

# ACSL4 通过 AMPK/mTOR 通路抑制七氟醚诱导神经元铁死亡机制的实验研究

刘 成, 赵 娟, 贾 茜, 谢生春, 罗 彬, 魏官锋 (绵阳市人民医院麻醉科, 四川绵阳 621000)

**摘要:** 目的 探讨酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 在七氟醚 (sevoflurane, Sev) 诱导的神经元细胞损伤中的作用及机制。方法 以人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞为研究对象, 分别设置对照组 (二甲基亚砜, 10  $\mu\text{mol/L}$ )、Sev 组和 Sev+铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 采用 CCK-8 法检测细胞活性。体外构建 4.1% Sev 暴露的术后认知功能障碍模型, 按照转染类别分为 Ctrl 组、Sev 组、Sev+si-NC 组、Sev+si-ACSL4 组和 Sev+si-ACSL4+compound C 组。采用比色法检测各组细胞中丙二醛 (malonaldehyde, MDA)、4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量; 2', 7'-二氯荧光素二乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针检测活性氧水平; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 ACSL4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) mRNA 表达; 蛋白免疫印迹法 (WB) 检测 ACSL4, GPX4, 腺苷酸激活蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化 (phosphorylated, p)-AMPK, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin) mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达。结果 CCK-8 结果显示, Sev 组细胞活力 ( $0.41 \pm 0.11$ ) 较对照组 ( $0.98 \pm 0.07$ ) 明显降低, Sev+Fer-1 组细胞活力 ( $0.83 \pm 0.09$ ) 较 Sev 组显著升高, 差异具有统计学意义 ( $t=7.572, 5.118$ , 均  $P<0.01$ )。Sev 组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE, ROS 水平和 p-AMPK/AMPK 比率以及 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达高于 Ctrl 组 ( $t=5.900, 7.421, 4.795, 13.517, 10.825, 9.945, 11.334$ ), GSH, p-mTOR/mTOR 比率以及 SLC7A11, GPX4 的 mRNA 和蛋白表达低于 Ctrl 组 ( $t=20.438, 3.551, 11.460, 12.211, 6.845, 8.287$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。Sev+si-ACSL4 组  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE, ROS 水平和 p-AMPK/AMPK 比率以及 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达低于 Sev+si-NC 组 ( $t=3.818, 3.164, 3.054, 4.465, 13.088, 7.918, 9.737$ ), 细胞活力、GSH 含量、p-mTOR/mTOR 比率以及 SLC7A11, GPX4 的蛋白表达高于 Sev+si-NC 组 ( $t=2.912, 7.248, 7.574, 20.092, 5.915$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。Sev+si-ACSL4+compound C 组细胞活力、GSH 含量和 SLC7A11, GPX4 蛋白表达低于 Sev+si-ACSL4 组 ( $t=4.435, 8.521, 4.522, 8.767$ ), 而  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE 和 ROS 水平高于 Sev+si-ACSL4 组 ( $t=10.046, 4.004, 2.957, 3.752$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。结论 抑制 ACSL4 表达可通过激活 AMPK/mTOR 信号通路减轻 Sev 诱导的 SH-SY5Y 细胞铁死亡。

**关键词:** 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4; 神经元; 铁死亡; 七氟醚; AMPK/mTOR 信号通路

中图分类号: R392-33 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 06-067-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.011

## Experimental Study on the Mechanism of ACSL4 Inhibition of Sevoflurane-induced Neuronal Iron Death through the AMPK/mTOR Pathway

LIU Cheng, ZHAO Juan, JIA Qian, XIE Shengchun, LUO Bin, WEI Guanfeng (Department of Anesthesiology, Mianyang People's Hospital, Sichuan Mianyang 621000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role and mechanism of acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) in Sevoflurane (Sev) induced neuronal cell damage. **Methods** Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were used as the research object, and control group (dimethyl sulfoxide, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), Sev group and Sev+iron death inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) group were set up. CCK-8 method was used to detect cell activity in each group. 4.1% Sev exposed postoperative cognitive dysfunction model was constructed in vitro and divided into Ctrl group, Sev group, Sev+si-NC group, Sev+si-ACSL4 group, and Sev+si-ACSL4+compound C group according to the transfection category. The contents of Malonaldehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE), Glutathione (GSH) and  $\text{Fe}^{2+}$  in each group were detected by colorimetry. The level of reactive oxygen species was detected using a 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe. Real time fluorescence

基金项目: 四川省卫生健康委员会科研课题 (19SYJS15)。

作者简介: 刘成 (1986-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 麻醉药学, E-mail: liucheng198611@126.com。

