

# 雷帕霉素对劳力型热射病大鼠下丘脑损伤的保护作用及其机制

宣律<sup>1</sup>, 张玉想<sup>2\*</sup>, 王佳兴<sup>2</sup>, 顾焱<sup>2</sup>, 任卫东<sup>3</sup>, 孙正中<sup>1</sup>, 马运亚<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河北北方学院研究生学院, 河北张家口 075000; <sup>2</sup>解放军总医院第八医学中心重症医学科, 北京 100091; <sup>3</sup>河北北方学院附属第一医院内分泌科, 河北张家口 075000

[中图分类号] R58 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0133.2023.0620

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 宣律, 张玉想, 王佳兴, 等. 雷帕霉素对劳力型热射病大鼠下丘脑损伤的保护作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(8): 903-912.

[收稿日期] 2023-01-28 [录用日期] 2023-04-06 [上线日期] 2023-06-20

**[摘要]** **目的** 探讨雷帕霉素(Rapa)对劳力型热射病大鼠下丘脑损伤的保护作用及其机制。**方法** 80只Wistar雄性大鼠随机分为对照组、Rapa组、劳力型热射病(EHS)组及EHS+Rapa组, 每组20只。Rapa组及EHS+Rapa组大鼠分别于建模前连续4d腹腔注射Rapa(1 mg/kg, 1次/d), 对照组及EHS组给予同体积生理盐水。将EHS组及EHS+Rapa组大鼠置于温度(39.5±0.3)℃、湿度55%±5%的气候舱中跑步, 建立EHS模型; 对照组及Rapa组大鼠置于相同室温下, 进行与EHS组同等强度的跑步。在模型建立过程中, 观察各组大鼠的一般状态, 测量核心温度并绘制大鼠生存曲线(n=11)。EHS组及EHS+Rapa组大鼠于入舱80 min后, 从舱中取中, 并观察300 min。对每组大鼠实施麻醉, 取腹主动脉血及下丘脑等组织, HE及尼氏染色观察下丘脑的组织病理学改变; 免疫荧光法测定神经元凋亡情况; Western blotting法检测大鼠下丘脑组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(pmTOR)、自噬效应蛋白(Beclin-1)、泛素结合蛋白(p62)及自噬标志物微管相关蛋白1轻链3(LC3)的表达, 并计算pmTOR/mTOR及LC3-II/LC3-I比值。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)、脑活性肽100β蛋白(S100β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达水平。**结果** 在入舱后80 min时, 与对照组相比, EHS组的核心温度明显升高; 与Rapa组相比, EHS+Rapa组的核心温度明显升高(P<0.001)。与EHS组相比, EHS+Rapa组大鼠的生存率升高(P<0.01)。下丘脑组织HE及尼氏染色显示, EHS组大鼠下丘脑神经元病理损伤更重, 而EHS+Rapa组大鼠下丘脑神经元病理损伤较EHS组明显减轻(P<0.001)。免疫荧光检测结果显示, EHS组大鼠下丘脑组织中细胞凋亡率较对照组显著增高, 而与EHS组相比, EHS+Rapa组大鼠下丘脑组织中细胞凋亡率显著降低(P<0.05)。Western blotting结果显示, 与对照组相比, EHS组大鼠下丘脑组织中pmTOR/mTOR及LC3-II/LC3-I比值升高, Beclin-1表达增加, p62表达减少(P<0.01); 与EHS组相比, EHS+Rapa组大鼠下丘脑组织中pmTOR/mTOR比值降低, LC3-II/LC3-I比值升高, Beclin-1的表达增加, p62表达减少(P<0.05)。ELISA结果显示, 与对照组相比, EHS组血清中NSE、S100β、IL-6及TNF-α的表达水平均增高(P<0.05); 与EHS组相比, EHS+Rapa组血清中NSE、S100β、IL-6及TNF-α表达水平均降低(P<0.05)。**结论** 雷帕霉素可减轻劳力型热射病引起的下丘脑损伤, 改善脑细胞功能, 降低炎症因子水平, 减少组织细胞凋亡, 可能与其抑制mTOR信号通路、增强下丘脑的自噬水平有关。

**[关键词]** 中暑; 下丘脑; 雷帕霉素; 自噬

## Protective effect of rapamycin on hypothalamus injury in exertional heat stroke rats and its mechanism

Xuan Lv<sup>1</sup>, Zhang Yu-Xiang<sup>2\*</sup>, Wang Jia-Xing<sup>2</sup>, Gu Yan<sup>2</sup>, Ren Wei-Dong<sup>3</sup>, Sun Zheng-Zhong<sup>1</sup>, Ma Yun-Ya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

<sup>2</sup>Department of Critical Care Medicine, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

<sup>3</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

**[基金项目]** 军事医学创新工程项目(18CXZ023); 解放军总医院第八医学中心重点项目(2021ZD002, 2016ZD-008)

**[作者简介]** 宣律, 硕士研究生, 主要从事内分泌与代谢性疾病等方面的研究

**[通信作者]** 张玉想, E-mail: 15810550308@163.com

\*Corresponding author, E-mail: 15810550308@163.com

This work was supported by the Military Medical Innovation Project (18CXZ023), and the Major Project of Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital (2021ZD002, 2016ZD-008)

**[Abstract] Objective** To investigate the protective function and mechanism of rapamycin on the hypothalamus injury of rats with exertional heat stroke. **Methods** Eighty male Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, rapamycin group (Rapa group), exertional heat stroke group (EHS group), and exertional heat stroke + rapamycin group (EHS+Rapa group), with 20 rats in each group. The rats in Rapa group and EHS+Rapa group were injected intraperitoneally with Rapa (1 mg/kg, once a day) for four consecutive days before modeling. The rats in control and EHS groups were treated with the same dose of 0.9% normal saline. In EHS group and EHS+Rapa group, the rats ran in a climate chamber with a temperature range of (39.5±0.3) °C and a humidity range of (55%±5%). After successful modeling, the rats were removed from the climate chamber for cooling at room temperature. The animals in control and Rapa groups ran at the same intensity and room temperature as EHS group. During the establishment of the model, we monitored the general state, measured core temperature, and profiled the survival curve of the rats in each group (11 rats randomly selected from each group). The rats in EHS group and EHS+Rapa group were removed from the chamber after modeling of 80 min, and after 300 min observation, each group of rats was anesthetized. Then we collected the abdominal aorta blood and hypothalamus. The histopathological changes in the hypothalamus were analyzed by HE and Nissl staining. Immunofluorescence was used to determine the apoptosis of hypothalamus. Western blotting was used to detect the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated mTOR (pmTOR), autophagy effector protein (Beclin-1), ubiquitin-binding protein (p62) and autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) in the hypothalamus of rats. We calculated the ratios of pmTOR/mTOR and LC3- II /LC3- I . We measured the expression levels of neuron-specific enolase (NSE), brain active peptide 100β protein (S100β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in arterial serum by ELISA. **Results** When rats were entered into the climate chamber at 80 min, compared with control group, the core temperature of EHS group was significantly increased ( $P<0.001$ ); compared with Rapa group, the core temperature of EHS+Rapa group was significantly increased ( $P<0.001$ ). Compared with the EHS group, the survival rate of EHS+Rapa group was increased ( $P<0.01$ ). HE and Nissl staining showed severe pathological damage in hypothalamic nerve cells in EHS group. We observed significantly less pathological damage in hypothalamic nerve cells in EHS+Rapa group than EHS group ( $P<0.001$ ). Immunofluorescence analysis showed substantial cell apoptosis in the hypothalamus of EHS rats compared with control group ( $P<0.05$ ). EHS+Rapa group had significantly less apoptosis in the hypothalamus than EHS group ( $P<0.05$ ). Western blotting results showed that compared with control group, the ratio of pmTOR/mTOR, Beclin-1 expression, LC3- II /LC3- I ratio in the hypothalamus tissue of EHS group increased and p62 expression decreased ( $P<0.01$ ); compared with EHS group, the ratio of pmTOR/mTOR in the hypothalamus of EHS+Rapa group decreased, Beclin-1 expression increased, LC3- II /LC3- I ratio increased and p62 expression decreased ( $P<0.05$ ). ELISA results showed that the expression levels of NSE, S100β protein, and TNF-α in the serum of EHS group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the expression of IL-6 in EHS group showed no significant difference ( $P>0.05$ ). Compared with EHS group, the expression levels of NSE, S100β protein, IL-6, and TNF-α in the serum of EHS+Rapa group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Rapa can alleviate the hypothalamus tissue damage caused by exertional heat stroke, improve the function of brain cells, reduce the levels of inflammatory factors and the apoptosis of tissue cells, which is related to the inhibition of mTOR signaling pathway and the enhancement of hypothalamus autophagy level.

