

DOI: 10.16369/j.ohcr.issn.1007-1326.2023.05.020

· 调查研究 ·

基于基因表达数据库(GEO)的大鼠中暑神经损伤 mRNA 表达差异分析

王蕾¹, 姜岱山², 朱保锋¹, 贾寒雨³, 沈君华¹, 张毅³

1. 南通大学第二附属医院急诊中心, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学附属医院急诊中心, 江苏 南通 226001;
3. 南通大学第二附属医院科教科; 江苏 南通 226001

摘要: 目的 基于基因表达数据库(GEO)分析大鼠中暑神经损伤的基因表达差异, 探讨 lncRNA-miRNA-mRNA 共表达调控网络(ceRNA 网络)参与中暑神经损伤的作用。方法 通过 GEO 数据库检索中暑相关数据集 GSE64778 获得差异表达基因(differential expression genes, DEGs), 结合 GeneCards 和 CTD 数据库检索中暑相关靶基因, 取交集筛选获得候选靶基因。采用 R 语言对中暑相关候选靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析; 进一步 STRING 数据库构建靶基因的交互作用网络图, 并对关键基因进行相关性分析获得核心基因。通过 RNAInter、miRWalk 及 RAID2 数据库对候选靶基因的上游 miRNA 进行预测, 再利用 miRDB 数据库预测与 lncRNA 靶向结合的 miRNA, 筛选并构建 lncRNA-miRNA-mRNA 共表达调控通路。结果 GSE64778 数据集的 SRA 数据筛选, 共获得 1 178 个 DEGs, 其中 322 个上调, 856 个下调。GeneCards 数据库筛选到 2 914 个基因, CTD 数据库筛选到 2 377 个基因。将 GSE64778 数据集差异表达排名前 300 的基因, 与 GeneCards 和 CTD 数据库检索结果取交集, 最终筛选出 25 个候选 DEGs。GO 功能注释结果表明靶基因主要参与细胞凋亡、应激反应以及细胞过程的负调控, 在蛋白质二聚化和蛋白结合等过程中发挥功能。KEGG 富集分析提示候选靶基因主要富集在 PI3K-Akt 信号通路。蛋白-蛋白交互作用(PPI)网络分析 *Hsp90aa1* 是 degree 值最高的枢纽基因, 且在 PI3K-Akt 信号通路中富集。对 *Hsp90aa1* 基因的上游 miRNA 以及候选 lncRNA 的靶 miRNA 进行预测, 锁定 3 个 lncRNAs、8 个 miRNAs 和 1 个 mRNA, DIANA TOOLS 数据库通路富集和相关性分析得到 LOC102547734 与 miR-206-3p、miR-206-3p 与 *Hsp90aa1* 存在靶向结合位点。**结论** 基于生物信息学分析, 中暑神经损伤与细胞凋亡、应激反应以及细胞过程的负调控相关; LOC102547734-miR-206-3p-*Hsp90aa1* 调控网络可能抑制中暑神经损伤的发生。

关键词: 中暑; 神经损伤; 基因表达; ceRNA 网络; *Hsp90aa1*; PI3K-Akt 信号通路; miR-206-3p; LOC102547734

中图分类号: R135.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1326(2023)05-0623-08

引用: 王蕾, 姜岱山, 朱保锋, 等. 基于基因表达数据库(GEO)的大鼠中暑神经损伤 mRNA 表达差异分析[J]. 职业卫生与应急救援, 2023, 41(5): 623-630.

Differential analysis of mRNA expression of neurological damage caused by heat stroke in rats based on GEO database WANG Lei¹, JIANG Daishan², ZHU Baofeng¹, JIA Hanyu³, SHEN Junhua¹, ZHANG Yi³ (1. Emergency Center of the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Emergency Center of the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 3. Department of Science and Education, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective The gene expression differences of heat stroke-induced nerve injury in rats based on the GEO database were analyzed to explore the role of the lncRNA-miRNA-mRNA co-expression regulatory network involved in nerve injury caused by heat stroke. **Methods** The GEO database was used to retrieve the heat-stroke-related dataset GSE64778 to obtain differentially expressed genes (DEGs), and the GeneCards and CTD databases were combined to retrieve heat-stroke-related target genes, and the candidate target genes were obtained by intersection screening. The R language was used to enrich GO and KEGG for heat-stroke-related candidate target genes. Furthermore, STRING

基金项目:江苏省卫生健康委员会医学研究项目(Z2022067);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(2019-WSW-199);南通市卫健委课题(MB2021018、MB2021026)

作者简介:王蕾(1986—),女,硕士,主治医师

通信作者:张毅,副主任医师,E-mail:zhangyi9285@sina.com

database was used to construct the interaction network map of target genes and correlation analysis of key genes to obtain core genes. Prediction of upstream miRNAs of candidate target genes by the RNAInter, miRWALK, and RAID2 databases, and then prediction of miRNAs that bind to lncRNA targets by the miRDB database to screen and construct a lncRNA-miRNA-mRNA co-expression regulatory network. **Results** SRA data screening of the GSE64778 dataset yielded 1 178 DEGs, of which 322 were up-regulated and 856 were down-regulated. 2 914 genes were screened from the GeneCards database, and 2 377 genes were screened from the CTD database. The top 300 differentially expressed genes in the GSE64778 dataset were intersected with the GeneCards and CTD database search results, and 25 candidate DEGs were finally screened. GO functional annotation results indicated that the target genes were mainly involved in apoptosis, stress response, and negative regulation of cellular processes and functioned in processes such as protein dimerization and protein binding. KEGG enrichment analysis suggested that the candidate target genes were mainly enriched in the PI3K-Akt signaling pathway, and *Hsp90aa1* was the pivotal gene with the highest degree value and was enriched in the PI3K-Akt signaling pathway by PPI network analysis. Prediction of upstream miRNAs of the *Hsp90aa1* gene and target miRNAs of candidate lncRNAs targeted 3 lncRNAs, 8 miRNAs, and 1 mRNA. DIANA TOOLS database pathway enrichment and correlation analysis revealed targeted binding sites between LOC102547734 and miR-206-3p, miR-206-3p and *Hsp90aa1*.

