

# 微小 RNA-206-3p 靶向热休克蛋白 90 $\alpha$ A1 在热射病大鼠脑神经炎症及线粒体功能障碍中的作用

王蕾<sup>1</sup> 沈一鸣<sup>2</sup> 彭强<sup>1</sup> 储鑫<sup>1</sup> 顾鹏<sup>2</sup> 张毅<sup>3</sup> 朱保锋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南通市第一人民医院(上海仁济医院南通医院)急诊医学科,南通 226001;<sup>2</sup>南通市第一人民医院(上海仁济医院南通医院)急诊重症监护室,南通 226001;<sup>3</sup>南通市第一人民医院(上海仁济医院南通医院)神经外科,南通 226001

通信作者:朱保锋,Email:bfzhunt1@163.com

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA-206-3p(miR-206-3p)通过调控热休克蛋白 90 $\alpha$ A1(HSP90 $\alpha$ A1)参与神经炎症和线粒体功能障碍的分子机制。方法 ① 体内实验:将 7 周龄雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组( $n=10$ )及热射病模型组( $n=10$ )。正常对照组大鼠常规饲养,不给予任何处理;热射病模型组将大鼠置于温湿度控制箱[温度( $40.0\pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度( $40\pm 1$ )%],构建热射病大鼠模型。采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估大鼠神经功能损伤情况并测定脑组织含水量。采用高尔基染色方法观察神经元形态学变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脑组织中炎症因子水平;采用荧光原位杂交(FISH)实验检测 miR-206-3p 与 HSP90 $\alpha$ A1 mRNA 在脑组织中的定位情况。② 体外实验:体外培养大鼠海马神经元细胞株 HT-22,将细胞分为空载体对照组[共转染 miR-206-3p 模拟物(mimic)阴性对照(NC)和 HSP90 $\alpha$ A1 过表达空载病毒(HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC)],miR-206-3p 过表达组(共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC)、HSP90 $\alpha$ A1 过表达组(共转染 miR-206-3p mimic-NC 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE)、共过表达组(共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE)。采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测脑组织中活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3/天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3/caspase-3)比值及 Bax、Bcl-2 蛋白表达;透射电镜下观察神经元中线粒体数量变化;采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测神经元中线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数;采用荧光探针法检测神经元中活性氧(ROS)含量;采用生物发光法检测神经元中三磷酸腺苷(ATP)含量。结果 ① 体内实验结果:随着热射损伤时间延长,热射病模型组大鼠 mNSS 评分、脑组织含水量及脑组织中白介素(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17A)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平均逐渐升高,6 h 达峰值,与正常对照组比较差异均有统计学意义[mNSS 评分(分): $12.70\pm 1.57$ 比 $2.00\pm 0.67$ ,脑组织含水量:( $82.37\pm 1.88$ )%比( $70.69\pm 1.75$ )%,IL-1 $\beta$ (ng/L): $5.56\pm 0.64$ 比 $1.00\pm 0.13$ ,IL-6(ng/L): $6.70\pm 0.84$ 比 $1.00\pm 0.10$ ,IL-10(ng/L): $4.92\pm 0.58$ 比 $1.00\pm 0.11$ ,IL-13(ng/L): $4.55\pm 0.53$ 比 $1.00\pm 0.09$ ,IL-17A(ng/L): $3.83\pm 0.44$ 比 $1.00\pm 0.11$ ,TNF- $\alpha$ (ng/L): $6.70\pm 0.72$ 比 $1.00\pm 0.09$ ,均 $P<0.05$ ];高尔基染色显示,随着热射损伤时间延长,大鼠神经元树突分枝数目呈逐渐降低趋势;FISH 实验显示,miR-206-3p 与 HSP90 $\alpha$ A1 共定位于大鼠海马 CA3 区神经元中,二者表达趋势相反,且热射损伤时间越长,二者差异越显著。② 体外实验结果:与空载体对照组相比,miR-206-3p 过表达组神经元凋亡途径被激活,并伴随线粒体数量减少、ATP 水平下降、ROS 积累和 mtDNA 损伤,而 HSP90 $\alpha$ A1 过表达组上述变化趋势则相反;与 miR-206-3p 过表达组比较,共过表达组神经元凋亡得到抑制[cleaved caspase-3/caspase-3 比值: $0.52\pm 0.05$ 比 $0.94\pm 0.08$ ,Bax 蛋白(Bax/GAPDH): $0.64\pm 0.07$ 比 $1.18\pm 0.11$ ,Bcl-2 蛋白(Bcl-2/GAPDH): $0.74\pm 0.08$ 比 $0.42\pm 0.04$ ,均 $P<0.05$ ],线粒体数量和 ATP 水平恢复[ATP( $\mu\text{mol/g}$ ): $46.88\pm 5.15$ 比 $24.42\pm 2.09$ , $P<0.05$ ],ROS 含量和 mtDNA 损伤程度降低[ROS(荧光强度): $33.05\pm 3.73$ 比 $59.72\pm 6.29$ ,mtDNA 拷贝数(相对倍数): $1.05\pm 0.12$ 比 $1.65\pm 0.13$ ,均 $P<0.05$ ]。结论 miR-206-3p 可通过靶向抑制 HSP90 $\alpha$ A1 的表达,调节细胞凋亡,影响线粒体功能,从而参与热射病导致中枢神经系统损伤的发生发展。

**【关键词】** 微小 RNA-206-3p;热休克蛋白 90 $\alpha$ A1;热射病;中枢神经系统;神经元细胞;细胞凋亡;线粒体损伤

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(Z2022067);江苏省南通市卫生健康委员会科研项目(MS2024019)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240425-00210

**MicroRNA-206-3p targeting heat shock protein 90 $\alpha$ A1 in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in a rat model of heat stroke**

Wang Lei<sup>1</sup>, Shen Yiming<sup>2</sup>, Peng Qiang<sup>1</sup>, Chu Xin<sup>1</sup>, Gu Peng<sup>2</sup>, Zhang Yi<sup>3</sup>, Zhu Baofeng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Emergency Medicine, Nantong First People's Hospital (Shanghai Renji Hospital Nantong Hospital), Nantong 226001, China; <sup>2</sup>Department of Emergency Intensive Care Unit, Nantong First People's Hospital (Shanghai