**[Key words]** heat stroke; hypothalamus; rapamycin; autophagy

热射病(heat stroke, HS)是指在高强度的体力活动下或高温环境中长时间暴露,机体核心温度上升超过40 °C,出现中枢神经功能受损症状(如颅内高压、谵妄、惊厥甚至昏迷等)同时伴有多器官功能损害的临床综合征<sup>[1]</sup>。HS可分为经典型(classic heat stroke, CHS)及劳力型(exertional heat stroke, EHS)<sup>[2]</sup>。HS的发病率呈逐年递增趋势,其中超过30%的患者治疗后遗留中枢神经功能障碍<sup>[3]</sup>。大脑皮质、海马及下丘脑为HS最常见的3个中枢神经易损伤区域<sup>[4]</sup>。其中下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)直接控制下丘脑-垂体-肾上腺轴的活动,热打击后, PVN

区域小细胞神经元受损,使机体的热耐受性降低,体温调节功能受损,严重影响预后<sup>[5]</sup>。在热应激模型中,抑制大脑皮质自噬会加重神经元变性,提示自噬在神经元损伤中可能具有防御作用<sup>[6]</sup>。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)是一种新型的高效免疫抑制剂,能够特异性抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of Rapamycin, mTOR)的活性,该靶蛋白包括mTORC1及mTORC2两种亚型, Rapa变构可抑制mTORC1<sup>[7]</sup>。Rapa通过调控mTOR信号通路,激活或抑制细胞内各种蛋白磷酸化,调控神经细胞的存活及凋亡,并参与调节自噬<sup>[8]</sup>。在缺血缺

氧性脑病中, Rapa 主要通过抑制 mTOR 信号通路而增强自噬, 从而减轻对神经元的损伤<sup>[8]</sup>。研究表明, 热应激类似缺血缺氧性脑病, 表现为皮肤血流量增加, 内脏器官血流量减少, 导致大脑缺血缺氧性损伤以及下丘脑区域神经细胞坏死<sup>[4]</sup>。在急性脑损伤中, Rapa 可通过增强自噬而提高损伤区域的神经元存活率<sup>[6]</sup>, 但其能否通过调控 mTOR 信号通路而减轻 HS 导致的下丘脑神经元损伤, 目前鲜见报道。本研究通过建立 EHS 大鼠模型, 探讨 Rapa 对 EHS 大鼠下丘脑神经元的保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验仪器及试剂** 将 6 跑道小动物实验跑台(型号为 XR-PT-10A, 购自上海欣软信息科技有限公司)放置于外观透明且功能为模拟高湿高温的气候舱内<sup>[9]</sup>, 该舱可以精准地对舱内的湿度及温度进行控制并维持恒定。大鼠肛温仪(型号为 TH212, 购自上海玉研科技仪器公司), 实验开始之前进行校准, 确保其灵敏度为 0.1 °C, 精确度为  $\leq \pm 0.2$  °C, 用于实时监测大鼠核心温度。Rapa、聚乙二醇 300 (polyethylene glycol 300, PEG300)及吐温-80 购自美国 MCE 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司; 兔抗大鼠多克隆抗体自噬效应蛋白(Beclin-1)、mTOR 及兔抗大鼠单克隆抗体磷酸化 mTOR (phosphorylated mTOR, pmTOR) 均购自美国 Proteintech 公司; 兔抗大鼠单克隆抗体微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)购自美国 CST 公司; 兔抗大鼠单克隆抗体 p62 购自英国 Abcam 公司; 小鼠抗大鼠单克隆抗体  $\beta$ -actin 购自美国的 Affinity 公司。一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自武汉赛维尔生物有限公司; 山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(辣根过氧化物酶标记)均购自英国 Abcam 公司; 神经元特异性烯醇化酶(NSE)、脑活性肽 100 $\beta$  蛋白(S100 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国瑞博奥生物科技有限公司。

**1.2 实验动物** 80 只 SPF 级成年健康雄性 Wistar 大鼠购自北京斯贝福生物科技有限公司, 体重 300~350 g, 动物生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010。实验动物均在军事医学科学院 SPF 级实验室饲养, 室内温度 20~22 °C, 相对湿度 50%~60%。动物实验方案获解放军总医院第八医学中心动物伦理委员会批准。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 大鼠建模前的劳力性适应性训练** 在实施热打击实验前, 大鼠先进行 1 周的劳力性适应性跑步训练。训练采用阶梯式锻炼法, 在室温下进行, 前 3 d 按如下程序训练: 大鼠从饲养笼转移到气候舱

后, 初始按照 5 m/min 的速度开始跑步(其坡度设定为 0), 每隔 2 min 速度增加 1 m/min, 在 20 min 内将其增加到 15 m/min, 之后以此速度匀速跑步, 跑步过程中严密观察, 直到大鼠出现疲劳状态(给予噪声、轻推等无痛刺激驱赶后仍无法坚持跑步至少 5 s), 逐渐降速使其停止跑步, 跑步时长  $\leq 30$  min。第 4、5 天采用之前的训练方案, 但跑步时长延长至  $\leq 60$  min。第 6、7 天为休息日, 只给予大鼠舱内的环境适应, 不进行跑步训练。训练过程中, 不限制大鼠的饮水及进食。

**1.3.2 实验动物分组** 采用随机数字表法将 80 只 Wistar 大鼠分为对照组、雷帕霉素组(Rapa 组)、EHS 组及 EHS+Rapa 组, 每组 20 只。其中 44 只(每组随机抽取 11 只)用于连续观察大鼠自气候舱中取出后的生存状态, 剩余 36 只大鼠用于其余实验。Rapa(规格: 25 mg)溶解于 100% DMSO 溶液中, 配制成浓度为 2 g/L 的原液, 将原液在 -80 °C 冻存, 15  $\mu$ l 原液溶于 PEG 300(600  $\mu$ l)、吐温-80(75  $\mu$ l)及生理盐水(810  $\mu$ l), 配制为 1.5 ml 的工作液, 分别于 Rapa 组及 EHS+Rapa 组大鼠建模前每日清晨 8 时以 1 mg/kg 的剂量腹腔注射, 1 次/d, 连续 4 d<sup>[10]</sup>, 而对照组及 EHS 组在同一时间点给予同体积生理盐水腹腔注射。