Conclusions Based on bioinformatics analysis, we found that heat-shot-induced nerve injury is associated with apoptosis, stress response, and negative regulation of cellular processes. The LOC102547734-miR-206-3p-*Hsp90aa1* regulatory network may inhibit the occurrence of heat-shot nerve injury.

Keywords: heat stroke; nerve damage; gene expression; ceRNA network; *Hsp90aa1*; PI3K-Akt signal pathway; miR-206-3p; LOC102547734

中暑(heat stroke)是高温环境下由于热平衡和(或)水盐代谢紊乱等引起的一种以中枢神经系统和(或)心血管系统障碍为主要表现的急性热致疾病^[1-2],但是目前中暑所致神经损伤的发病机制尚未完全阐明^[3-4]。本研究拟通过检索美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中中暑神经损伤相关的基因芯片数据集,筛选出与中暑发病相关的关键因子,并结合在线数据库,构建lncRNA-miRNA-mRNA共表达网络(ceRNA网络),探讨ceRNA网络在中暑神经损伤中发挥的作用,为阐明中暑神经损伤的发生机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

GEO数据库转录组测序数据获取:利用GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>),以“heat stroke(中暑)”“neurotoxic(神经毒性)”“circulating whole blood(外周全血)”为关键词,并将物种限定为“*Rattus norvegicus*(大鼠)”,实验类型限定为:“expression profiling by high throughput sequencing(高通量测序表达谱分析)”,获得数据集检索结果GSE64778数据集(注释平台:GPL14844)。该数据集中包含有14例因高热环境(39℃)致大鼠神经毒性及6例正常大鼠(对照组)的全血转录组数据。将该

数据集中的上述20例样本确定为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 质量控制和参考基因组比对

研究对象RNA测序的原始数据直接从SRA(Sequence Read Archive,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs/>)下载,在Linux环境中将其转换为fastq数据^[5]。利用FastQC软件(v0.11.8,www.bioinformatics.babraham.ac.uk)对数据的总体质量、平均质量、碱基组成GC含量、N碱基(未知碱基)比例、序列长度以及重复性等方面进行评估^[6]。随后,利用Cutadapt软件(v1.18,www.bioinformatics.babraham.ac.uk)去除fastq数据接头序列和N碱基含量超过5%的片断(reads),其中相关参数设置为允许错配和插入缺失、允许部分匹配^[7]。随后,使用FASTX Toolkit软件(v0.0.13,http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)提取70%碱基质量在20以上的reads^[8],并使用BBMap软件(<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>)对双端序列进行修复^[9]。最后通过hisat2软件(0.7.12)将过滤后的高质量reads片段与大鼠参考基因组进行比对^[10]。

1.2.2 差异基因表达分析

基于lncRNAs和mRNAs的reads数使用R语言“edgeR”包对lncRNAs和mRNAs进行差异表达分析,设置 $|logFC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 为差异基因筛选标准。使用R的“ggplot2”软件包绘制火山图和差异表达基因(differential expression genes, DEGs)箱线图,

同时使用 R 软件“heatmap”包绘制差异基因表达热图。使用 R 语言“corrplot”包对候选基因的 mRNA 表达进行相关性分析。

1.2.3 疾病相关数据库检索

选择 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 CTD (<http://ctdbase.org/>) 数据库筛选 heat stroke 相关的靶基因，并将来源于 GeneCards 数据库 relevance score ≥ 1 和来源于 CTD 数据库中 inference score ≥ 1 的靶基因定义为疾病相关靶基因。由于该数据库中检索到的基因为人类疾病相关基因，随后使用“homologene”R 包对人疾病靶基因和大鼠基因进行了同源转化，获得大鼠 heat stroke 相关的靶基因。

1.2.4 候选基因功能富集分析

使用 jvenn 工具 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 对数据集 GSE64778 获得的中暑所致神经毒性差异基因和前述疾病相关靶基因取交集，获得候选基因。为进一步明确候选基因在中暑所致神经毒性发生、发展的过程中所扮演的生物学角色，明确其潜在的分子调控关系，为中暑所致神经毒性的防治靶点提供依据，继续进行了差异基因的 GO 和 KEGG 分析。首先将获得的这些基因导入 Network Ontology Analysis (<http://app.aporc.org/NOA/>) 和 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) 数据库，进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，并将获得的结果通过 ImageGP 网站 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/index.php/Home/Index/index.html>) 进行可视化，绘制生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 个条目富集结果，以及 KEGG 通路富集分析结果的气泡图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.5 候选基因蛋白互作网络构建

将候选基因导入 STRING 数据库 (https://cn.string-db.org/cgi/input?sessionId=b92G0n5gdTKt&input_page_show_search=off) 获取蛋白-蛋白交互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络，物种条件选择为 “*Rattus norvegicus*”，构建调控关系网络，进一步导入 Cytoscape (v3.6.0) 软件进行关联性和可视化分析，用颜色表示 degree 值和 combine score 值的大小，并根据 degree 值对候选基因进行排序。