Renji Hospital Nantong Hospital), Nantong 226001, China; <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, Nantong First People's Hospital (Shanghai Renji Hospital Nantong Hospital), Nantong 226001, China  
Corresponding author: Zhu Baofeng, Email: bfzhunt1@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular mechanism of microRNA-206-3p (miR-206-3p) regulating heat shock protein 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1) in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction. **Methods** ① *In vivo* experiment: male Wistar rats (7 weeks old) were randomly divided into normal control group ( $n=10$ ) and heat stroke model group ( $n=10$ ). The rats in the normal control group were routinely fed and received no treatment. In the heat stroke model group, the heat stroke model was established by exposing rats to a controlled environment [temperature ( $40.0 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ , humidity ( $40 \pm 1$ )%]. Neurological function was assessed using modified Neurological Severity Score (mNSS) and brain water content was measured. Neuronal morphology was observed by Golgi staining. Inflammatory factors in the brain were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The localization of miR-206-3p and HSP90 $\alpha$ A1 mRNA in the brain was determined using fluorescence in situ hybridization (FISH). ② *In vitro* experiment: rat hippocampal neuronal cell line HT-22 was cultured *in vitro*, and the cells were divided into an empty vector control group [co-transfected with miR-206-3p mimic negative control (NC) and HSP90 $\alpha$ A1 overexpressing empty virus (HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC)], a miR-206-3p overexpressing group (co-transfected with miR-206-3p mimic and HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC), a HSP90 $\alpha$ A1 overexpressing group (co-transfected with miR-206-3p mimic-NC and HSP90 $\alpha$ A1 OE), and a co-overexpressing group (co-transfected with miR-206-3p mimic and HSP90 $\alpha$ A1 OE). Cleaved caspase-3/caspase-3 ratio and protein expressions of Bax and Bcl-2 were detected by Western blotting. Mitochondrial morphology was observed by transmission electron microscopy. Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number was quantified by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). Reactive oxygen species (ROS) levels were measured using fluorescent probe method. Adenosine triphosphate (ATP) levels were determined by bioluminescence assay. **Results** ① *In vivo* experiment results: with prolonged heat exposure, mNSS scores, brain water content and levels of interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in brain tissue were gradually increased in the heat stroke model group with peaking at 6 hours, and there was a statistically significant difference compared with the normal control group [mNSS score:  $12.70 \pm 1.57$  vs.  $2.00 \pm 0.67$ , brain water content: ( $82.37 \pm 1.88$ )% vs. ( $70.69 \pm 1.75$ )%, IL-1 $\beta$  (ng/L):  $5.56 \pm 0.64$  vs.  $1.00 \pm 0.13$ , IL-6 (ng/L):  $6.70 \pm 0.84$  vs.  $1.00 \pm 0.10$ , IL-10 (ng/L):  $4.92 \pm 0.58$  vs.  $1.00 \pm 0.11$ , IL-13 (ng/L):  $4.55 \pm 0.53$  vs.  $1.00 \pm 0.09$ , IL-17A (ng/L):  $3.83 \pm 0.44$  vs.  $1.00 \pm 0.11$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $6.70 \pm 0.72$  vs.  $1.00 \pm 0.09$ , all  $P < 0.05$ ]. Golgi staining revealed that with prolonged heat stroke injury, the number of dendritic branches in rat neurons gradually decreased. FISH experiment showed that miR-206-3p and HSP90 $\alpha$ A1 were co-localized in neurons of the rat hippocampal CA3 region, with opposite expression trends. Furthermore, the longer the duration of heat stroke injury, the more significant the difference between the two. ② *In vitro* experiment results: the neuronal apoptosis pathway was activated in the miR-206-3p overexpression group, accompanied by decreased mitochondrial number and ATP levels, and elevated ROS levels and mtDNA damage; however, the aforementioned trends were reversed in the HSP90 $\alpha$ A1 overexpression group. Compared with miR-206-3p overexpression group, neuronal apoptosis was inhibited in the co-overexpressing group [cleaved caspase-3/caspase-3 ratio:  $0.52 \pm 0.05$  vs.  $0.94 \pm 0.08$ , Bax protein (Bax/GAPDH):  $0.64 \pm 0.07$  vs.  $1.18 \pm 0.11$ , Bcl-2 protein (Bcl-2/GAPDH):  $0.74 \pm 0.08$  vs.  $0.42 \pm 0.04$ , all  $P < 0.05$ ], mitochondrial numbers and ATP levels were restored [ATP ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $46.88 \pm 5.15$  vs.  $24.42 \pm 2.09$ ,  $P < 0.05$ ], and ROS content and mtDNA damage were simultaneously reduced [ROS (fluorescence intensity):  $33.05 \pm 3.73$  vs.  $59.72 \pm 6.29$ , mtDNA copy number (relative fold):  $1.05 \pm 0.12$  vs.  $1.65 \pm 0.13$ , both  $P < 0.05$ ]. **Conclusion** miR-206-3p participates in heat stroke-induced central nervous system injury through targeting HSP90 $\alpha$ A1, which inhibits promotes apoptosis, and impairs mitochondrial function.

**【Key words】** MicroRNA-206-3p; Heat shock protein 90 $\alpha$ A1; Heat stroke; Central nervous system; Neuronal cell; Cell apoptosis; Mitochondrial damage

**Fund program:** Medical Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (Z2022067); Nantong Municipal Health Commission Research Project in Jiangsu Province (MS2024019)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240425-00210

热射病致中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤是其高病死率与预后不良的关键原因,但分子机制尚未彻底阐明。除热直接毒性导致脑水肿、颅内高压等宏观病理变化外<sup>[1-2]</sup>,在微观层面,由过热应激触发的级联反应,特别是失控的神经炎症与线粒体功能障碍,被认为是导致神经元死亡和神经功能缺损的核心环节<sup>[3]</sup>。深入解析这一调控网络,对于开发干预策略至关重要。

热休克蛋白 90 $\alpha$ A1 (heat shock protein 90 $\alpha$ A1, HSP90 $\alpha$ A1) 是细胞应对应激的关键守护者。在热

应激下, HSP90 $\alpha$ A1 通过稳定客户蛋白功能,抑制核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 等炎症通路的过度活化,并维持线粒体电子传递链的稳定性,从而抵御氧化应激与细胞凋亡。人群遗传学研究显示, HSP90 $\alpha$ A1 基因位点 g.31829044 的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 变异与个体的热耐受能力显著相关<sup>[4]</sup>,强烈提示其在热射病的病理中具有保护作用。然而,在热射病的极端应激下,这一保护机制如何被调控仍不清楚。

近年来,微小 RNA (microRNA, miRNA) 在应激

反应与神经系统疾病中的调控作用日益受到关注。微小 RNA-206-3p (microRNA-206-3p, miR-206-3p) 在焦虑、抑郁等神经精神疾病模型中表达上调,并参与调控神经炎症和突触功能<sup>[5]</sup>。生物信息学分析提示,miR-206-3p 与 HSP90 $\alpha$ 1 在多种免疫和应激信号通路中存在共富集<sup>[6]</sup>,预示两者可能存在靶向调控关系。因此推测,在热射病背景下,miR-206-3p 异常表达可能是打破细胞内稳态、使 HSP90 $\alpha$ 1 保护性功能失活的一个关键“分子开关”。神经炎症与线粒体功能障碍并非孤立事件。促炎细胞因子〔如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )〕可诱导线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量生成,而线粒体 ROS 又进一步激活 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体,形成致命的正反馈循环,最终导致不可逆的神经元损伤<sup>[7-8]</sup>。因此,同时探究神经炎症与线粒体功能障碍这两个密切相关的过程,对于完整理解热射病的神经病理机制具有逻辑上的必然性。本研究聚焦神经炎症与线粒体功能障碍这两个关键且相互加剧的病理环节,提出假设:miR-206-3p 通过直接靶向 HSP90 $\alpha$ 1,加剧神经炎症和线粒体功能障碍,从而促进热射病致 CNS 损伤。

## 1 材料与方法

### 1.1 体内实验

**1.1.1 样本量的确定:**基于预实验中热射病模型主要指标改良神经功能缺损评分(modified Neurological Severity Score, mNSS)、脑组织 IL-1 $\beta$  含量的效应量和标准差,利用 GPower 软件(version 3.1)进行统计效能分析。设定  $\alpha=0.05$ ,统计效能  $(1-\beta)=0.8$ ,计算出每组所需的最小样本量为  $n=8$ 。为确保结果的可靠性并考虑到可能的动物损耗,本研究将每组样本量扩大至  $n=10$ 。