**1.3.3 建立 EHS 大鼠模型** 4 组大鼠在实施热打击实验之前, 禁食 12 h, 可自由饮水, 在建模前的 30 min 称重并禁止饮水。当气候舱的相对湿度达到 55% $\pm$ 5%、温度达到 (39.5 $\pm$ 0.3) °C 时, 将 EHS 组及 EHS+Rapa 组大鼠放入舱内并置于跑道上<sup>[11]</sup>, 按照 1.3.1 的方式进行跑步训练。入舱全程仔细观察大鼠的精神改变及意识情况, 3 次重复确认大鼠已达到 EHS 的诊断标准后, 从气候舱内将其取出, 在室温下自然降温, 继续对大鼠的形态学的改变、神志状态、核心温度及生存时间进行监测。EHS 诊断标准为大鼠出现严重的 HS 神经系统功能障碍表现, 即无自主的活动时长在 5 s 以上(正位反射、角膜反射以及强烈疼痛刺激仍然存在)<sup>[12-13]</sup>。对照组及 Rapa 组大鼠在室温条件下进行与 EHS 组及 EHS+Rapa 组同等强度的劳力型跑步运动<sup>[14]</sup>。

**1.3.4 实时监测大鼠核心温度** 在 EHS 模型建立过程中, 将涂有润滑油的大鼠肛温仪传感器插入其肛门, 插入深度 5~7 cm。为防止传感器脱落, 用医用胶带将其固定在鼠尾。入舱前大鼠核心温度范围为 37~38 °C<sup>[15]</sup>, 入舱后每隔 5 min 记录 1 次核心温度。观察各组大鼠核心温度的变化情况, 绘制核心温度动态曲线。

**1.3.5 记录大鼠生存情况** 成功建模后, 每组随机抽取 11 只大鼠, 自气候舱中取出后, 分别于 50、100、150、200、250 及 300 min 观察其生存情况, 并

计算各组生存率。

**1.3.6 大鼠下丘脑组织大体形态学观察** EHS组及EHS+Rapa组大鼠在入舱80 min后,从舱中取出,观察300 min。将各组大鼠采用适量乙醚进行安乐死。从腹主动脉采集适量的动脉血,解剖大鼠后取出下丘脑组织,对下丘脑的形状、大小、光泽、颜色、肿胀及淤血情况进行大体观察。

**1.3.7 大鼠下丘脑组织病理学观察** 分离出完整的下丘脑组织,用PBS冲洗干净,置于4%多聚甲醛溶液中固定,梯度浓度乙醇脱水、石蜡包埋、切片(厚度3~4  $\mu\text{m}$ ),然后进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)及尼氏染色,树胶封片、固定,观察下丘脑的组织病理学改变。在光学显微镜( $\times 400$ )下随机选取5个视野,参照Thoresen等<sup>[16]</sup>的神经元损伤评分标准,由两名病理学专家通过盲法评估各组的形态学变化。0分,无明显损伤;1分,损伤面积<10%,仅可观察到个别的损伤神经元;2分,损伤面积为20%~30%,可观察到局部损伤;3分,损伤面积40%~60%,可观察到局部损伤;4分,损伤面积>75%,大量神经元出现损伤,组织完全崩解。

**1.3.8 免疫荧光法测定神经元凋亡情况** 大鼠下丘脑组织石蜡切片梯度浓度乙醇脱蜡后蒸馏水冲洗,滴入蛋白酶工作液,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, PBS冲洗3次,每次5 min;破膜液常温下孵育30 min,再次PBS冲洗。按照一步法TUNEL试剂盒说明书进行TUNEL染色及DAPI染色, PBS(pH7.4)冲洗后封片,光镜下观察。采用Image J软件对每组TUNEL染色切片图像进行分析,绿色荧光为凋亡细胞染色,蓝色荧光为细胞核定位。显微镜下每张切片中任意随机选取10个视野( $\times 400$ ),计数阳性细胞数。凋亡率=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

**1.3.9 Western blotting检测大鼠下丘脑组织自噬相关蛋白的表达** 将50 mg大鼠下丘脑组织加入4  $^{\circ}\text{C}$ 的组织裂解液中,完全裂解后测定蛋白浓度,然后行SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜,脱脂奶粉室温封闭。一抗为兔抗大鼠单克隆抗体LC3(1:1000)、p62(1:5000)、pmTOR(1:1000),小鼠抗大鼠单克隆抗体 $\beta$ -actin(1:1000),兔抗大鼠多克隆抗体Beclin-1(1:1000)及mTOR(1:5000),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠IgG(1:600),室温孵育2 h,增强化学发光法(ECL)显色。以 $\beta$ -actin为内参照,采用Image J软件进行目的条带灰度值分析,计算蛋白相对表达量,以及pmTOR/mTOR、LC3-II/LC3-I比值。

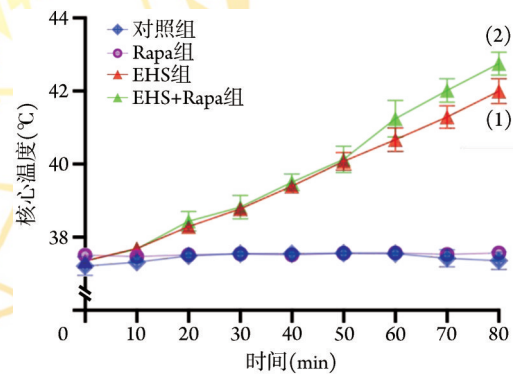
**1.3.10 ELISA法检测大鼠血清NSE、S100 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 的表达水平** 按照ELISA试剂盒说明书,用酶标仪测定450 nm波长处的光密度(OD)值,根据标

准曲线计算大鼠血清NSE、S100 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 的表达水平。

**1.4 统计学处理** 采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用ANOVA单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验;生存率采用Kaplan-Meier法分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 建立EHS模型过程中大鼠核心温度的变化** 在入舱0 min时,4组大鼠的核心温度差异无统计学意义( $F=4.634$ ,  $P>0.05$ )。在入舱80 min时,4组大鼠的核心温度差异有统计学意义( $F=1158$ ,  $P<0.01$ );与对照组相比,EHS组的核心温度明显升高[(42 $\pm$ 0.4)  $^{\circ}\text{C}$  vs. (37.4 $\pm$ 0.3)  $^{\circ}\text{C}$ ,  $P<0.001$ ];与Rapa组相比,EHS+Rapa组的核心温度明显升高[(42.8 $\pm$ 0.3)  $^{\circ}\text{C}$  vs. (37.6 $\pm$ 0.1)  $^{\circ}\text{C}$ ,  $P<0.001$ ,图1)。



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; 与对照组比较, (1) $P<0.001$ ; 与Rapa组比较, (2) $P<0.001$

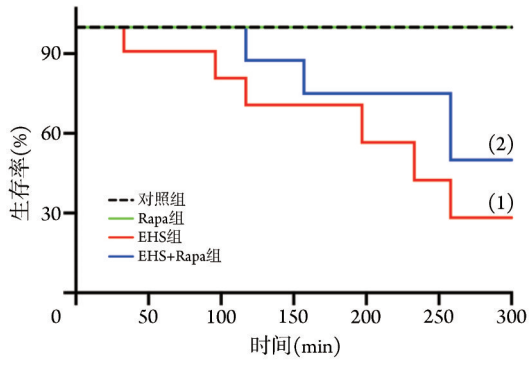
图1 EHS建模过程中大鼠核心温度的变化( $n=20$ )