1.2.6 在线数据库预测候选基因的上游 miRNAs 和 lncRNAs

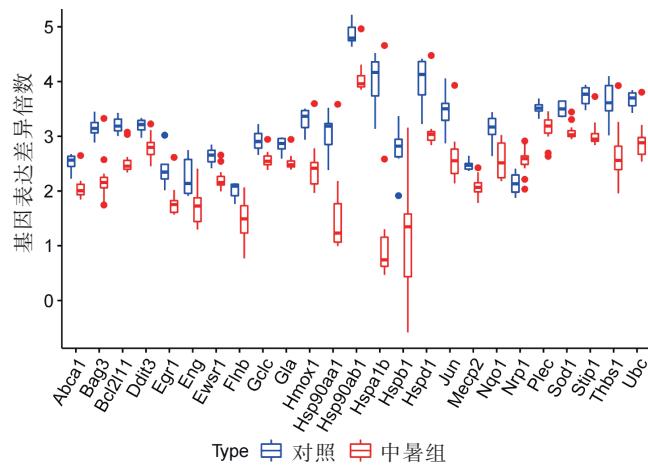
利用 miRWALK (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)、RAID v2.0 (<http://www.rna-society.org/raid2/index.html>) 和 RNAInter (<http://rnainter.org/>) 数据库对候选靶基因 (mRNA) 的上游 miRNAs 进行预测，

利用 jvenn 工具对得到的结果取交集处理。利用 miRDB (<http://mirdb.org/index.html>) 数据库预测靶向候选 lncRNAs 的 miRNAs，之后构建 lncRNA-miRNA-mRNA 共表达调控网络，并利用 Cytoscape (v3.6.0) 进行图片可视化。通过 DIANA TOOLS 数据库下的 mirPath v.3 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath/index>) 工具分析候选 miRNAs 靶基因所富集的通路。

2 结果

2.1 大鼠中暑神经损伤相关基因表达差异分析

对 GSE64778 的 SRA 数据进行 mRNA 差异分析，获得 1 178 个差异表达基因 (DEGs)，其中 322 个表达上调，856 个表达下调。通过 GeneCards 数据库检索 heat stroke 获得 2 914 个基因，CTD 数据库检索 heat stroke 获得 2 377 个基因。将 GSE64778 数据集中差异表达排名前 300 的基因 (按 P 值排序)，与 GeneCards 和 CTD 数据库检索结果取交集，最终筛选出 25 个候选 DEGs (*Gla*、*Plec*、*Ddit3*、*Gclc*、*Mecp2*、*Ewsr1*、*Sod1*、*Abca1*、*Flnb*、*Nqo1*、*Eng*、*Bcl2l11*、*Ubc*、*Jun*、*Hmox1*、*Egr1*、*Stip1*、*Hspd1*、*Hspa1b*、*Hsp90aa1*、*Hsp90ab1*、*Bag3*、*Thbs1*、*Hspb1* 和 *Nrp1*)。中暑组候选基因和对照组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。表达箱线图见图 1。



注：对照组： $n = 6$ ，中暑组： $n = 14$ 。

图 1 大鼠中暑发生相关候选基因差异表达箱线图

2.2 DEGs GO 功能和 KEGG 通路富集分析

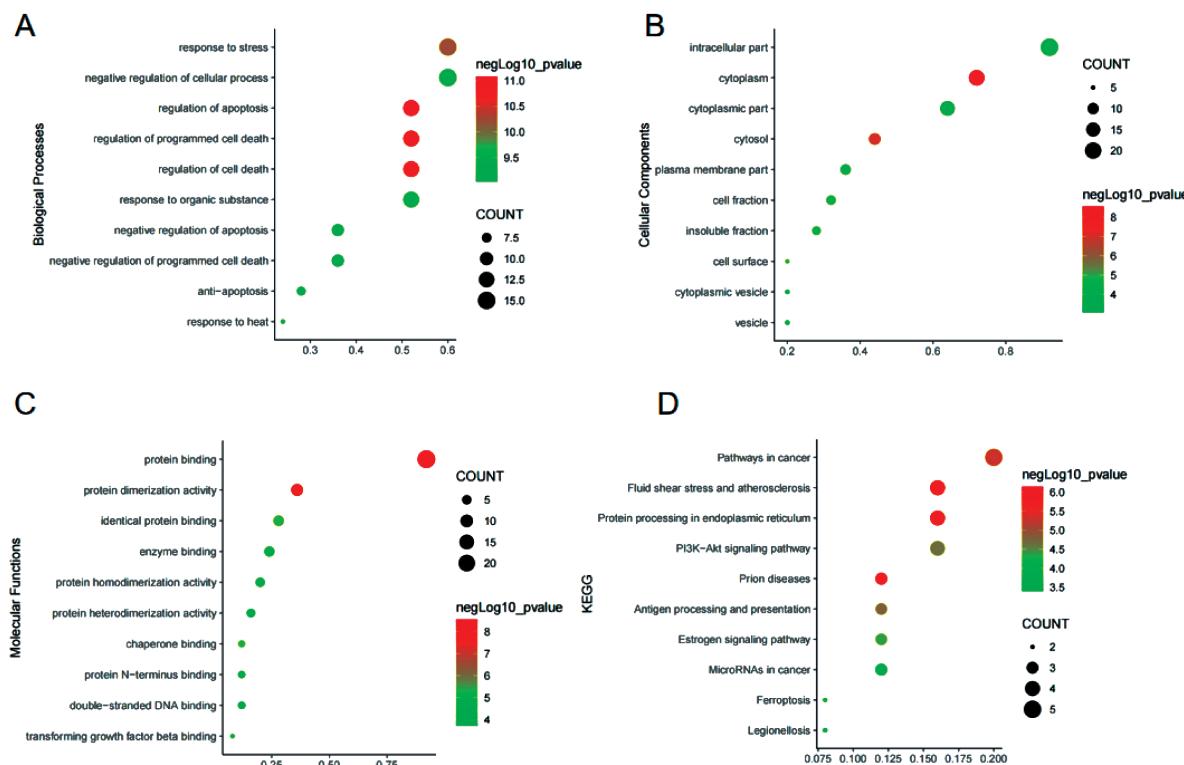
对 25 个候选 DEGs 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析，GO 分析结果显示：DEGs 在生物学过程中主要富集在 regulation of apoptosis (GO: 0042981)、regulation of programmed cell death (GO: 0043067)、response to stress (GO: 0006950) 和 negative regulation of cellular process (GO: 0048523) 等条目；在