**1.1.2 实验动物:**选择 80 只 7 周龄雄性 Wistar 大鼠,体质量 250~300 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2021-0006。所有动物实验已经获得南通市第一人民医院伦理委员会的批准(审批号:2021KT007),并符合实验动物管理和使用原则。

**1.1.3 热射病致 CNS 损伤大鼠模型构建及分组处理:**所有大鼠经尿烷(0.6 g/kg)和戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔麻醉满意后固定,采用随机数字表法分为正常对照组及热射病模型组。正常对照组大鼠置于温度

为  $(23.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、湿度为  $(40 \pm 1)\%$  的环境中,将核心体温维持在  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,不给予任何处理。热射病模型组大鼠置于温湿度控制箱中,条件设置为温度  $(40.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、湿度  $(40 \pm 1)\%$ ,每隔 10 min 监测 1 次肛温。当肛温  $\geq 40.5^\circ\text{C}$  时,认为热损失发病时间已到达,以后每隔 5 min 监测 1 次,将大鼠肛温达到  $42^\circ\text{C}$  作为制模成功的标志<sup>[9]</sup>。在数据采集和分析阶段均采用盲法。所有涉及实验操作、结果判读和数据分析的研究人员均不知晓实验动物的分组情况。每组样本均以随机编号进行标识,直至所有数据采集与分析完成后才进行揭盲。

### 1.1.4 检测指标及方法

**1.1.4.1 神经功能损伤检测:**采用 mNSS 评分评价大鼠神经功能损伤情况<sup>[10-11]</sup>,包括运动、感觉、平衡、反射 4 个方面,评分越高,说明神经功能障碍越严重。

**1.1.4.2 脑组织含水量检测:**处死大鼠取大脑皮质组织约 200 mg,快速放入预冷的离心管中,记录湿质量;离心干燥后,室温下放置 24 h 称干质量。脑组织含水量 =  $[(\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量}] \times 100\%$ 。

**1.1.4.3 神经元形态学观察:**取大鼠海马体脑组织(约  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ ),进行高尔基染色。组织经含重铬酸钾的溶液避光浸渍、硝酸银溶液镀银后,乙醇浓度梯度脱水,二甲苯中切片,中性香脂固定。光镜下观察海马区神经元树突分枝情况。

**1.1.4.4 炎症因子测定:**取海马体组织约 100 mg,冰磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)匀质,  $4^\circ\text{C}$  下  $12\ 000 \times g$  离心 15 min,取上清液,  $-80^\circ\text{C}$  下保存。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测脑组织裂解液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-13 和 IL-17A 水平。

**1.1.4.5 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 实验检测 miR-206-3p、HSP90 $\alpha$ 1 定位:**取含海马 CA3 区脑组织(约  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ ),经固定、脱水、石蜡切片、脱蜡后风干,组化笔画圈,滴加蛋白酶 K ( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 消化 20 min,用 PBS 洗涤 3 次;滴加 3% 甲醇- $\text{H}_2\text{O}_2$ ,避光室温孵育 15 min, PBS (pH 值 7.4) 摇床晃动洗涤 3 次;梯度乙醇脱水、风干;将探针在  $75^\circ\text{C}$  恒温水浴中温育 5 min,立即置于  $0^\circ\text{C}$  中冷却,使双链 DNA 探针变性。滴加  $10\ \mu\text{L}$  探针混合物至杂交区域,封口,  $37^\circ\text{C}$  孵育 15 h;洗去杂交液,用  $42 \sim 50^\circ\text{C}$  的  $2 \times$  柠檬酸钠缓冲盐溶液 (saline sodium citrate, SSC) 和  $1 \times$  SSC 分别洗涤 3 次后,风干 5 min;用大鼠抗神经元核抗原 (neuronal nuclei,

NeuN)抗体(ab279297)标记神经元,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)为细胞核着色,封片、晾干。荧光显微镜下观察海马 CA3 区神经元胞质内定位情况。

**1.1.4.6 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 miR-206-3p 与 HSP90 $\alpha$ A1 mRNA 表达:**取海马体组织约 30 mg,提取细胞总 RNA 并测定 RNA 的纯度和浓度,反转录成 cDNA,采取 PolyA 加尾法检测 miRNA,得到含 PolyA 尾的 miRNA cDNA。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;随后进行 40 个循环的 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 30 s(于此阶段采集荧光信号);最后绘制熔解曲线以验证扩增特异性。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法检测基因表达量,实验重复 3 次。

**1.1.4.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 HSP90 $\alpha$ A1 蛋白的表达:**取海马体组织约 50 mg,经 RIPA 裂解,12 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心取上清液,蛋白定量后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭;加入一抗 HSP90 $\alpha$ A1 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),4 °C 孵育;清洗后加入二抗山羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)室温孵育 1.5 h,用 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with tween, TBST)洗涤 3 次。应用 Image J 软件分析灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值代表目的蛋白表达量,实验重复 3 次。

## 1.2 体外实验

**1.2.1 细胞培养:**大鼠海马神经元细胞株 HT-22 购于武汉普诺赛公司。将细胞置于含 B-27、10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素 DMEM/F12 培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养。调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /mL,接种在 6 孔板上孵育。

**1.2.2 细胞分组及处理方法:**将细胞分为空载体对照组[共转染 miR-206-3p 模拟物(mimic)阴性对照(negative control, NC)和 HSP90 $\alpha$ A1 过表达空载病毒(HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC)],miR-206-3p 过表达组(共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE-NC)、HSP90 $\alpha$ A1 过表达组(共转染 miR-206-3p mimic-NC 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE)及共过表达组(共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90 $\alpha$ A1 OE)。按照病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 50 进行慢病毒感染后,将细胞置于

42 °C 预热培养箱中热应激 2 h,再置于 37 °C 正常生长温度下恢复 6 h,提取 RNA 和蛋白用于后续实验。

## 1.2.3 检测指标及方法

**1.2.3.1 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达:**收集细胞,用预冷的 PBS 清洗后,加入 RIPA 裂解液裂解,提取总蛋白,后续处理及定量方法同 1.1.4.7。

**1.2.3.2 透射电镜下观察线粒体数量变化:**将海马神经元在 2.5% 戊二醛溶液中 25 °C 固定 1 h,1% 四氧化锇/1.5% 亚铁氰化钾固定 1 h,丙酮多次洗涤脱水,嵌入树脂、切片至 50 nm 厚度,经醋酸铀酰和柠檬酸铅双重染色。应用透射电镜记录显微照片,通过 Image J 软件进行图像分析和定量。

**1.2.3.3 实时荧光 RT-qPCR 检测线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数:**提取细胞总 DNA,以 10 ng DNA 为模板,选择大鼠特异性引物,通过标准曲线法或比较阈值循环数法计算 mtDNA/核 DNA 比值,以此反映 mtDNA 拷贝数。

**1.2.3.4 荧光探针法检测 ROS 含量:**取海马神经元,DMEM 清洗 3 次,加入 10  $\mu$ mol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA),37 °C 孵育 20 min;DMEM 清洗 3 次,应用流式细胞仪检测二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF)荧光分布,测定 ROS 含量。