**Fig. 1** Changes of core temperature in rats during the development of an EHS model ( $n=20$ )

**2.2 雷帕霉素对EHS大鼠生存率的影响** 对照组及Rapa组300 min生存率均为100%, EHS组300 min生存率降低至28.3%( $P<0.01$ ), EHS+Rapa组大鼠300 min生存率升高至50.0%( $P<0.01$ ,图2)。

**2.3 雷帕霉素对EHS大鼠下丘脑大体形态的影响** 对照组大鼠下丘脑呈淡粉红色,色泽光亮,位于第三脑室底中央;Rapa组下丘脑近似对照组;EHS组大鼠下丘脑明显肿胀增大,色泽暗淡,呈暗红色,明显向两侧扩张,呈圆球形;与EHS组比较,EHS+Rapa组大鼠下丘脑肿胀情况明显减轻,表面颜色近似淡粉红色,且外观形态近似对照组(图3)。

**2.4 雷帕霉素对EHS大鼠下丘脑组织病理学改变的影响** HE染色结果显示,对照组及Rapa组大鼠下丘脑组织结构清晰,细胞形态正常;与对照组比较,EHS组大鼠下丘脑组织病理学损伤评分增加[(3.83 $\pm$



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; 与对照组比较, (1) $P<0.01$ ; 与EHS组比较, (2) $P<0.01$

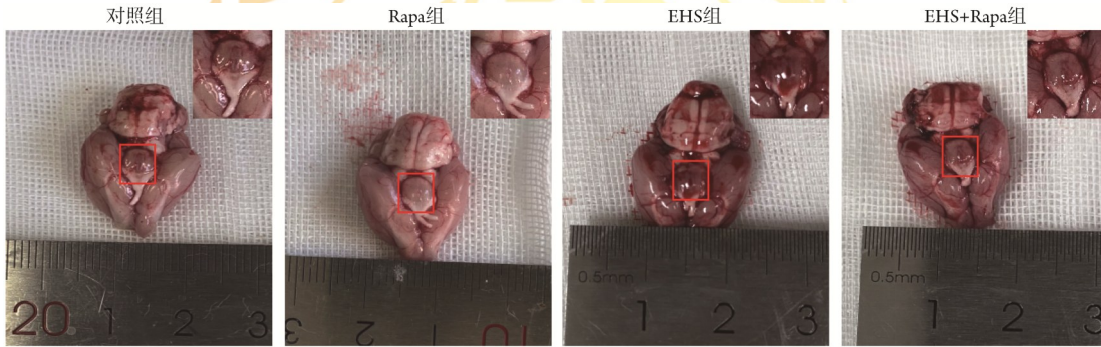
图2 雷帕霉素对EHS大鼠生存率的影响( $n=11$ )

Fig.2 Effect of Rapamycin on survival rate of exertional heat stroke rats ( $n=11$ )

0.41分 vs. (1.17±0.41)分,  $P<0.001$ ], 可见大量神经元

细胞核深染、固缩伴胶质细胞增生; 与EHS组比较, EHS+Rapa组大鼠有少量胶质细胞增生, 神经元细胞核深染、固缩程度减轻, 病理学损伤评分降低[(2.5±0.55)分 vs. (3.83±0.41)分,  $P<0.001$ ]. 对照组及Rapa组病理学损伤评分比较差异无统计学意义[(1.17±0.41)分 vs. (1.17±0.41)分,  $P>0.05$ , 图4A、B)。尼氏染色结果显示, 对照组大鼠下丘脑组织结构清晰, 尼氏体均匀分布于胞质中; 与对照组比较, EHS组大鼠下丘脑组织尼氏体消失, 神经元细胞核固缩、深染; 与EHS组比较, EHS+Rapa组大鼠下丘脑组织尼氏体结构清晰, 神经元细胞核固缩、深染程度减轻(图4C)。

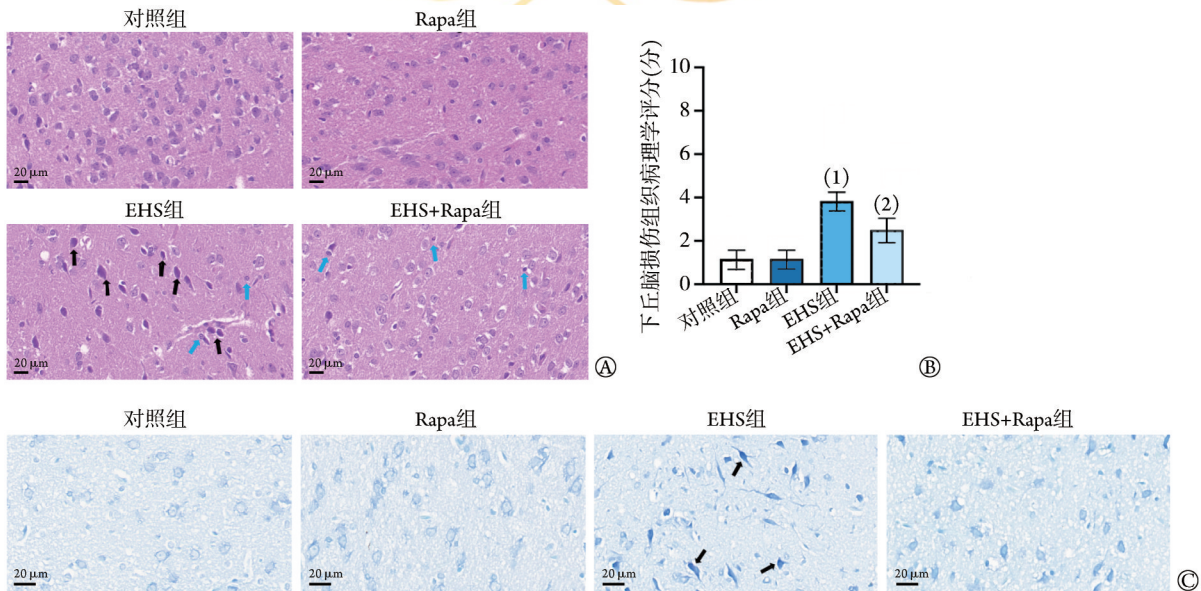
2.5 雷帕霉素对EHS大鼠下丘脑神经元凋亡的影响 与对照组相比, EHS组下丘脑神经元凋亡率明显升高 (0.90%±0.06% vs. 0.46%±0.15%,  $P<0.05$ ); 而