细胞学组分层面主要富集在 intracellular part (GO: 0044424)、cytoplasm(GO:0005737)、cytoplasmic part(GO: 0044444)和 cytosol(GO:0005829)等条目；在生物学功能中主要富集在 protein binding (GO:0005515)、protein dimerization activity (GO:0046983)、enzyme binding (GO:0019899) 和 identical protein binding (GO:0042802)等条目(图 2 的 A、B、C)。功能注释显示，细胞组分主要富集于细胞内或细胞质中，参与细胞凋亡、应激反应以及细胞过程的负调控，在蛋白质二聚化和蛋白结合等过程中发挥功能。

KEGG 通路分析发现：DEGs 主要富集在 pathways in cancer (rno05200)、PI3K –Akt signaling pathway (rno04151)、fluid shear stress and atherosclerosis (rno05418) 和 protein processing in endoplasmic reticulum(rno04141)条目(图 2D)。

2.3 差异表达基因相关蛋白的 PPI 分析

运用 STRING 在线数据库对富集分析中获得的 DEGs 进行 PPI 分析，从而获得蛋白相互作用关系，接着导入 Cytoscape 软件中，构建 PPI 网络，PPI 网络关系图涉及 25 个节点和 142 条边，颜色由蓝变红，对应的 degree 值和 combine score 值逐渐变大（图 3A）。根据 degree 值进行排序，结果发现：*Hsp90aa1*、*Jun*、*Hsp90ab1*、*Hmox1*、*Ddit3*、*Egr1*、*Hspb1* 和 *Sod1* 的 degree 值较高，其中 *Hsp90aa1* 的 degree 值最高（图 3B）。利用数据集 GSE64778 中的表达数据对这 8 个基因的表达量进行相关性分析发现：*Hsp90aa1*、*Jun*、*Hmox1* 和 *Ddit3* 与其他基因的正相关较强（图 3C），其中 *Hsp90aa1*、*Hsp90ab1* 和 *Hspb1* 的差异倍数较大。此外，KEGG 通路分析结果显示：*Hsp90aa1* (*Hsp90*) 调控 Akt 蛋白磷酸化，在 PI3K–Akt 信号通路(rno04151)中发挥了重要功能（图 3D）。



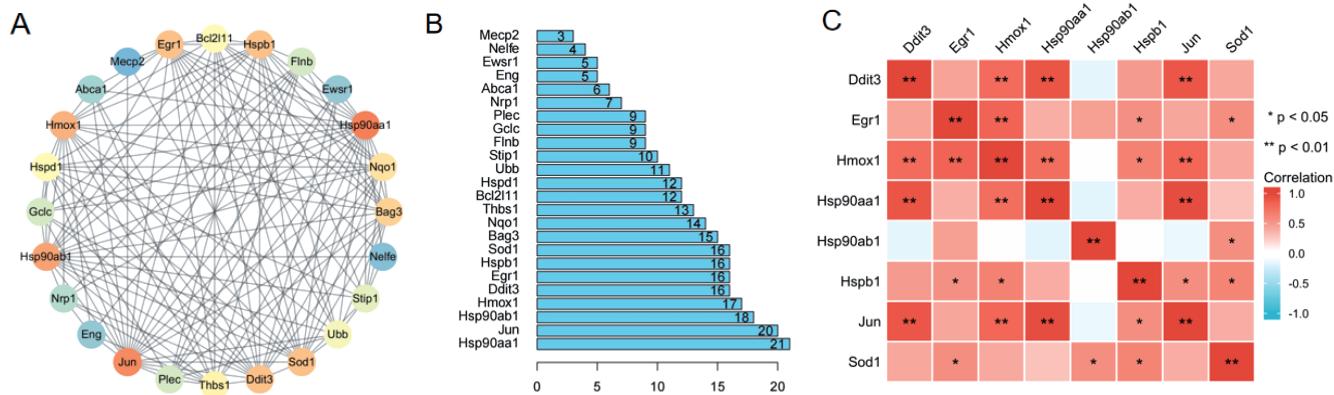
注：图 A：DEGs 在生物学过程(BP)中的 GO 功能分析。横坐标表示差异基因的个数占比。纵坐标表示不同的路径(pathway)，自上而下对应的中文名称：对应激的反应、细胞过程负调控、细胞凋亡的调控、细胞程序性死亡、细胞死亡调控、对有机物反应、细胞凋亡的负调控、程序性细胞死亡负调控、抗凋亡、对热的反应。

图 B：细胞学组分(CC)层面的 GO 功能分析。横坐标表示差异基因的个数占比。纵坐标表示不同的路径(pathway)，自上而下对应的中文名称：细胞内部分、细胞质、胞质部分、胞浆、质膜部分、细胞分数、包涵体部分、细胞表面、细胞质囊泡、细胞囊。