**1.2.3.5 生物发光法检测三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)含量:**取海马神经元悬液,密度调整为  $1 \times 10^5$ /mL,均匀接种于不透明 96 孔酶标板中,每孔 100  $\mu$ L,背景孔只含有 100  $\mu$ L 培养基,室温平衡 30 min;每孔加入 100  $\mu$ L 发光法细胞活性检测试剂振荡混匀,室温孵育 15 min,记录发光信号。通过已知浓度的 ATP 标准品绘制标准曲线,根据样品发光信号值计算 ATP 绝对浓度。

**1.3 统计学分析:**应用 GraphPad Prism 8.1 软件进行统计学分析。所有计量数据均符合正态分布,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 事后检验。检验水准  $\alpha$  值设定为 0.05,所有统计检验均为双侧检验。

## 2 结果

### 2.1 体内实验结果

**2.1.1 热射损伤对大鼠神经行为及功能的影响:**与正常对照组比较,热射病模型组大鼠 mNSS 评分和脑组织含水量均增加(均  $P < 0.05$ ;表 1),并且随着热射损伤时间延长呈逐渐升高趋势。表明热射病可

导致神经功能进行性恶化,且与脑水肿发展密切相关,提示制模成功。

**表 1 两组大鼠不同时间点 mNSS 评分和脑组织含水量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间	动物数 (只)	mNSS 评分 (分)	脑组织含水量 (%)
正常对照组		10	2.00 ± 0.67	70.69 ± 1.75
热射病模型组	0.5 h	10	3.20 ± 0.42 <sup>a</sup>	74.34 ± 1.24 <sup>a</sup>
	1.0 h	10	4.70 ± 0.48 <sup>a</sup>	75.57 ± 1.60 <sup>a</sup>
	2.0 h	10	5.30 ± 0.67 <sup>a</sup>	75.99 ± 1.49 <sup>a</sup>
	3.0 h	10	7.10 ± 0.74 <sup>a</sup>	77.93 ± 1.94 <sup>a</sup>
	4.0 h	10	8.70 ± 1.06 <sup>a</sup>	78.71 ± 1.25 <sup>a</sup>
	5.0 h	10	10.90 ± 1.20 <sup>a</sup>	80.51 ± 1.59 <sup>a</sup>
	6.0 h	10	12.70 ± 1.57 <sup>a</sup>	82.37 ± 1.88 <sup>a</sup>

注: mNSS 为改良神经功能缺损评分;与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;空白代表无此项

高尔基染色显示(图 1),与正常对照组比较,热射病模型组大鼠神经元树突分枝减少,并且随着热射损伤时间延长呈逐渐减少趋势。表明热射病可导致神经元结构受损,这可能是认知功能障碍的形态学基础。

**2.1.2 热射损伤对大鼠脑组织炎症因子水平的影响(表 2):**与正常对照组比较,热射病模型组大鼠脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-13 和 IL-17A 水平均增加(均  $P < 0.05$ ),并且随着热射损伤时间延长呈持续上升趋势。表明热射病可引发 CNS 显著且持续的炎症反应,提示脑内存在严重免疫微环境紊乱。

**表 2 两组大鼠不同时间点炎症指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间	动物数 (只)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-10 (ng/L)
正常对照组		10	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11
热射病模型组	0.5 h	10	1.73 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.15 <sup>a</sup>
	1.0 h	10	2.00 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.27 <sup>a</sup>
	2.0 h	10	2.54 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.25 <sup>a</sup>
	3.0 h	10	2.86 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.22 ± 0.40 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.35 <sup>a</sup>
	4.0 h	10	3.44 ± 0.41 <sup>a</sup>	4.30 ± 0.52 <sup>a</sup>	3.55 ± 0.39 <sup>a</sup>
	5.0 h	10	4.27 ± 0.54 <sup>a</sup>	5.60 ± 0.67 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.47 <sup>a</sup>
	6.0 h	10	5.56 ± 0.64 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.84 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.58 <sup>a</sup>

组别	时间	动物数 (只)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-13 (ng/L)	IL-17A (ng/L)
正常对照组		10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.11
热射病模型组	0.5 h	10	1.57 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.17 <sup>a</sup>
	1.0 h	10	2.11 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.18 <sup>a</sup>
	2.0 h	10	2.86 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.22 <sup>a</sup>
	3.0 h	10	3.73 ± 0.44 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.23 <sup>a</sup>
	4.0 h	10	4.49 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.01 ± 0.39 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.30 <sup>a</sup>
	5.0 h	10	5.42 ± 0.63 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.39 ± 0.38 <sup>a</sup>
	6.0 h	10	6.70 ± 0.72 <sup>a</sup>	4.55 ± 0.53 <sup>a</sup>	3.83 ± 0.44 <sup>a</sup>

注:IL 为白细胞介素,TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;空白代表无此项

**2.1.3 热射损伤对脑组织 miR-206-3p、HSP90 $\alpha$ A1 表达的影响:**FISH 实验显示(图 2),miR-206-3p 和 HSP90 $\alpha$ A1 mRNA 主要表达于海马 CA3 区神经元,且存在共定位。与正常对照组比较,热射病模型组海马 CA3 区 miR-206-3p 高表达、HSP90 $\alpha$ A1 低表达,且热射损伤时间越长,二者差异越显著。RT-qPCR 和 Western blotting 证实了 FISH 实验结果(图 3;表 3)。