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素

图3 各组大鼠下丘脑标本肉眼观

Fig.3 The morphological changes of hypothalamus were observed by naked eye

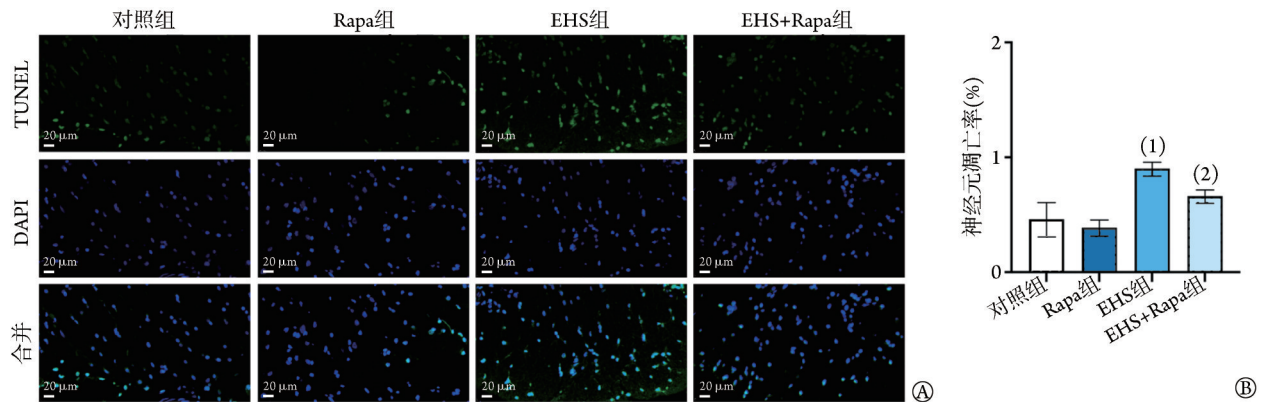


EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; A. HE染色: EHS组神经元细胞核深染、固缩, 细胞核、细胞质分界不清晰(黑色箭头); 胶质细胞增生(蓝色箭头); B. 病理学损伤评分; 与对照组比较, (1) $P<0.001$ ; 与EHS组比较, (2) $P<0.001$  ( $n=10$ ); C. 尼氏染色: EHS组神经元细胞核深染、固缩, 尼氏体消失(黑色箭头)

图4 各组大鼠的下丘脑组织学形态改变( $n=10$ )

Fig.4 Histological and morphological changes in hypothalamus of rats in each group ( $n=10$ )

EHS+Rapa组( $0.66\pm 0.05\%$ )大鼠下丘脑神经元凋亡率低于EHS组( $P<0.05$ )。Rapa组下丘脑神经元凋亡率( $0.39\pm 0.07\%$ )与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图5)。



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; A. TUNEL染色; B. 神经元凋亡率( $n=15$ ); 与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与EHS组比较, (2) $P<0.05$

图5 各组大鼠下丘脑神经元凋亡情况比较( $n=15$ )

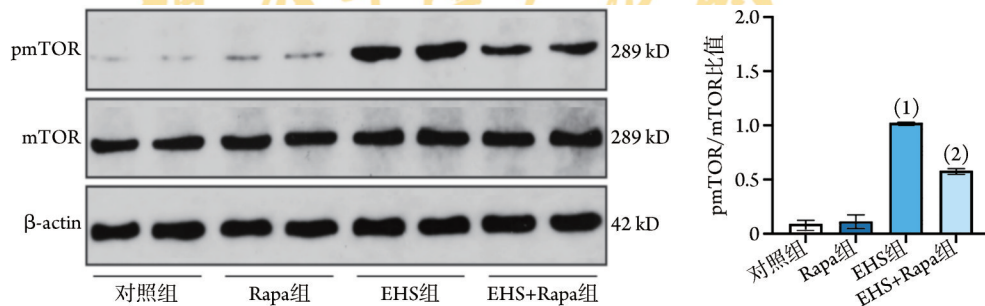
Fig.5 Comparison of apoptosis of rat hypothalamic neurons in each group ( $n=15$ )

**2.6 雷帕霉素对EHS大鼠下丘脑组织中mTOR及pmTOR表达的影响** EHS组大鼠下丘脑组织中pmTOR/mTOR比值明显高于对照组( $1.03\pm 0.01$  vs.  $0.09\pm 0.03$ ,  $P<0.001$ ); 与EHS组相比, EHS+Rapa组pmTOR/mTOR比值明显降低( $0.53\pm 0.02$ ,  $P<0.001$ ); Rapa组pmTOR/mTOR比值( $0.11\pm 0.06$ )与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图6)。

**2.7 雷帕霉素对EHS大鼠的下丘脑组织中LC3、Beclin-1及p62表达的影响** 与对照组相比, EHS组LC3- II/LC3- I比值升高( $3.74\pm 0.44$  vs.  $1.65\pm 0.01$ ,  $P<0.01$ ), 而p62表达水平降低( $0.49\pm 0.06$  vs.  $0.76\pm 0.03$ ,  $P<0.01$ ), Beclin-1表达水平升高( $0.75\pm 0.05$  vs.  $0.43\pm 0.03$ ,  $P<0.01$ )。与EHS组相比, EHS+Rapa组LC3- II/LC3- I比值( $14.94\pm 0.92$ )及Beclin-1表达水平( $1.12\pm 0.02$ )升高, p62表达水平降低( $0.29\pm 0.01$ ), 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。对照组与Rapa组间LC3- II/

LC3- I比值及Beclin-1、p62表达水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图7)。

**2.8 雷帕霉素对EHS大鼠血清NSE、S100 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 表达的影响** ELISA检测结果显示, 与对照组相比, EHS组大鼠血清NSE [( $3683\pm 690$ ) ng/L vs. ( $1881\pm 97.73$ ) ng/L,  $P<0.01$ ], S100 $\beta$  [( $310.30\pm 85.0$ ) ng/L vs. ( $156.40\pm 15.53$ ) ng/L,  $P<0.05$ ], IL-6 [( $24.94\pm 7.72$ ) ng/L vs. ( $15.62\pm 2.04$ ) ng/L,  $P<0.05$ ]及TNF- $\alpha$  [( $71.36\pm 24.26$ ) ng/L vs. ( $27.73\pm 10.37$ ) ng/L,  $P<0.05$ ]表达水平明显升高; 与EHS组相比, EHS+Rapa组大鼠血清NSE ( $1851\pm 42.71$ ) ng/L、S100 $\beta$  ( $162.4\pm 16.2$ ) ng/L、TNF- $\alpha$  ( $21.08\pm 9.41$ ) ng/L、IL-6 ( $8.87\pm 4.61$ ) ng/L表达水平均明显降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 对照组与Rapa组间上述分子表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图8)。



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; mTOR. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 与对照组比较, (1) $P<0.001$ ; 与EHS组比较, (2) $P<0.001$

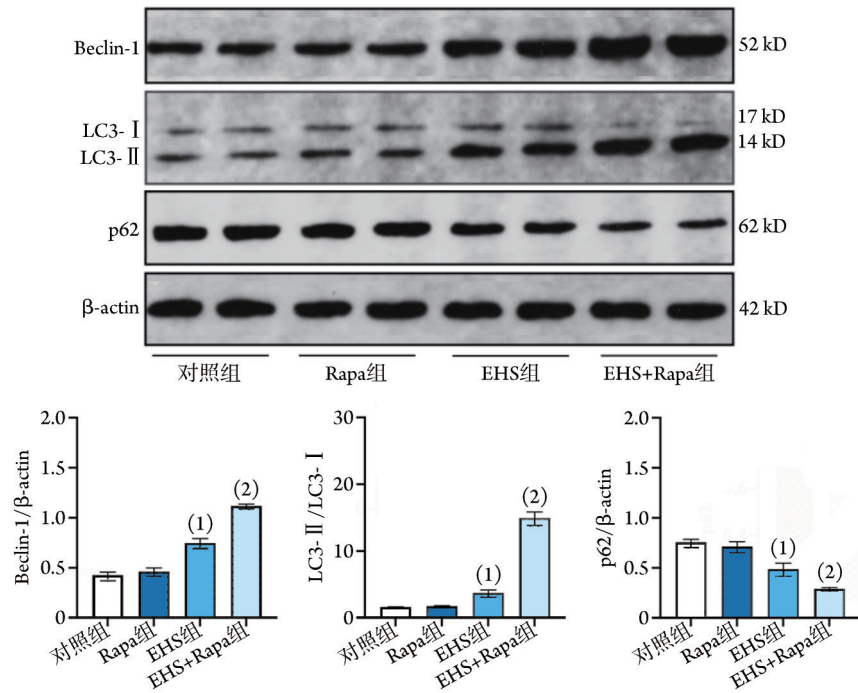
图6 各组大鼠下丘脑组织pmTOR、mTOR的表达(Western blotting,  $n=10$ )