图 C：生物学功能(MF)层面的 GO 功能分析。横坐标表示差异基因的个数占比。纵坐标表示不同的路径(pathway)，自上而下对应的中文名称：蛋白质结合、蛋白质二聚化活性、相同蛋白结合、酶结合、蛋白质同二聚化活性、蛋白质异二聚化活性、伴侣结合、蛋白质 N 端结合、双链 DNA 结合、转化生长因子 β 结合。

图 D：KEGG 通路富集分析。横坐标表示差异基因的个数占比。纵坐标表示不同的路径(pathway)，自上而下对应的中文名称：癌症途径、流体剪切力与动脉粥样硬化、内质网的蛋白加工、pi3k-akt 信号通路、朊病毒疾病、抗原加工和递呈、雌激素信号通路、MicroRNA 在癌症的作用、铁死亡、军团菌病。

图 2 大鼠中暑发生相关候选基因的功能富集分析



注:图A:PPI网络图,节点表示蛋白,边表示蛋白间的相互关联。图B:25个候选DEGs按照degree值排序的条形图;横坐标表示degree值,纵坐标表示DEGs。图C:DEGs在heat stroke组中表达量的相关性。

图3 大鼠 *Hsp90aa1* 参与调控中暑神经损伤

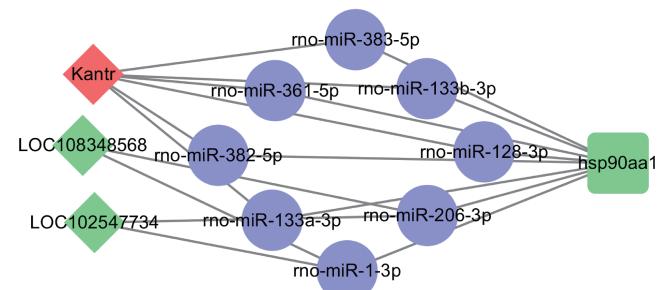
2.4 miRNAs 和 lncRNAs 的筛选

通过检索 miRWALK 数据库得到 422 个 miRNAs, RAID2 数据库得到 33 个 miRNAs, RNAInter 数据库得到 40 个 miRNAs, 将以上 3 个数据库的筛选结果取交集得到 12 个 miRNAs (rno-miR-128-3p、rno-miR-133a-3p、rno-miR-144-3p、rno-miR-181b-5p、rno-miR-206-3p、rno-miR-383-5p、rno-miR-361-5p、rno-miR-224-5p、rno-miR-1-3p、rno-miR-133b-3p、rno-miR-382-5p 和 rno-miR-384-5p)。

对 GSE64778 数据集进行 lncRNAs 差异分析, 共获得 7 个显著差异表达的 lncRNAs, 其中 3 个表达上调 (LOC102547954、Kantr 和 LOC102549714), 4 个表达下调 (LOC100910854、LOC102550036、LOC102547734 和 LOC108348568)。然后通过 miRDB 数据库预测靶向这 7 个 lncRNAs 的 miRNAs, 并与上述筛选得到的 12 个 miRNAs 取交集, 发现仅靶向 Kantr、LOC102547734 和 LOC108348568 的 miRNAs 与靶向 *Hsp90aa1* 的 miRNAs 有交集。进一步通过 Cytoscape 软件得到 lncRNA-miRNA-mRNA 的网络关系图, 网络图中包含 3 个 lncRNAs、8 个 miRNAs 和 1 个 mRNA(图 4)。

2.5 中暑神经损伤的关键 ceRNA 调控网络与信号通路

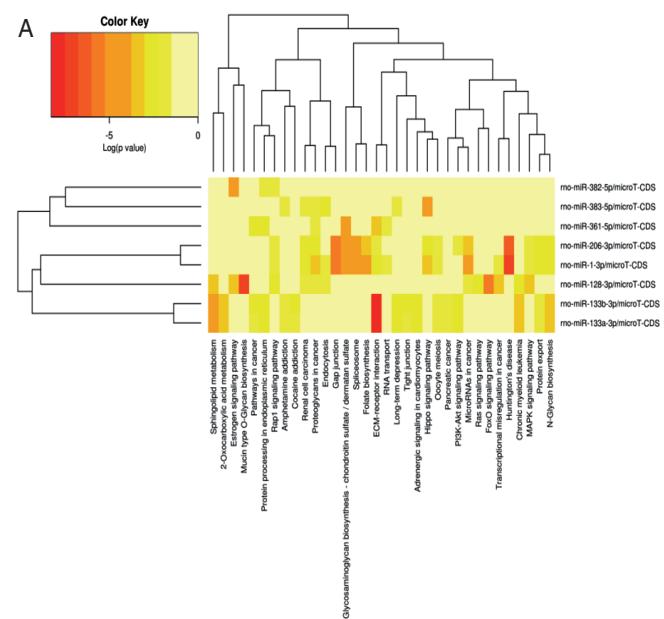
通过 DIANA TOOLS 数据库下的 mirPath v.3 工具, 分析 ceRNA 网络中 8 个 miRNAs 靶基因所富集的通路, 结果显示: rno-miR-133a-3p、rno-miR-133b-3p 和 rno-miR-206-3p 的靶基因在 PI3K-Akt 信号通路中明显富集(图 5A)。通过 RNAInter 数据库的 IntaRNA 工具分析 miRNAs 与 *Hsp90aa1* 的靶向结合关系, 发现:rno-miR-361-5p、rno-miR-206-3p 和 rno-miR-1-3p 与 *Hsp90aa1* 的靶向结合关系更强。