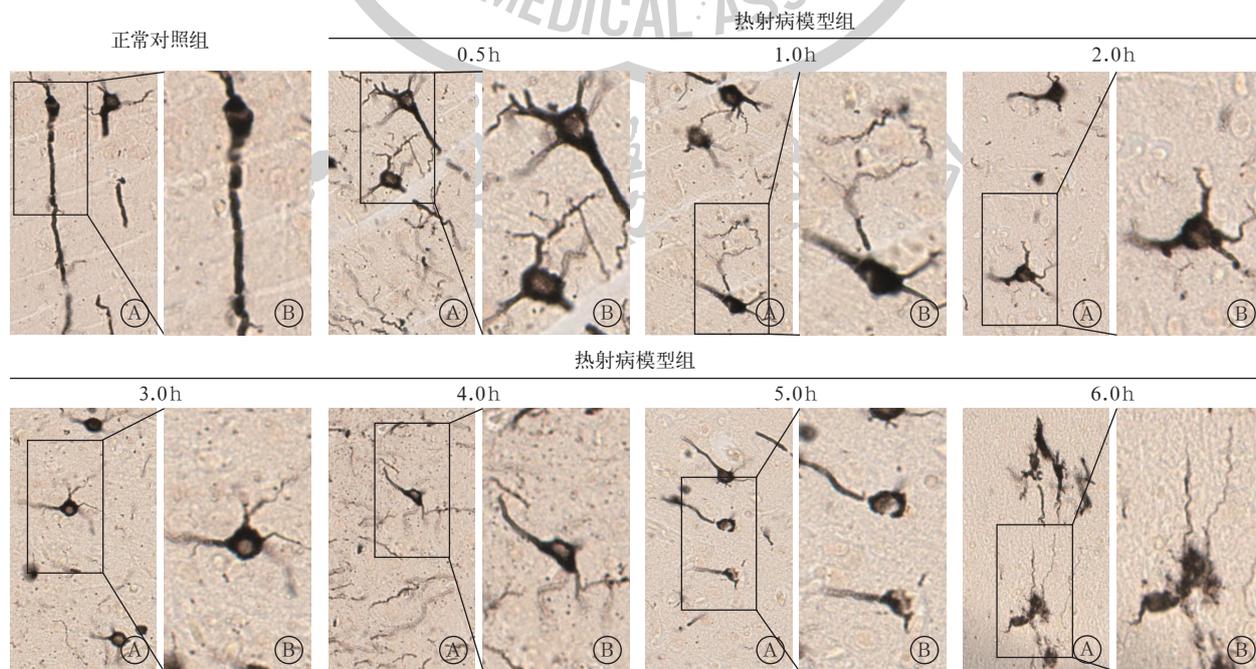


图 1 光镜下观察两组大鼠神经功能损伤程度 正常对照组大鼠海马 CA1 区锥体神经元排列规整,树突主干粗壮,次级树突分枝密集且延伸良好,树突棘分布密集均匀;热射病模型组随着热射损伤时间延长,大鼠树突分枝逐渐减少,甚至出现树突断裂和萎缩现象,树突棘密度下降 高尔基染色 A 中倍放大 B 高倍放大

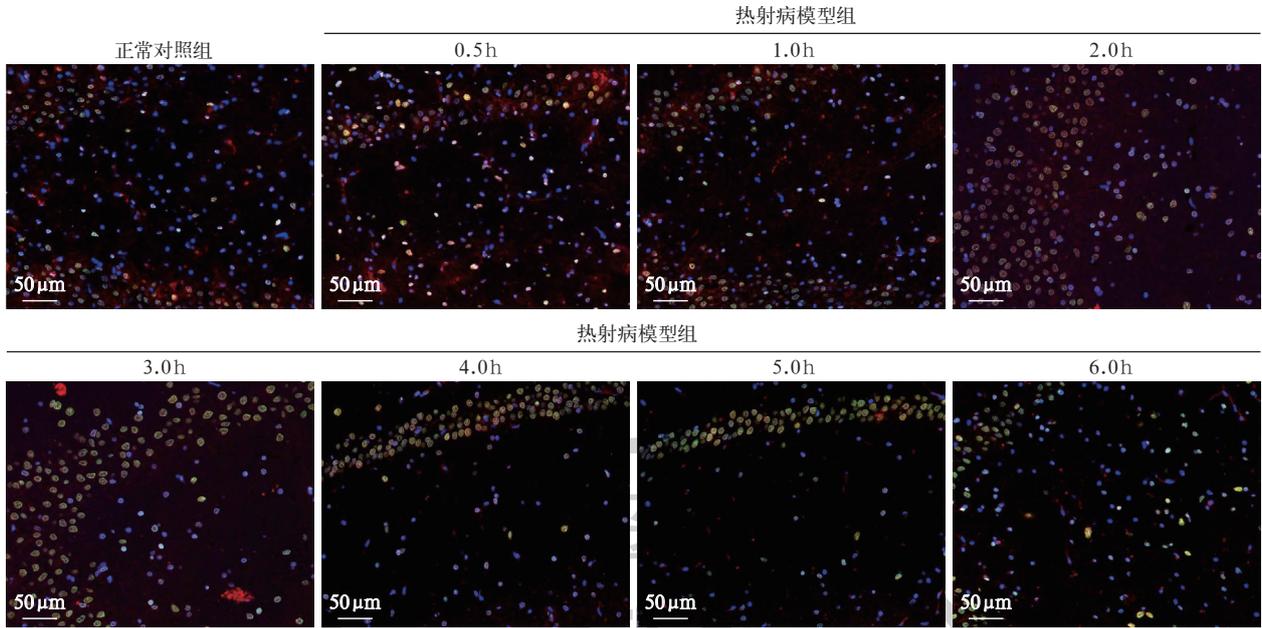


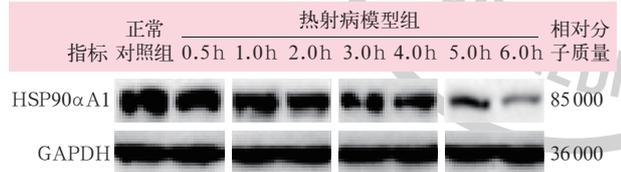
图 2 荧光显微镜下观察两组大鼠脑组织微小 RNA-206-3p(miR-206-3p)与热休克蛋白 90αA1(HSP90αA1)定位情况。红色荧光代表 HSP90αA1 mRNA 表达,绿色荧光代表 miR-206-3p 表达,蓝色荧光代表神经元核抗原(NeuN)信号(标记成熟神经元细胞核)。正常对照组大鼠海马 CA3 区神经元结构完整,胞质内可见稀疏的红色 HSP90αA1 mRNA 信号均匀分布,绿色 miR-206-3p 信号微弱且弥散,红绿信号共定位区域极少。热射病模型组 0.5~2.0 h 神经元内红色 HSP90αA1 mRNA 信号逐渐减弱且分布趋于稀疏,绿色 miR-206-3p 信号开始增强且呈点簇状聚集,出现局部红绿信号共定位;3.0 h 和 4.0 h 红色 HSP90αA1 mRNA 信号进一步减弱且部分神经元中信号近乎消失,绿色 miR-206-3p 信号显著增强且形成密集簇状结构,红绿共定位区域明显增多;5.0 h 和 6.0 h 红色 HSP90αA1 mRNA 信号极度微弱且残存信号呈碎片化分布,绿色 miR-206-3p 信号强烈富集且占据大部分胞质区域,红绿共定位广泛存在且以绿色信号为主导。荧光染色。高倍放大。

表明热射病可诱发脑组织 miR-206-3p 持续高表达并抑制 HSP90αA1 表达,两者之间存在潜在的靶向调控关系,可能共同参与热射病 CNS 损伤的进程。

## 2.2 体外实验结果

**2.2.1 miR-206-3p 和 HSP90αA1 参与海马神经元凋亡(图 4; 表 4):** Western blotting 检测结果显示,与空载体对照组相比,miR-206-3p 过表达组神经元中 cleaved caspase-3/caspase-3 比值和 Bax 蛋白表达升高、Bcl-2 蛋白表达降低(均  $P < 0.05$ ),而 HSP90αA1 过表达组上述蛋白表达变化趋势相反(均  $P < 0.05$ );与 miR-206-3p 过表达组相比,共过表达组海马神经元中 cleaved caspase-3/caspase-3 比值和 Bax 蛋白表达均降低、Bcl-2 蛋白表达升高(均  $P < 0.05$ )。表明 miR-206-3p 通过抑制 HSP90αA1 表达,激活了线粒体凋亡通路;外源性过表达 HSP90αA1 可有效阻断该通路,抑制神经元凋亡。

**2.2.2 miR-206-3p 和 HSP90αA1 对海马神经元线粒体及能量代谢的影响:** 透射电镜下观察显示(图 5),与空载体对照组相比,miR-206-3p 过表达组神经元中线粒体数量减少,HSP90αA1 过表达组线粒体数量增加;与 miR-206-3p 过表达组相比,共过表达组神经元线粒体数量增加。提示 miR-206-3p 可能通过抑制 HSP90αA1 表达,导致神经元线粒体生物合成受损或线粒体降解加速;恢复 HSP90αA1 表达则有助于维持线粒体稳态,从而拮抗热应激诱导的神经元损伤。