Fig.6 pmTOR and mTOR expression levels of rat hypothalamus tissues in each group (Western blotting,  $n=10$ )

### 3 讨论

EHS的突出表现为高热及中枢神经系统损害<sup>[17]</sup>。随着热应激程度的加深, 下丘脑神经元明显损伤,

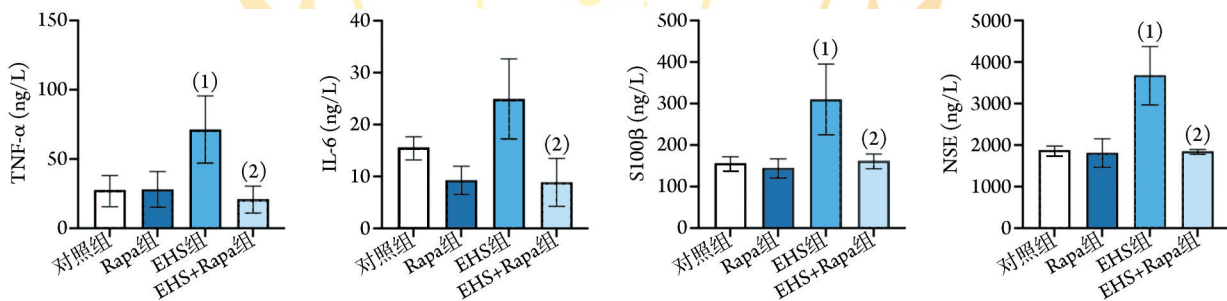
可见核深染及固缩<sup>[18]</sup>。中枢神经炎症参与了HS的中枢神经损伤, IL-1 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 等在HS小鼠皮质及海马下丘脑组织中明显升高<sup>[19-20]</sup>, 与脑血管水肿、神经元凋亡的严重程度高度相关<sup>[21]</sup>。Sharma等<sup>[22]</sup>发



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; LC3. 微管相关蛋白1轻链3; Beclin-1. 肌球蛋白样 BCL2 结合蛋白; β-actin. β-肌动蛋白; 与对照组比较, (1) $P < 0.01$ ; 与EHS组比较, (2) $P < 0.05$

图7 各组大鼠下丘脑组织LC3、Beclin-1及p62表达水平比较(Western blotting,  $n=10$ )

Fig.7 Expression levels of LC3, Beclin-1 and p62 of hypothalamic tissue of rats in each group (Western blotting,  $n=10$ )



EHS. 劳力型热射病; Rapa. 雷帕霉素; NSE. 神经元特异性烯醇化酶; S100β. 脑活性肽 100β 蛋白; IL-6. 白细胞介素-6; TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与EHS组比较, (2) $P < 0.05$

图8 各组大鼠血清NSE、S100β、TNF-α及IL-6表达水平比较( $n=10$ )

Fig.8 Protein expressions of NSE, S100β, TNF-α and IL-6 of rat serum in each group ( $n=10$ )

现, 热暴露后, 大鼠的脑屏障受损, 脑组织缺血缺氧; 小鼠皮质及海马等脑组织中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的基因表达也同时显著增高<sup>[23]</sup>。Watson 等<sup>[24]</sup>发现在高温环境下剧烈运动时, 外周循环血液中 S100β 蛋白浓度增高; 而 HS 脑损伤患者的 NSE 及 S100β 蛋白表达会随着脑损伤程度加重而增高<sup>[25]</sup>。本研究发现, 在劳力型热射病模型建立过程中, EHS 大鼠核心温度迅速升高, 模型建立后大鼠生存率降低, 下丘脑神经元病理损伤明显, 血清中炎症因子水平增高, 神经元凋亡明显, 与既往研究结果一致, 提示 IL-6 及 TNF-α 可介导 EHS 大鼠全身炎症反应, 加重下丘脑神经元凋亡及组织损伤, 且会影响大鼠的预后。

下丘脑被称为人体的“恒温器”, 可通过调节机体代谢速率及体温来维持核心温度, 使机体处于一种动态平衡中。在正常状态下, 下丘脑视前区 (preoptic anterior hypothalamus, POAH) 可通过增加血流量及汗腺分泌来降温, 并通过降低代谢速率来减少热量产生<sup>[26]</sup>。同时, 下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 区域可通过调节下丘脑、垂体及肾上腺皮质等来协调其他生理反应, 如心率、血压等, 以维持热稳态<sup>[27]</sup>。研究发现, 高温能促进神经干细胞凋亡, 随着热应激时间延长, 细胞凋亡率增高<sup>[28]</sup>。本研究结果显示, EHS 组大鼠下丘脑神经元凋亡率增高, 提示 EHS 可促进神经元的凋亡, 这可能是 EHS 下丘脑发生损伤的原因之一。

在正常的生理条件下, 机体细胞会维持基础的自噬及凋亡水平, 以维持细胞的自我更新及细胞内环境稳态。当受到热打击时, 细胞的自噬及凋亡水平会适度增强, 以应对热损伤应激反应<sup>[29-30]</sup>。自噬及凋亡之间存在复杂的交互调控作用, 主要归纳为合作关系、对抗关系及推动关系<sup>[31]</sup>。其中自噬及凋亡的对抗关系已有较多报道, 如在脑缺血再灌注损伤及缺血性神经元损伤等研究中均已证实<sup>[32-33]</sup>。热打击使神经元细胞在短时间内产生大量的蛋白变性产物、细胞器碎片等聚集物, 且无法及时有效地清除, 过多的自噬体在神经元中蓄积, 产生细胞毒性效应, 从而加速了神经元的变性及凋亡<sup>[29]</sup>。本研究发现, Rapa可诱导自噬增强, 但并未加重神经元的凋亡, 而EHS大鼠自噬及凋亡程度均增加。究其原因, 可能与雷帕霉素增强自噬并抑制凋亡信号有关。