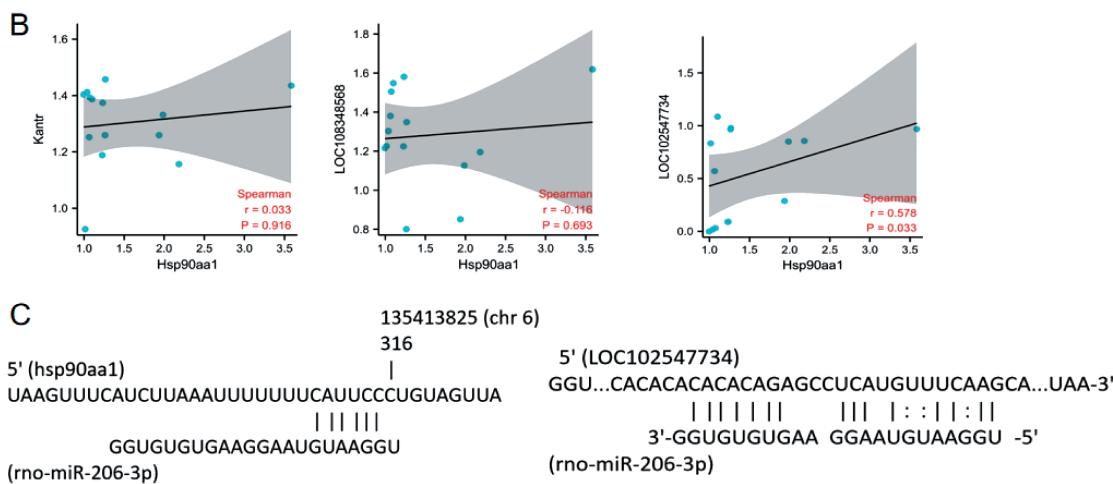


注:菱形表示 lncRNA, 圆形表示 miRNA, 方形为 *Hsp90aa1*。

图4 大鼠 lncRNA-miRNA-*Hsp90aa1* 调控关系网络图

对 *Hsp90aa1* 与 Kantr、LOC102547734 和 LOC108348568 表达的相关性进行分析, 发现:Kantr 和 LOC108348568 与 *Hsp90aa1* 相关性不显著, LOC102547734 与 *Hsp90aa1* 为显著强相关(图 5B)。miRmap 和 IntaRNA 工具分析结果发现: LOC102547734 与 miR-206-3p、miR-206-3p 与 *Hsp90aa1* 存在靶向结合位点(图 5C)。





注:图A:mirPath v.3分析miRNAs靶基因富集通路,横坐标表示不同的通路,自左向右对应的中文名称为:鞘脂代谢、氧化羧酸代谢、雌激素信号通路、黏蛋白O-聚糖生物合成、癌症中的途径、内质网中的蛋白质加工、Rap1信号通路、苯丙胺成瘾、可卡因成瘾、肾细胞癌、癌症中的蛋白聚糖、胞吞作用、间隙连接、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮肤素、剪切体、叶酸生物合成、ECM受体相互作用、RNA运输、长期抑郁症、紧密连接、心肌细胞肾上腺素能信号转导、Hippo信号通路、卵母细胞减数分裂、胰腺癌、Pi3k-akt信号通路、MicroRNA在癌症中的作用、ras信号通路、Foxo信号通路、癌症中的转录失调、亨廷顿病、慢性粒细胞白血病、MAPK信号通路、蛋白质输出、N-聚糖生物合成。图B:Spearman分析Hsp90aa1与Kantr、LOC102547734和LOC108348568表达的相关性。图C:LOC102547734与miR-206-3p、miR-206-3p与Hsp90aa1的靶向结合位点。

图5 调控大鼠中暑神经损伤的关键ceRNA调控

3 讨论

既往研究^[11]表明中暑的发病机制源于热暴露导致的直接细胞损害和全身炎症反应之间复杂的相互作用,最终出现脏器损害或多器官功能障碍综合征的过程。近期的研究表明肌浆网钙离子释放通道基因(*RYR1*)、集钙蛋白基因(*CASQ1*)等遗传标志物参与中暑的发病过程^[12],大量m6A峰可能与热刺激所致的绵羊肝脏损伤相关^[13],热刺激后的猪肝脏和脂肪中HSP70/HSP27蛋白表达明显升高^[14],但是缺少靶器官损伤内在机制的深入研究。由于脑是中暑损伤的主要器官之一,因此课题组尝试进行中暑脑损伤预后关键基因的筛查。研究中利用GEO数据中相关DEG分析表明,靶基因主要参与细胞凋亡、应激反应以及细胞过程的负调控,在蛋白质二聚化和蛋白结合等过程中发挥功能。据文献报道BDNF-TrkB-PI3K/Akt可能是参与调控中暑神经损伤的主要信号通路之一^[15-17],且PI3K-Akt信号通路的激活可减轻局灶性脑缺血性神经损伤^[18-19]。本次研究中KEGG富集分析提示候选靶基因主要富集在PI3K-Akt信号通路,说明PI3K-Akt信号通路可能参与调控中暑神经损伤。靶向调控炎症反应及其信号通路可为中暑神经损伤提供研究理论依据。