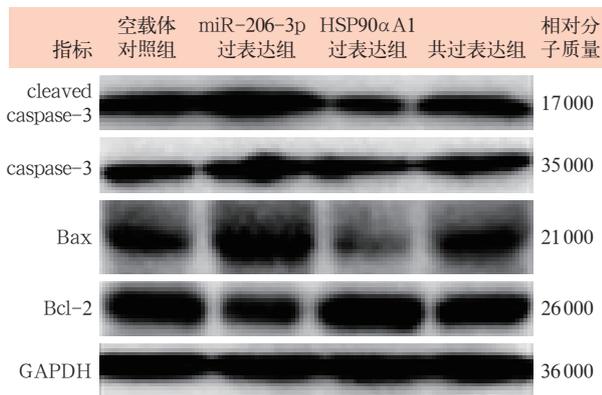
注:Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验,HSP90αA1 为热休克蛋白 90αA1,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 Western blotting 检测两组大鼠不同时间点脑组织 HSP90αA1 蛋白表达

表 3 两组大鼠不同时间点脑组织 miR-206-3p 及 HSP90αA1 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	动物数(只)	miR-206-3p ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	HSP90αA1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	HSP90αA1 蛋白(HSP90αA1/GAPDH)
正常对照组		10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	1.43 ± 0.12
热射病模型组	0.5 h	10	1.47 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.11 <sup>a</sup>
	1.0 h	10	1.60 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.08 <sup>a</sup>
	2.0 h	10	1.78 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.07 <sup>a</sup>
	3.0 h	10	1.96 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.07 <sup>a</sup>
	4.0 h	10	2.15 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>
	5.0 h	10	2.34 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>a</sup>
	6.0 h	10	2.61 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.04 <sup>a</sup>

注:miR-206-3p 为微小 RNA-206-3p,HSP90αA1 为热休克蛋白 90αA1,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;空白代表无此项



注：空载体对照组共转染微小 RNA-206-3p (miR-206-3p) 模拟物 (mimic) 阴性对照 (NC) 和热休克蛋白 90αA1 (HSP90αA1) 过表达空载病毒 (OE-NC), miR-206-3p 过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE-NC, HSP90αA1 过表达组共转染 miR-206-3p mimic-NC 和 HSP90αA1 OE, 共过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE; Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, cleaved caspase-3 为活化 caspase-3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 Western blotting 检测各组大鼠海马神经元中凋亡相关蛋白表达

表 4 各组大鼠海马神经元中凋亡相关蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	cleaved caspase-3/caspase-3 比值	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH)
空载体对照组	3	0.49 ± 0.05	0.60 ± 0.07	0.78 ± 0.08
miR-206-3p 过表达组	3	0.94 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>a</sup>
HSP90αA1 过表达组	3	0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.12 <sup>a</sup>
共过表达组	3	0.52 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.08 <sup>b</sup>
F 值		71.608	66.863	58.110
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：空载体对照组共转染微小 RNA-206-3p (miR-206-3p) 模拟物 (mimic) 阴性对照 (NC) 和热休克蛋白 90αA1 (HSP90αA1) 过表达空载病毒 (OE-NC), miR-206-3p 过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE-NC, HSP90αA1 过表达组共转染 miR-206-3p mimic-NC 和 HSP90αA1 OE, 共过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE; caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, cleaved caspase-3 为活化 caspase-3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空载体对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 miR-206-3p 过表达组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

RT-qPCR 检测结果显示 (表 5), 与空载体对照组相比, miR-206-3p 过表达组神经元 mtDNA 拷贝数

增加, 而 HSP90αA1 过表达组神经元 mtDNA 拷贝数降低 (均  $P < 0.05$ ); 与 miR-206-3p 过表达组相比, 共过表达组神经元 mtDNA 拷贝数降低 ( $P < 0.05$ )。

流式细胞仪检测结果显示 (表 5), 与空载体对照组相比, miR-206-3p 过表达组神经元 ROS 含量升高, 而 HSP90αA1 过表达组神经元 ROS 含量降低 (均  $P < 0.05$ ); 与 miR-206-3p 过表达组相比, 共过表达组神经元 ROS 含量降低 ( $P < 0.05$ )。

生物发光法检测结果显示 (表 5), 与空载体对照组相比, miR-206-3p 过表达组神经元 ATP 含量减少, 而 HSP90αA1 过表达组神经元 ATP 含量增加 (均  $P < 0.05$ ); 与 miR-206-3p 过表达组相比, 共过表达组神经元 ATP 含量增加 ( $P < 0.05$ )。

以上检测结果表明, miR-206-3p 能够通过抑制 HSP90αA1 表达, 诱导 mtDNA 损伤、氧化应激加剧和能量代谢障碍; 而恢复 HSP90αA1 表达可显著改善线粒体功能, 减轻神经元损伤。

表 5 各组大鼠海马神经元中 mt-DNA 拷贝数及 ROS、ATP 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	mt-DNA 拷贝数 (相对倍数)	ROS (荧光强度)	ATP ( $\mu\text{mol/g}$ )
空载体对照组	3	1.00 ± 0.09	35.11 ± 3.28	48.06 ± 5.91
miR-206-3p 过表达组	3	1.65 ± 0.13 <sup>a</sup>	59.72 ± 6.29 <sup>a</sup>	24.42 ± 2.09 <sup>a</sup>
HSP90αA1 过表达组	3	0.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	18.54 ± 2.07 <sup>a</sup>	76.19 ± 7.45 <sup>a</sup>
共过表达组	3	1.05 ± 0.12 <sup>b</sup>	33.05 ± 3.73 <sup>b</sup>	46.88 ± 5.15 <sup>b</sup>
F 值		56.049	51.034	44.490
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：空载体对照组共转染微小 RNA-206-3p (miR-206-3p) 模拟物 (mimic) 阴性对照 (NC) 和热休克蛋白 90αA1 (HSP90αA1) 过表达空载病毒 (OE-NC), miR-206-3p 过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE-NC, HSP90αA1 过表达组共转染 miR-206-3p mimic-NC 和 HSP90αA1 OE, 共过表达组共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE; mtDNA 为线粒体 DNA, ROS 为活性氧, ATP 为三磷酸腺苷; 与空载体对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 miR-206-3p 过表达组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