自噬是普遍存在于真核生物细胞内的一种自稳机制, 可利用溶酶体的消化分解途径清除受损细胞器, 是错误折叠蛋白质的一种“自我”分解代谢途径。自噬的起始阶段由Beclin-1介导形成, 启动自噬的成核过程<sup>[34]</sup>。自噬体膜的形成是由Atg4将LC3的C末端水解, 并经过泛素化修饰形成LC3-II与自噬体膜结合, 在自噬过程中, LC3-II始终稳定地特异性定位于自噬双层膜上, 因此LC3-II或LC3-II/LC3-I比值已成为检测自噬体数量的经典方法。p62可将蛋白聚合物转运到自噬体并运输至溶酶体, 当自噬体与溶酶体融合时, p62及大分子将被水解, 故p62的表达与自噬活性成反比<sup>[35]</sup>。因此, 通常以LC3-II/LC3-I比值联合p62表达评估自噬流的通畅性。自噬在清除受损细胞器及异常聚集的毒性蛋白中发挥着重要作用, Rapa能改善阿尔茨海默病小鼠的认知能力, 主要是通过抑制pmTOR表达, 增加自噬标志物LC3-II的表达<sup>[36]</sup>。既往研究发现, 自噬在HS大鼠皮质中作为对抗神经元变性的保护机制, 而3-MA预处理可加重HS大鼠脑神经元的变性<sup>[6]</sup>。本实验结果显示, 在EHS大鼠下丘脑组织中, LC3-II/LC3-I比值以及Beclin-1表达水平显著增高, p62表达水平明显降低, 而给予Rapa干预可明显增强这一现象, 提示EHS大鼠下丘脑神经元自噬水平增高, 而Rapa可通过抑制下丘脑组织中的mTOR通路, 上调其下游分子Beclin-1的表达, 从而进一步增强自噬水平, 起到对抗神经元凋亡、减轻EHS大鼠下丘脑损伤的作用。

mTOR作为自噬的负调控因子, 参与抑制自噬进程并具有对抗凋亡的作用。当PI3K/AKT/mTOR通路被激活时, 可加速mTOR的磷酸化, 应用Rapa阻断该通路后, mTOR的磷酸化相应减少<sup>[37]</sup>。研究发现, 在帕金森病模型中, Rapa可通过抑制mTOR

激活来促进自噬, 清除 $\alpha$ -突触核蛋白, 保护神经元<sup>[38]</sup>。在缺氧/缺血性损伤中, Rapa可通过增强自噬来清除细胞及组织, 提高神经元的存活率, 改善缺氧/缺血性脑损伤以及神经行为改变和意识障碍<sup>[39]</sup>。在缺血性脑卒中的大鼠大脑皮质中, 磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, pAkt)、pmTOR、低氧诱导因子-1(HIF-1)及NF- $\kappa$ B的表达上调, 表明在脑缺血急性期, mTOR参与了组织抗凋亡、抗炎的病理生理过程<sup>[20]</sup>。本研究发现, EHS大鼠下丘脑中的pmTOR表达增加, 给予Rapa干预能够减轻下丘脑的病理改变, 减少神经元细胞凋亡, 降低mTOR磷酸化及TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达水平。另外, 近期研究发现, S100 $\beta$ 及NSE可作为诊断HS患者脑损伤及血脑屏障受损的生物标志物<sup>[40]</sup>。本研究发现, Rapa干预明显降低了EHS模型大鼠下丘脑组织中NSE、S100 $\beta$ 蛋白的表达水平, 提示Rapa可逆转热应激导致的神经元及神经胶质细胞损伤, 延长大鼠的生存时间。由此可见, Rapa能够诱导神经元自噬, 在一定程度上缓解缺血所产生的损伤, 从而发挥神经元保护作用。该结果也证实了Rapa能够通过调控mTOR通路诱导神经元自噬、抗炎及抗凋亡, 对EHS大鼠下丘脑组织具有保护作用。

本研究仍存在局限性。笔者已经从分子机制上证实了雷帕霉素治疗的有效性, 即雷帕霉素可以通过抑制EHS大鼠下丘脑组织mTOR通路来增强自噬, 从而减轻EHS大鼠下丘脑的神经元损伤以及机体的炎症反应。后续研究应在电镜下直接观察下丘脑神经元自噬囊泡的形成, 以进一步验证自噬在EHS下丘脑损伤中的保护作用。

综上所述, 雷帕霉素能改善EHS大鼠下丘脑组织损伤, 降低炎症因子TNF- $\alpha$ 及IL-6的表达水平, 下调外周血中神经元及神经胶质细胞损伤标志物NSE、S100 $\beta$ , 促进下丘脑神经元的自噬, 从而对抗凋亡, 机制主要为抑制mTOR活化、激活LC3介导的自噬通路。因此, 雷帕霉素是一种潜在的EHS治疗药物, 具有较好的临床应用前景。

