温升高在中暑病理过程中起着核心作用, 中暑救治中的关键点是迅速降低核心体温^[12-13]。尽管这一点在众多不同的中暑动物模型中得到证实^[14-16], 临床也发现中暑患者的核心体温与预后相关^[17]。然而, 随着研究深入发现降温仅对轻度中暑的治疗和预后发挥显著作用, 对重症中暑的疾病恢复和预后仅部分起作用。因此, 在“热打击-中暑-重症中暑-多器官功能障碍综合征”病理过程中可能存在更为重要的关键点。

最新研究认为, 中暑的病理生理学反应并不仅仅是由热暴露的直接损伤引起的, 更为关键的是一种继发于热损伤之后的系统性炎症反应综合征, 进而发展为“类脓毒症”(like-sepsis)反应, 引发多器官功能不全综合征的过程^[4]。在这一过程中, 高热打击引起肠黏膜屏障破坏, 使细菌内毒素移位, 导致血中内毒素水平升高, 从而使机体暴露在了热细胞毒和内毒素联合打击的环境当中, 加速了中暑的病理进程。

在针对于体外动物热打击模型的研究发现胃肠道病理学改变与机体的高热、降温及死亡时间密切相关, 并且胃肠道的改变与中暑患者的复苏后期病情加重, 甚至死亡也存在重要联系, 这点与感染性休克、多器官功能不全综合征和肠道缺血再灌注损伤之间也是惊人相似^[18]。国外Shapiro等^[19]和Gathiram等^[20]在体外中暑动物模型的研究结果表明, 热打击引起肠黏膜损伤后可观察到细菌内毒素的移位。Moseley等^[21]和Lambert等^[22]对动物组织及细胞水平上的研究也表明肠道上皮受损的程度和通透性与遭受热打击的程度密切相关。由此表明, 在“热打击-中暑-重症中暑-多器官功能障碍综合征”的病理过程中, 高热和肠黏

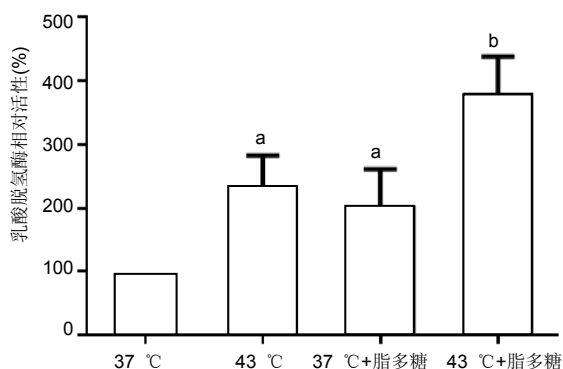


图1 单独或联合脂多糖打击后细胞毒效应检测结果

Figure 1 Cytotoxic effect after treatment with lipopolysaccharide alone or combined with heat stress

图注: 热打击联合脂多糖刺激可明显增加细胞毒效应, 引起细胞损伤。与 37 °C 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与单独热打击组和脂多糖刺激组比较, ^b $P < 0.05$ 。

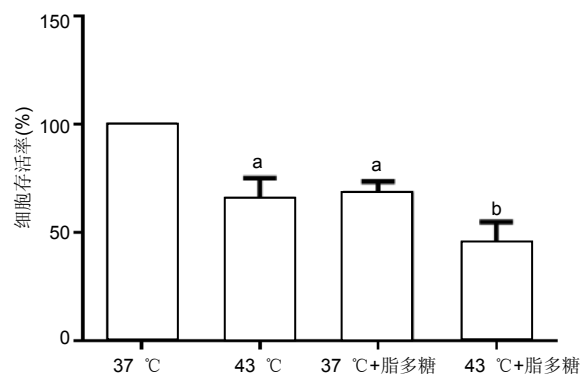


图2 单独或联合脂多糖打击后细胞存活率检测结果

Figure 2 Cell survival rates after treatment with lipopolysaccharide alone or combined with heat stress

图注: 热打击后细胞存活率明显下降, 而联合脂多糖刺激后, 细胞存活率下降更为显著。与 37 °C 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与单独热打击组和脂多糖刺激组比较, ^b $P < 0.05$ 。