本研究中利用生物信息学分析结果发现*Hsp90aa1*、*Jun*、*Hsp90ab1*、*Hmox1*、*Ddit3*、*Egr1*、*Hspb1*

和*Sod1*的degree值较高,其中*Hsp90aa1*的degree值最高,可能在中暑神经损伤发生发展中扮演重要角色。*Hsp90α*是一种细胞质伴侣蛋白,在生物进化过程中高度保守,近年来成为广谱的肿瘤标志物之一^[20]。同时*Hsp90α*也与炎症相关的免疫过程密切相关,它能诱导多种促炎细胞因子并有效增强细胞外免疫系统^[21]。有文献^[22]研究表明,丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate,EP)可诱导*Hsp90*表达减轻中暑诱导的多器官功能障碍和炎症反应,激活*Hsp90*表达可改善阿尔兹海默症小鼠的认知缺陷。提示*Hsp90aa1*可能介导PI3K-Akt信号通路调控中暑神经损伤。

2011年哈佛大学医学院癌症遗传学家Pandolfi首次提出细胞内广泛存在ceRNA分子(mRNA、LncRNA、假基因等),提出了一种全新的基因表达调控模式。ceRNA将多种ncRNA(如miRNA、LncRNA)和mRNA整合在一个调控网络里,能够通过miRNA应答元件(microRNA response element, MRE)竞争结合相同的miRNA,调节彼此的表达水平^[23-24],在许多细胞过程如细胞分化、组织器官发育中发挥重要作用。在中暑诱导的血管内皮细胞损伤中存在外泌体miRNAs和lncRNAs的异常表达,中暑患者循环外泌体中的miRNAs表达变化与炎症反应相关^[25]。也有研究^[26-27]发现,miR-155可促进热应激诱导的小胶质细胞炎症反应,说明miRNAs

和 lncRNAs 可能在中暑中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤中发挥重要作用。但目前 miRNAs 和 lncRNAs 等与中暑关系的研究还较少。为探究 lncRNA/miRNA 靶向 *Hsp90aa1* 调控中暑 CNS 损伤的机制, 本研究首先通过 RNAInter、miRWALK 及 RAID2 数据库对 *Hsp90aa1* 的上游 miRNAs 进行预测, 选定物种为大鼠。通过筛选交集基因构建 lncRNA–miRNA–mRNA 的网络关系图, 发现仅靶向 Kantr、LOC102547734 和 LOC108348568 的 miRNAs 与靶向 *Hsp90aa1* 的 miRNAs 有交集, 构建 lncRNA–miRNA–mRNA 网络图中包含 3 个 lncRNAs、8 个 miRNAs 和 1 个 mRNA。结果显示 rno–miR–133a–3p、rno–miR–133b–3p 和 rno–miR–206–3p 的靶基因在 PI3K–Akt 信号通路中明显富集。同时 rno–miR–361–5p、rno–miR–206–3p 和 rno–miR–1–3p 与 *Hsp90aa1* 的靶向结合关系更强。因此, 本研究推测 rno–miR–206–3p (miR–206–3p) 可能通过靶向 *Hsp90aa1* 调控 PI3K–Akt 信号通路参与中暑神经损伤。进一步 miRmap 和 IntaRNA 工具分析结果发现: LOC102547734 与 miR–206–3p、miR–206–3p 与 *Hsp90aa1* 存在靶向结合位点, 提示 LOC102547734–miR–206–3p–*Hsp90aa1* 关系轴参与中暑神经损伤。

综上所述, 本研究通过分析中暑神经损伤中的 mRNA 表达差异, 成功构建 lncRNA–miRNA–mRNA 调控网络, 初步认为 LOC102547734–miR–206–3p–*Hsp90aa1* 可能是阻止中暑神经损伤的关键 ceRNA 网络, 这可能为中暑神经损伤的发病机制提供了新的理论依据。但现有研究局限于大鼠生物信息学分析结果, 后续还需通过体外细胞或体内动物实验进一步证实该机制。

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

- [1] ZHANG Z T, GU X L, ZHAO X, et al. NLRP3 ablation enhances tolerance in heat stroke pathology by inhibiting IL-1 β -mediated neuroinflammation [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18: 128.
- [2] LU C X, QIU T, LIU Z F, et al. Calcitonin gene-related peptide has protective effect on brain injury induced by heat stroke in rats [J]. Exp Ther Med, 2017, 14: 4935–4941.
- [3] 杭开兵, 苏维维, 黄静, 等. 7.0T 小动物 MR 仪观察经典型热射病大鼠模型脑损伤 [J]. 中国医学影像技术, 2022, 38(4): 481–485.
- [4] 全军热射病防治专家组, 热射病急诊诊断与治疗专家共识组. 热射病急诊诊断与治疗专家共识 (2021 版) [J]. 中华急诊医学杂志, 2021, 30(11): 1290–1299.
- [5] LIN Y C, WANG Y C, LEE Y C, et al. CircViS: a platform for circRNA visual presentation [J]. BMC Genomics, 2022, 22(Suppl 5): 921.
- [6] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets [J]. Bioinformatics, 2011, 27(6): 863–864.
- [7] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [8] PHILIPPE C, VARGAS-LANDIN D B, DOUCET A J, et al. Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci [J]. Elife, 2016, 5: e13926.
- [9] DESVIGNES T, LOHER P, EILBECK K, et al. Unification of miRNA and isomiR research: the mirGFF3 format and the mirtop API [J]. Bioinformatics, 2020, 36(3): 698–703.
- [10] PERTEA M, KIM D, PERTEA G, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown [J]. Nature Protocols, 2016, 9(11): 1650–1667.
- [11] NI X X, WANG C L, GUO Y Q, et al. Analysis of clinical symptoms of Guillain–Barré syndrome induced by heat stroke: three case reports and literature review [J]. Front Neurol, 2022, 13: 910596.
- [12] 肖文静, 王武超, 周倩云, 等. 热射病相关生物标志物研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(2): 381–384.
- [13] LU Z, MA Y, LI Q, et al. The role of N6-methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*) [J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(2): 333–342.
- [14] HENG J, TIAN M, ZHANG W, et al. Maternal heat stress regulates the early fat deposition partly through modification of m6A RNA methylation in neonatal piglets [J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(3): 635–645.
- [15] YUAN R, WANG L, DENG Z H, et al. Experimental study on the protective mechanism of mesenchymal stem cells against central nervous system injury in heat stroke [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2023, 18(3): 401–409.
- [16] DEGROOT D W, O'CONNOR F G, ROBERTS W O. Exertional heat stroke: an evidence based approach to clinical assessment and management [J]. Exp Physiol, 2022, 107(10): 1172–1183.
- [17] YUAN R, WANG L, DENG Z H, et al. Protective effects of mesenchymal stem cells against central nervous system injury in heat stroke [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2023, 18(3): 401–409.
- [18] LIU Q, LI Y, ZHOU L, et al. GRP78 promotes neural stem cell antiapoptosis and survival in response to oxygen–glucose deprivation (OGD)/reoxygenation through PI3K/Akt, ERK1/2, and NF- κ B/p65 pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 3541807.
- [19] HUA H Y, ZHANG W Y, LI J Y, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion by dietary phytochemical extracts from Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113410.