#### 【参考文献】

- [1] Liu SY, Song JC, Mao HD, et al. Consensus among Chinese experts in the diagnosis and treatment of heatstroke[J]. Med J Chin PLA, 2019, 44(3): 181-196. [刘树元, 宋景春, 毛汉丁, 等. 中国热射病诊断与治疗专家共识[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(3): 181-196.]
- [2] Song Q, Mao HD, Liu SY. Definition and classification of heat illness[J]. Med J Chin PLA, 2019, 44(7): 541-545. [宋青, 毛汉丁, 刘树元. 中暑的定义与分级诊断[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(7): 541-545.]
- [3] 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.
- [4] Yuan R, Yang MM, Zhang Y, *et al.* Research advances in prevention of central nervous system injury of heat stroke[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2018, 39(11): 1004-1007. [袁睿, 杨萌萌, 张宇, 等. 热射病中枢神经系统损伤及防治研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39(11): 1004-1007.]
- [5] Ji JJ, Hong XX, Su L, *et al.* Proteomic identification of hippocampal and its protective role in heatstroke-induced hypothalamic injury in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3775-3789.
- [6] 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.
- [7] Zou CY, Chen C, Wang FQ, *et al.* Research progress of autophagy modulators targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Chin J Med Chem*, 2021, 31(10): 825-833. [邹春阳, 陈晨, 王凤秋, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的自噬调节剂研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2021, 31(10): 825-833.]
- [8] Zhang ZN, Liang LY, Lian JH, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in central nervous system[J]. *J Practical Med*, 2020, 36(5): 689-694. [张治楠, 梁丽艳, 连嘉惠, 等. 中枢神经系统 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(5): 689-694.]
- [9] Mao HD, Wang J, Wang YX, *et al.* Application of implantable biotelemetry in rat model of exertional heat stroke[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2021, 42(10): 1068-1073, 1088. [毛汉丁, 王娇, 王宇曦, 等. 植入式生物遥测技术在劳力型热射病大鼠实验模型中的应用[J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(10): 1068-1073, 1088.]
- [10] Li LR, Huang J. Rapamycin pretreatment alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in dose-response manner through inhibition of the autophagy and NF $\kappa$ B pathways in rats[J]. *Dose Response*, 2020, 18(3): 1559325820946194.
- [11] Jiang LY, Zhang YX, Zhang ZH, *et al.* Role of autophagy in acute lung injury in rats with exertional heat stroke[J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(5): 427-434. [江利亚, 张玉想, 张志华, 等. 自噬在劳力性热射病大鼠急性肺损伤中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(5): 427-434.]
- [12] He SX, Li R, Yang HH, *et al.* Optimization of a rhabdomyolysis model in mice with exertional heat stroke mouse model of EHS-rhabdomyolysis[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 642.
- [13] Iwaniec J, Robinson GP, Garcia CK, *et al.* Acute phase response to exertional heat stroke in mice[J]. *Exp Physiol*, 2021, 106(1): 222-232.
- [14] Alzahrani JM, Murray KO, Gambino BJ, *et al.* Neuromotor deficits and altered physiological responses to repeated exertional heat stroke exposures in mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2022, 323(6): R951-R961.
- [15] Maskrey M, Hinrichsen CFL. Respiratory responses to combined hypoxia and hypothermia in rats after posterior hypothalamic lesions[J]. *Pflugers Arch*, 1994, 426(5): 371-377.
- [16] Thoresen M, Haaland K, Løberg EM, *et al.* A piglet survival model of posthypoxic encephalopathy[J]. *Pediatr Res*, 1996, 40(5): 738-748.
- [17] Jiang LY, Zhang YX, Zhang ZH, *et al.* Role of autophagy in acute lung injury in rats with exertional heat stroke[J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(5): 427-434. [江利亚, 张玉想, 张志华, 等. 自噬在劳力性热射病大鼠急性肺损伤中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(5): 427-434.]
- [18] Yu CP, Li JJ, Yin W. Advance in heat stroke related SIRS[J]. *J Clin Emergency (Chin)*, 2021, 22(4): 287-291. [于超平, 李俊杰, 尹文. 热射病相关 SIRS 研究进展[J]. *临床急诊杂志*, 2021, 22(4): 287-291.]
- [19] Liu J, Wang G, He GL, *et al.* Inflammatory responses of central and peripheral nerve system in early recovery stage of heat stroked mice [J]. *J third Mil Med Univ*, 2017, 39(4): 311-316. [刘军, 王宫, 何根林, 等. 热射病小鼠早期中枢神经炎症和外周炎症的变化[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(4): 311-316.]
- [20] Wang CH, Wang ZH, Zhang XJ, *et al.* Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1 $\alpha$  and Bcl-2, down-regulated Bax, NF- $\kappa$ B expression[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 529(1): 45-50.
- [21] Hsuan YCY, Lin CH, Chang CP, *et al.* Mesenchymal stem cell-based treatments for stroke, neural trauma, and heat stroke[J]. *Brain and behavior*, 2016, 6(10): e00526.
- [22] Sharma HS, Drieu K, Westman J. Antioxidant compounds EGB-761 and BN-52021 attenuate brain edema formation and hemeoxygenase expression following hyperthermic brain injury in the rat[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, 86: 313-319.
- [23] Brugaletta G, Greene E, Ramser A, *et al.* Effect of cyclic heat stress on hypothalamic oxygen homeostasis and inflammatory state in the jungle fowl and three broiler-based research lines[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 905225.
- [24] Watson P, Shirreffs SM, Maughan RJ. Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(6): R1689-R1694.
- [25] Li B, Jia YR, Gao W, *et al.* The expression and clinical significance of neuron specific enolase and S100B protein in patients of severe heatstroke-induced brain injury[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(12): 1282-1287. [李冰, 贾晔然, 高伟, 等. 重症中暑脑损伤患者神经元特异性烯醇化酶及脑活性肽 100B 蛋白的表达及意义[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(12): 1282-1287.]
- [26] Liu XZ, Peng QW, Zhang B, *et al.* Effects of cooling therapy on AVP mRNA expression and AVP protein expression in hypothalamus of rats with exertional heat stroke[J]. *J Tianjin Univ Sport*, 2019, 34(4): 323-329, 343. [刘秀珍, 彭庆文, 张冰, 等. 冷却治疗对劳力性热射病大鼠下丘脑 AVP mRNA 表达及蛋白表达的影响[J]. *天津体育学院学报*, 2019, 34(4): 323-329, 343.]
- [27] Lin CH, Chen SH, Chang CP, *et al.* Hypothalamic impairment underlying heat intolerance in pregnant mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 492: 110439.
- [28] Li HB, Wen MY, Luo YY, *et al.* Protective effect of Xuebijing through high mobility group box 1 on heat stressed neural stem cells [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2022, 39(1): 165-170. [李红波, 温敏勇, 罗苑苑, 等. 血必净通过高迁移率族蛋白 1 对热应激神经干细胞的保护作用研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(1): 165-170.]
- [29] Yi JF, He GL, Yang J, *et al.* Heat acclimation attenuates neuronal autophagy and apoptosis in heat stroke mice[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2015, 37(11): 1059-1063. [易均凤, 何根林, 杨举, 等. 热习服对热射病小鼠中枢神经细胞自噬及凋亡的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(11): 1059-1063.]
- [30] Dou CL, Yuan FF, Liu B, *et al.* Heat stroke induces oncosis rather than apoptosis in skeletal muscle cells[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45

- (10): 1047-1051. [豆春丽, 袁芳芳, 刘斌, 等. 热打击诱导骨骼肌细胞胀亡而非凋亡[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(10): 1047-1051.]
- [31] Li J, Yang ZZ, Li Y, *et al.* Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44763-44778.
- [32] Liang G, Niu YM, Li YH, *et al.* Rapamycin treatment starting at 24 h after cerebral ischemia/reperfusion exhibits protective effect on brain injury in rats[J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2018, 47(5): 443-449. [梁刚, 牛育苗, 李一涵, 等. 雷帕霉素在大鼠局灶性脑缺血再灌注后 24 h 给药对脑损伤的保护作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2018, 47(5): 443-449.]
- [33] Zhao R, Yu QY, Hou L, *et al.* Cadmium induces mitochondrial ROS inactivation of XIAP pathway leading to apoptosis in neuronal cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 121: 105715.
- [34] Qiu ZF, Wu XG, Zu BX, *et al.* Effects of Buyang Huanwu Decoction on CXCR4-PI3K autophagy signal transduction pathway and Beclin-1 in a rat model of cerebral hemorrhage[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2016, 20(27): 3992-3998. [仇志富, 吴晓光, 祖炳学, 等. 补阳还五汤对脑出血模型大鼠脑组织 CXCR4-PI3K 自噬信号传导通路及 Beclin-1 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(27): 3992-3998.]
- [35] Shi ZH, Wang XJ, Zhang LY, *et al.* Effects of salidroside on autophagy related proteins after intracerebral hemorrhage[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2020, 38(12): 61-64, 282. [石宗华, 王新军, 张兰玉, 等. 红景天苷对脑出血后自噬蛋白 Beclin-1、LC3-II、p62 的作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 61-64, 282.]
- [36] Cui XL, Wei Z, Shen H, *et al.* Activation of LC3-mediated autophagy by rapamycin improves cognitive function of ApoE4/5x FAD mice[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(8): 1400-1408. [崔晓丽, 魏振, 沈辉, 等. 雷帕霉素通过激活 LC3 介导的细胞自噬改善 ApoE4/5x FAD 小鼠的认知功能[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(8): 1400-1408.]
- [37] Zhang CX, Luan H, Chen YD, *et al.* The effect of rapamycin on myocardial cell apoptosis in rats with heart failure is through regulating PI3K-AKT-mTOR signaling[J]. *Chin J Prev Contr Chron Dis*, 2020, 28(5): 371-374. [张春晓, 栾红, 陈玉东, 等. 雷帕霉素调控 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2020, 28(5): 371-374.]
- [38] Zhang GX, Xia Y, Wan F, *et al.* New perspectives on roles of alpha-synuclein in parkinson's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 370.
- [39] Zhou P, Xu WJ, Zang R, *et al.* Study on the mechanism of autophagy regulation in neural repair in rats with subacute ischemic stroke[J]. *Chin Med Herald*, 2022, 19(22): 20-24. [周平, 徐伟杰, 臧瑞, 等. 自噬调控在大鼠缺血性脑卒中亚急性期神经修复中的机制研究[J]. 中国医药导报, 2022, 19(22): 20-24.]
- [40] Schlader ZJ, Davis MS, Bouchama A. Biomarkers of heatstroke-induced organ injury and repair[J]. *Exp Physiol*, 2022, 107(10): 1159-1171.

(责任编辑: 熊晓然)



解放军医学杂志®