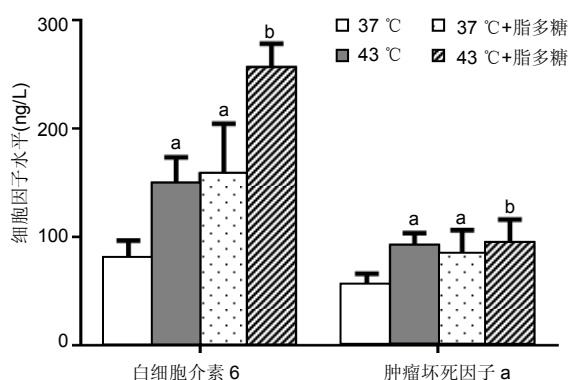
图3 单独或联合脂多糖打击后细胞白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平检测结果

Figure 3 Levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α after treatment with lipopolysaccharide alone or combined with heat stress

图注: 热打击联合脂多糖刺激组白细胞介素6的表达显著高于其他组, 肿瘤坏死因子 α 的表达显著高于对照组。与 37 °C 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与单独热打击组和脂多糖刺激组比较, ^b $P < 0.05$ 。

膜损伤引起的细菌内毒素移位存在着协同作用, 并且可能是重症中暑病程中的关键环节。在组成肠黏膜机械屏障成员中, 肠上皮细胞和细胞间的紧密连接是决定肠道通透性最为关键的因素^[23]。已有研究证实高热打击可诱导体外培养的肠上皮细胞损伤, 细胞通透性增加^[24]。然而在此过程中, 作为肠黏膜的主要机械屏障组成部分, 肠上皮细胞在热打击和细菌内毒素共同作用下至中暑, 甚至重症中暑的病理过程中, 其细胞分子水平上发生了怎样的变化, 迄今尚无可靠的实验依据。

Bouchana等^[25]对中暑患者的血清检测发现, 一些在炎症反应中发挥重要作用的炎症递质和细胞因发生了明显的变化, 主要表现为中暑患者血中的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 α 以及脂多糖分别较正常增加了6.3倍、9倍和1 000倍。Lu等^[26]对中暑患者血浆中的炎症因子进行了检测, 研究结果发现炎症因子白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α

等显著增加。Hammami等^[27]的研究进一步证实了肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素6等细胞因子在中暑病理过程中的重要作用。

本实验采用体外培养肠上皮细胞热打击联合脂多糖刺激, 模拟了中暑过程中脓毒症内环境下对人肠上皮细胞(SW480)的影响。研究结果表明SW480细胞在热打击及脂多糖联合刺激下, 其细胞毒效应明显增加, 而细胞活力显著下降, 表明了热打击和脂多糖刺激存在明显的协同作用。为了进一步研究“中暑-重症中暑-多器官功能不全综合征”发生发展的过程中的具体炎症反应机制, 作者进一步观察了热打击与脂多糖单独和联合作用对肠上皮细胞释放炎症反应的启动物质——白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的影响。结果发现, 热打击和脂多糖单独或联合作用均可导致肠上皮细胞的白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的释放增加, 但热打击和脂多糖的联合作用时白细胞介素6的变化更为显著这一结果也进一步验证了在中暑发生发展过程中热打击和脂多糖的联合协同作用起着重要的作用。而肿瘤坏死因子 α 的释放在本研究与热打击和脂多糖的协同效应不明显, 目前尚不清楚其中的原因。

综上所述, 中暑作为物理损伤性疾病, 其病理过程中不仅仅是热的物理损伤作用, 更为重要的是继发于热损伤后的一系列“二次打击”, 这其中包括了热的细胞毒效应、菌内毒素移位以及由此引发的前炎症因子释放等的作用。这种联合协同效应为理解“中暑-重症中暑-多器官功能障碍综合征”发生发展过程提供了直观的实验依据。当然本研究只是对这一机制进行了初步的观察, 进一步的内在分子机制及其与全身炎症反应之间的相关关系尚需深入研究。