- [20] XING C, LIU X F, ZHANG C F, et al. Hsp90-associated DNA replication checkpoint protein and proteasome-subunit components are involved in the age-related macular degeneration [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(19): 2322–2332.
- [21] 肖鑫, 盛晓安, 施险峰, 等. 热疗联合同步放化疗对中晚期宫颈癌的临床疗效及血清热休克蛋白90 α 表达的影响 [J]. 中华全科医学, 2022, 20(7): 1109–1112.
- [22] HU J M, HSU C H, LIN Y C, et al. Ethyl pyruvate ameliorates heat stroke-induced multiple organ dysfunction and inflammatory responses by induction of stress proteins and activation of autophagy in rats [J]. Int J Hyperthermia, 2021, 38 (1): 862–874.
- [23] SADEGHI M, BAHRAMI A, HASANKHANI A, et al. lncRNA–miRNA–mRNA ceRNA network involved in sheep prolificacy: an integrated approach [J]. Genes (Basel), 2022, 13(8): 1295.
- [24] CHEN L, WEI K, LI J, et al. Integrated analysis of lncRNA–Mediated ceRNA network in calcific aortic valve disease [J]. Cells, 2022, 11(14): 2204.
- [25] LI Y, WEN Q, CHEN H S, et al. Exosomes derived from heat stroke cases carry miRNAs associated with inflammation and coagulation cascade [J]. Front Immunol, 2021, 12: 624753.
- [26] LI P, WANG G, ZHANG X L, et al. MicroRNA-155 promotes heat stress-induced inflammation via targeting liver X receptor α in microglia [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 12.
- [27] DOSIL S G, LOPEZ-COBO S, RODRIGUEZ-GALAN A, et al. Natural killer (NK) cell-derived extracellular vesicle shuttled microRNAs control T cell responses [J]. Elife, 2022, 11: e76319.

收稿日期: 2023-02-17

.....

(上接第 589 页)

- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 工作场所有害因素职业接触限值 第1部分: 化学有害因素: GBZ 2.1—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 工作场所有害因素职业接触限值 第2部分: 物理因素: GBZ 2.2—2007[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 工作场所职业病危害作业分级 第1部分: 生产性粉尘: GBZ/T 229.1—2010[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 工作场所职业病危害作业分级 第2部分: 化学物: GBZ/T 229.2—2010[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 工作场所职业病危害作业分级 第3部分: 高温: GBZ/T 229.3—2010[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 工作场所职业病危害作业分级 第4部分: 噪声: GBZ/T 229.4—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 工业企业设计卫生标准: GBZ 1—2010[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 职业健康监护技术规范: GBZ 188—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [17] 于静, 扈曼. 黑龙江省焦化企业职业危害现状调查 [J]. 中国工业医学杂志, 2017, 30(6): 457–459.
- [18] 漆雁, 武彦涛. 某烧结炼铁建设项目职业病危害控制效果评价 [J]. 职业与健康, 2011, 27(3): 327–329.
- [19] 赵晋林. 大同市某钢铁有限公司炼铁厂职业病危害调查分析 [J]. 山西医药杂志, 2014, 43(14): 1636–1639.
- [20] 中华人民共和国卫生部. 黑色金属冶炼及压延加工业职业卫生防护技术规范: GBZ/T 231—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [21] 杨琴芳. 焦化厂职业卫生管理现状及改进设想 [J]. 浙江冶金, 2015, 8(3): 19–21.
- [22] 王静, 李延明, 梁峰, 等. 某炼铁厂无组织排放点实施干雾抑尘设施前后粉尘浓度对比分析 [J]. 工业卫生与职业病, 2020, 46(6): 503–505.
- [23] 中华人民共和国卫生部. 工作场所有毒气体检测报警装置设置规范: GBZ/T 223—2009[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [24] 马蓉. 论煤焦化职业病的防护 [J]. 安徽冶金科技职业学院学报, 2015, 25(4): 56–60.
- [25] 何为, 盖冰冰, 姜晓琴. 80至85 dB噪声环境中作业人群听力损失情况 [J]. 上海预防医学, 2018, 30(10): 861–864.

收稿日期: 2023-04-06