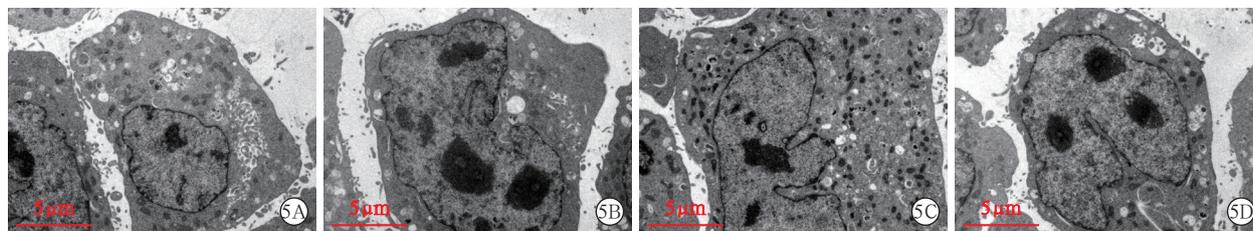


图 5 透射电镜下观察各组大鼠海马神经元中线粒体数量变化 空载体对照组 [共转染微小 RNA-206-3p (miR-206-3p) 模拟物 (mimic) 阴性对照 (NC) 和热休克蛋白 90αA1 (HSP90αA1) 过表达空载病毒 (OE-NC)] 大鼠海马神经元胞质内线粒体数量丰富, 形态结构完整, 嵴膜清晰可见 (A); miR-206-3p 过表达组 (共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE-NC) 线粒体数量减少, 残留线粒体明显肿胀, 嵴膜断裂或消失 (B); HSP90αA1 过表达组 (共转染 miR-206-3p mimic NC 和 HSP90αA1 OE) 线粒体数量增多, 形态饱满, 嵴膜结构完整清晰 (C); 共过表达组 (共转染 miR-206-3p mimic 和 HSP90αA1 OE) 线粒体数量较 miR-206-3p 过表达组恢复, 形态结构基本正常 (D) 醋酸铀-柠檬酸铅染色 ×8000

### 3 讨论

热射病常伴随严重的 CNS 功能障碍,当遭受严重热应激后,海马体和小脑特别容易遭受影响,导致高病死率或永久性神经系统后遗症<sup>[12]</sup>,进而导致脑缺血、缺氧和神经元损伤<sup>[13]</sup>。本课题组前期研究表明,热射病早期神经炎症涉及小胶质细胞向促炎的 M1 型极化,且环状 RNA circchipk3 可调控其向抗炎的 M2 型转化<sup>[14]</sup>;生物信息学分析提示,HSP90 $\alpha$ 1 是热射病神经损伤关键基因<sup>[15]</sup>。本研究利用热射病大鼠模型揭示了 miR-206-3p/HSP90 $\alpha$ 1 轴可能通过协调神经炎症和线粒体功能障碍驱动神经损伤,为靶向治疗提供了新思路。在本研究中发现,热射病神经功能损伤表现为脑组织中炎症因子水平升高,神经元树突分枝形态改变及数目减少;miR-206-3p 与 HSP90 $\alpha$ 1 共定位于大鼠海马 CA3 区神经元中,随着热射损伤时间延长,miR-206-3p 的表达逐渐升高,HSP90 $\alpha$ 1 表达逐渐降低。说明 miR-206-3p 可能通过下调 HSP90 $\alpha$ 1 的表达,参与热射病中的神经元凋亡与线粒体损伤过程。

miRNA 是一类内源性小分子非编码 RNA,在细胞分化、细胞凋亡、心脏病、神经系统疾病、癌症等多种生物学和病理过程中发挥着重要作用<sup>[16]</sup>。已知 miR-206 存在 miR-206-3p 和 miR-206-5p 两种形态。已有研究者证实了 miR-206 在 CNS 中的作用,其中 miR-206-3p 通过脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)信号通路可控制海马神经发生与神经元可塑性<sup>[17]</sup>。研究表明,下调 miR-206-3p 表达可提高细胞活性、减少细胞凋亡数量并增加集落数<sup>[18]</sup>;miR-206-3p 靶基因参与了轴突导向、神经营养信号通路、内吞、谷氨酸能突触等通路<sup>[19]</sup>。

细胞通过协调合成 HSP 以应对环境压力,相对分子质量为 90 000 的 HSP90 是一种高度保守的蛋白质,在应激条件下重折叠某些变性蛋白质方面起着重要作用。蛋白激酶 B(Akt)-HSP90 复合物的形成稳定了 Akt 激酶活性,并通过阻止磷酸化 Akt 去磷酸化保护细胞免于发生凋亡<sup>[20]</sup>。HSP90 $\alpha$ 1 可以直接结合或激活 Akt 激酶,在神经元中表现出抗细胞凋亡作用<sup>[21]</sup>。

大脑损伤是热射病的一种普遍表现,经典中暑实验大鼠模型研究表明,缺血可能是主要原因<sup>[22]</sup>。缺血继发于颅内压升高和脑流量减少,可导致广泛的神经元损伤或凋亡。研究表明,miR-206-3p 上调可诱导细胞周期停滞并激活细胞凋亡<sup>[23]</sup>。短发夹

RNA(short hairpin RNA, shRNA)敲低 HSP90 $\alpha$ 1 可以促进细胞凋亡,而 HSP90 $\alpha$ 1 过表达能够抵抗细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究中观察到,大鼠遭受热射损伤后,海马组织中 miR-206-3p 表达量升高、HSP90 $\alpha$ 1 表达量降低;随着热射损伤时间延长,miR-206-3p 表达量逐渐增加,而 HSP90 $\alpha$ 1 表达量逐渐降低。本研究中体外实验 Western blotting 检测结果显示,与空载体对照组相比,miR-206-3p 过表达组神经元中 cleaved caspase-3/caspase-3 比值和 Bax 蛋白表达升高、Bcl-2 蛋白表达降低,而 HSP90 $\alpha$ 1 过表达组上述蛋白表达变化趋势相反;与 miR-206-3p 过表达组相比,共过表达组海马神经元中 cleaved caspase-3/caspase-3 比值和 Bax 蛋白表达均降低、Bcl-2 蛋白表达升高。这些结果表明,热射病后脑组织细胞凋亡增加,可能是由于发病后 miR-206-3p 通过抑制 HSP90 $\alpha$ 1 表达,激活了线粒体凋亡通路,导致神经元损伤;外源性过表达 HSP90 $\alpha$ 1 可有效阻断该通路,抑制神经元凋亡。

炎症反应是热射病神经损伤的重要环节,脑缺血缺氧/再灌注后炎症细胞活化了促炎因子分泌,进一步加重了炎症反应和血脑屏障损伤,进而诱导神经细胞损伤。在本研究中发现,热射病大鼠脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-13 和 IL-17A 水平均随着热射损伤时间延长逐渐增加,且病理学观察结果提示神经主要及次要分枝显著减少。有文献报道,mtDNA 拷贝数改变可影响线粒体功能,细胞中 mtDNA 拷贝数减少可损害线粒体呼吸,并导致神经病变等多种病理变化<sup>[25]</sup>。本研究通过透射电镜观察到,过表达 miR-206-3p 的海马神经元中线粒体数量和 ATP 含量均减少,ROS 和 mtDNA 均增加,提示存在线粒体损伤;而同时过表达 miR-206-3p 和 HSP90 $\alpha$ 1 的神经元中线粒体数量及 ATP 含量均增加,ROS 及 mtDNA 均减少。表明早期持续热应激状态下,miR-206-3p 上调和 HSP90 $\alpha$ 1 抑制共同参与了海马神经元细胞线粒体损伤,导致线粒体能量紊乱。

本研究表明,热射病大鼠模型脑组织中促炎细胞因子(如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )升高与线粒体损伤指标改变(mtDNA 拷贝数增加、ROS 积累、ATP 耗竭)同时出现,提示这两种病理过程可能存在密切的交互作用。既往研究表明,炎症因子(如 TNF- $\alpha$ )可诱导线粒体中 ROS 大量产生,而线粒体 ROS 又能进一步激活 NLRP3 炎症小体等通路,加剧神经炎症反应,