作者贡献: 郭振辉教授对整个实验设计进行评估及审查; 孙杰教授为实验的设计者, 并参与部分实验实施; 陈蕊、董家辉、姜巧参与实验中具体实验项目, 孙照琨对实验数据进行统计分析。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 热应激反应-是指在高温和热辐射作用下机体发生一系列生理学改变的过程, 严重可导致水、电解质代谢紊乱及神经系统功能损害等病理症状。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Borregaard L, Lyngsoe BK, Fenger-Eriksen C, et al. Acute liver failure following heat stroke after participating in a running event. *Ugeskr Laeger*. 2014;176(28):V01130075.
- [2] Glazer JL. Management of heatstroke and heat exhaustion. *Am Fam Physician*. 2005;71(11):2133-2140.
- [3] Lugo-Amador NM, Rothenhaus T, Moyer P. Heat-related illness. *Emerg Med Clin N Am*. 2004; 22:315-327.
- [4] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke. *N Engl J Med*. 2002; 346(25):1978-1988.
- [5] 刘志锋, 苏磊. 胃肠功能障碍与炎症反应在中暑发病机制中的作用[J]. *广东医学*, 2010, 31(6):787-788.
- [6] Bouchama A, Roberts F, Mohanna AL, et al. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke. *J Appl Physiol*. 2005;98: 697-705.
- [7] Eshel GM, Safar P, Stezoski W. The role of the gut in the pathogenesis of death due to hyperthermia. *Am J Forensic Med Pathol*. 2001;22 (1):100-104.
- [8] Leon LR, Blaha MD, DuBose DA. Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery. *J Appl Physiol*. 2006;100(4):1400-1409.
- [9] 苏磊. 重症中暑防治回顾与启示[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(9): 883-885.
- [10] Gathiram P, Gaffin SL, Brock-Utne JG, et al. Time course of endotoxemia and cardiovascular changes in heat-stressed primates. *Aviat Space Environ Med*. 1987;58:1071.
- [11] Shapiro Y, Alkan M, Epstein Y, et al. Increase in rat intestinal permeability to endotoxin during hyperthermia. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1986;55:410.
- [12] Hong JY, Lai YC, Chang CY, et al. Successful Treatment of Severe Heatstroke With Therapeutic Hypothermia by a Noninvasive External Cooling System. *Ann Emerg Med*. 2012; 59(6):491-493.
- [13] Horseman MA, Rather-Conolly J, Saavedra C, et al. A Case of Severe Heatstroke and Review of Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment. *J Intensive Care Med*. 2013; 28(6):334-40.
- [14] Bouchama A, Roberts G, Al Mohanna F, et al. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke. *J Appl Physiol*. 2005;98:697.
- [15] Minnema MC, Chang AC, Jansen PM, et al. Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with *Escherichia coli*. *Blood*. 2000;95:11-17.
- [16] Liu ZF, Liu JH, Liu YW, et al. Proteomic Analysis and Identification of Intestinal FBP as a Predictor of Gut Dysfunction During Heatstroke in Mice. *J SURG RES*. 2012; 173:332-340.
- [17] Tong HS, Liu YS, Wen Q, et al. Serum procalcitonin predicting mortality in exertional heatstroke. *Emerg Med J*. 2011; 29(2): 113-117.
- [18] Pan Z, Shao Y, Dong W, et al. Xuebijing attenuates hypotension through the upregulation of angiotensin II type 1 receptor associated protein 1 in rats suffering from heat stroke. *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1699-705.
- [19] Shapiro Y, Alkan M, Epstein Y, et al. Increase in rat intestinal permeability to endotoxin during hyperthermia. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1986;55 (4):410-412.
- [20] Gathiram P, Gaffin SL, Brockutne JG, et al. Time course of endotoxemia and cardiovascular changes in heat-stressed primates. *Aviat Space Environ Med*. 1987; 58(11):1071-1074.
- [21] Moseley PL, Gape NC, Wallen ES, et al. Thermal stress induces epithelial permeability. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1994;267(2):C425- C434.
- [22] Lambert GP, Gisolfic V, Berg DJ, et al. Molecular biology of thermoregulation selected contribution: hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J Appl Physiol*. 2002;92(4):1750-1761.
- [23] Vanuytsel T, Vanormelingen C, Vanheel H, et al. From intestinal permeability to dysmotility: the biobreeding rat as a model for functional gastrointestinal disorders. *PLoS One*. 2014;9(10):e111132.
- [24] 刘志锋, 曾平, 刘亚伟, 等. 脂多糖和热打击联合作用对人肠上皮细胞细胞骨架的影响[J]. *广东医学*, 2010, 31(18):2346-2348.
- [25] Bouchama A, al Hussein K, Adra C, et al. Distribution of peripheral blood leukocytes in acute heatstroke. *J Appl Physiol*. 1992;73 (2):405- 409.
- [26] Lu KC, Wang JY, Lin SH, et al. Role of circulating cytokines and chemokines in exertional heatstroke. *Crit Care Med*. 2004; 32 (2):399-403.
- [27] Hammami MM, Bouchama A, Al-Sedairy S, et al. Concentrations of soluble tumor necrosis factor and interleukin-6 receptors in heatstroke and heatstress. *Crit Care Med*. 1997;25(8):1314-1319.