从而形成一个驱动神经元损伤的正反馈循环<sup>[26]</sup>。尽管本研究结果支持神经炎症激活与线粒体功能障碍在热射病神经损伤中共存,但尚未通过实验直接验证神经炎症-线粒体 ROS-NLRP3 激活轴形成的正反馈循环。阐明神经炎症与线粒体损伤之间的具体交互作用机制,是未来研究的重要方向。

综上所述,神经炎症与线粒体功能障碍是热射病致 CNS 损伤的重要病理过程。本研究结果提示,miR-206-3p 可能通过靶向抑制 HSP90 $\alpha$ A1 的表达,进而促进神经元凋亡,并参与热射病致 CNS 损伤的发生。需要指出的是,本研究虽表明 miR-206-3p 可能负向调控了 HSP90 $\alpha$ A1,但是尚未通过双荧光素酶报告基因实验等经典方法对两者的直接靶向关系进行验证;此外,体内干预实验和更大样本量的验证也仍有待后续开展并完善。本课题组计划在进一步研究中构建 HSP90 $\alpha$ A1 野生型及突变型 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'UTR)报告载体,通过双荧光素酶实验等提供直接机制证据,并在动物层面开展干预研究,系统阐明 miR-206-3p/HSP90 $\alpha$ A1 轴在热射病神经损伤中的作用,为临床转化提供更坚实的依据。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王蕾: 酝酿和设计实验, 起草文章, 统计分析, 获取研究经费; 沈一鸣: 实施研究, 采集数据, 统计分析; 彭强: 实施研究, 采集数据; 储鑫: 实施研究, 采集数据, 起草文章; 顾鹏: 起草文章, 统计分析; 张毅: 分析/解释数据, 统计分析; 朱保锋: 酝酿和设计实验, 对文章的知识性内容作批评性审阅

## 参考文献

- [1] He SX, Li R, Peng YM, et al. ACSL4 contributes to ferroptosis-mediated rhabdomyolysis in exertional heat stroke[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(3): 1717-1730. DOI: 10.1002/jcsm.12953.
- [2] Périard JD, 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.
- [3] Lee JKW, Tan B, Ogden HB, et al. Exertional heat stroke: nutritional considerations[J]. *Exp Physiol*, 2022, 107(10): 1122-1135. DOI: 10.1113/EP090149.
- [4] Alele FO, Otto JR, Malau-Aduli BS, et al. Next generation sequencing of genotype variants and genetic association between heat shock proteins HSPA1B single nucleotide polymorphism at the g.31829044 locus and heat tolerance: pilot quasi-experimental study[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1465. DOI: 10.3390/biom12101465.
- [5] Zhao F, Zhang N, Zhang Y. A new strategy for ultrasensitive detection based on target microRNA-triggered rolling circle amplification in the early diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(17): 9490. DOI: 10.3390/ijms25179490.
- [6] Chu F, Lu CQ, Jiao Z, et al. Unveiling the lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network in arsenic-induced nerve injury in rats through high-throughput sequencing[J]. *Toxics*, 2023, 11(12): 953. DOI: 10.3390/toxics11120953.
- [7] Ma Y, Liu ZQ, Deng LL, et al. FGF21 attenuates neuroinflammation following subarachnoid hemorrhage through promoting mitophagy and inhibiting the cGAS-STING pathway[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 436. DOI: 10.1186/s12967-024-05239-y.
- [8] Samanta S, Akhter F, Roy A, et al. New cyclophilin D inhibitor rescues mitochondrial and cognitive function in Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2024, 147(5): 1710-1725. DOI: 10.1093/brain/awad432.
- [9] Liu TT, Hu CH, Tsai CD, et al. Heat stroke induces autophagy as a protection mechanism against neurodegeneration in the brain[J]. *Shock*, 2010, 34(6): 643-648. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181e761c1.
- [10] Chen SF, Hsu CW, Huang WH, et al. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(8): 1279-1296. DOI: 10.1038/bjp.2008.345.
- [11] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011. DOI: 10.1161/01.str.32.4.1005.
- [12] Xia DM, Wang XR, Zhou PY, et al. Research progress of heat stroke during 1989-2019: a bibliometric analysis[J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(1): 5. DOI: 10.1186/s40779-021-00300-z.
- [13] Zhang Y, Deng ZH, Li Y, et al. Mesenchymal stem cells provide neuroprotection by regulating heat stroke-induced brain inflammation[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 372. DOI: 10.3389/fneur.2020.00372.
- [14] 王蕾, 沈一鸣, 钱晨, 等. Circhipk3 对热射病神经损伤中小胶质细胞极化的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2021, 30(4): 452-458. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.04.014.
- [15] Wang L, Shen YM, Chu X, et al. Molecular investigation and preliminary validation of candidate genes associated with neurological damage in heat stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6312-6327. DOI: 10.1007/s12035-024-03968-1.
- [16] Yapjakis C. Regulatory role of microRNAs in brain development and function[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1195: 237-247. DOI: 10.1007/978-3-030-32633-3\_32.
- [17] Guan W, Xu DW, Ji CH, et al. Hippocampal miR-206-3p participates in the pathogenesis of depression via regulating the expression of BDNF[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105932. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105932.
- [18] Wu K, Li JC, Qi Y, et al. SNHG14 confers gefitinib resistance in non-small cell lung cancer by up-regulating ABCB1 via sponging miR-206-3p[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 108995. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108995.
- [19] Peng D, Wang YJ, Xiao YJ, et al. Extracellular vesicles derived from astrocyte-treated with haFGF14-154 attenuate Alzheimer phenotype in AD mice[J]. *Theranostics*, 2022, 12(8): 3862-3881. DOI: 10.7150/thno.70951.
- [20] Zhang WW, Jia P, Lu XB, et al. Capsid protein from red-spotted grouper nervous necrosis virus induces incomplete autophagy by inactivating the HSP90ab1-AKT-MTOR pathway[J]. *Zool Res*, 2022, 43(1): 98-110. DOI: 10.24272/zj.issn.2095-8137.2021.249.
- [21] Zhang S, Fan SL, Wang ZL, et al. Capecitabine regulates HSP90A1 expression and induces apoptosis via Akt/SMARCC1/AP-1/ROS axis in T cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1012509. DOI: 10.1155/2022/1012509.
- [22] Xu AC, Huang F, Chen E, et al. Hyperbaric oxygen therapy attenuates heatstroke-induced hippocampal injury by inhibiting microglial pyroptosis[J]. *Int J Hyperthermia*, 2024, 41(1): 2382162. DOI: 10.1080/02656736.2024.2382162.
- [23] Wang XW, Xi XQ, Wu J, et al. MicroRNA-206 attenuates tumor proliferation and migration involving the downregulation of NOTCH3 in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(3): 1402-1410. DOI: 10.3892/or.2015.3731.
- [24] Xiao X, Wang W, Li YQ, et al. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 201. DOI: 10.1186/s13046-018-0880-6.
- [25] Zhang ZJ, Yang DZ, Zhou BX, et al. Decrease of MtDNA copy number affects mitochondrial function and involves in the pathological consequences of ischaemic stroke[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(15): 4157-4168. DOI: 10.1111/jcmm.17262.
- [26] Qin P, Sun Y, Li LY. Mitochondrial dysfunction in chronic neuroinflammatory diseases (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2024, 53(5): 47. DOI: 10.3892/ijmm.2024.5371.

(收稿日期: 2024-04-25)

(本文编辑: 孙茜 张耘菲)