通讯作者: 魏官锋 (1973-), 男, 副主任医师, 研究方向: 麻醉药学, E-mail: 625588509@163.com。

quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of ACSL4, glutathione peroxidase 4 (GPX4), and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11). Protein immunoblotting was used to detect the expression of ACSL4, GPX4, adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK), phosphorylated (p)-AMPK, mammalian target of rapamycin (mTOR) and p-mTOR proteins. **Results** CCK-8 results showed that the cell viability of Sev group ( $0.41 \pm 0.11$ ) was significantly lower than that of control group ( $0.98 \pm 0.07$ ), and the cell viability of Sev+Fer-1 group ( $0.83 \pm 0.09$ ) was significantly higher than that of Sev group ( $0.41 \pm 0.11$ ), and the differences were statistically significant ( $t=7.572, 5.118$ , all  $P<0.01$ ). The levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE, ROS and p-AMPK/AMPK ratios, as well as the mRNA and protein expression of ACSL4 in the Sev group cells, were higher than those in the Ctrl group ( $t=5.900, 7.421, 4.795, 13.517, 10.825, 9.945, 11.334$ ), the GSH content, p-mTOR/mTOR ratio, and mRNA and protein expression of SLC7A11 and GPX4 were lower than those in the Ctrl group ( $t=20.438, 3.551, 11.460, 12.211, 6.845, 8.287$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ) respectively. The levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE, ROS, and p-AMPK/AMPK ratios, as well as the mRNA and protein expression of ACSL4 in the Sev+si-ACSL4 group, were lower than those in the Sev+si-NC group ( $t=3.818, 3.164, 3.054, 4.465, 13.088, 7.918, 9.737$ ), the cell viability, GSH content, p-mTOR/mTOR ratio, and protein expression of SLC7A11 and GPX4 were higher than those in the Sev+si-NC group ( $t=2.912, 7.248, 7.574, 20.092, 5.915$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ), respectively. The cell viability, GSH content, SLC7A11, and GPX4 protein expression in the Sev+si-ACSL4+compound C group were lower than those in the Sev+si-ACSL4 group ( $t=4.435, 8.521, 4.522, 8.767$ ), while the levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE, and ROS were higher than those in the Sev+si-ACSL4 group ( $t=10.046, 4.004, 2.957, 3.752$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Inhibiting ACSL4 expression attenuates Sev-induced iron death in SH-SY5Y cells by activating the AMPK/mTOR signaling pathway.

**Keywords:** acyl-CoA synthetase long chain family member 4; neuronal; ferroptosis; sevoflurane; AMPK/mTOR pathway

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是外科手术术后神经系统的严重并发症, 表现为精神错乱、焦虑、认知记忆功能障碍和注意力丧失, 严重者可能出现抑郁和痴呆<sup>[1]</sup>, 影响患者的生活质量。七氟烷 (sevoflurane, Sev) 作为临床常用麻醉药物, 具有起效时间短、恢复快等特点, 但也有一定的神经毒性, 可引起 POCD<sup>[2-3]</sup>。因此, 减少 Sev 的副作用对防治 POCD 具有重要意义。LU 等<sup>[4]</sup>发现, 发育期大鼠短暂暴露于 Sev 可导致认知功能障碍, 但不影响神经元凋亡, 提示 Sev 可能通过诱导其他细胞死亡机制导致神经系统损伤。铁死亡是近期发现的一种非凋亡性细胞死亡过程, 与多种人类神经系统疾病的发展密切相关<sup>[5]</sup>。据报道, 铁代谢紊乱与麻醉药物的毒性机制有关<sup>[6]</sup>。然而, Sev 诱导的神经元铁死亡机制鲜有报道。酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 是铁死亡的重要调节器, 过表达 ACSL4 可诱发铁死亡相关途径的激活<sup>[7-8]</sup>。然而, ACSL4 与 Sev 诱导的神经元铁死亡之间的关系尚未可知。本研究旨在阐明 ACSL4 是否参与 Sev 诱导的神经元铁死亡及其可能的机制。

## 1 材料与方法

1.1 细胞来源 人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 仪器与试剂 Sev, 铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1

(Fer-1), compound C, 丙二醛 (Malonaldehyde, MDA) 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量测定试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司); DMEM/F12 培养液, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); ACSL4-siRNA 和阴性对照 (NC)-siRNA (上海吉凯基因有限公司); CCK-8 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 含量测定试剂盒和 2', 7'-二氯荧光素二乙酸盐 (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 活性氧检测试剂盒, ACSL4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4) 和磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (美国, Abcam 公司); 腺苷酸激活蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK), 磷酸化 (Phosphorylated, p)-AMPK, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 和 p-mTOR 抗体 (美国, 赛默飞公司)。Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); NIB 910 光学显微镜 (深圳博士达器械设备有限公司); HBS-ScanX 酶标仪 (南京德铁生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养: SH-SY5Y 细胞用添加 10g/dl 胎牛血清 (FBS), 100U/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/ml}$  链

霉素的DMEM/F12培养液培养,并置于37℃和5ml/dl CO<sub>2</sub>的湿度细胞培养箱中,待细胞长至对数生长期后,进行后续实验。

1.3.2 CCK-8法检测细胞活力:将SH-SY5Y细胞以 $1.5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板,分别设置二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, 10  $\mu$ mol/L)对照组、Sev组和Sev+Fer-1(10  $\mu$ mol/L)组以及不接种细胞的培养孔为空白对照组,每组设置3个复孔,24h后每孔加入10  $\mu$ l的CCK-8溶液孵育2h,于酶标仪450 nm处测量吸光度(A)值,依照以下公式计算各组细胞活力进行分析计算:细胞活力 =  $(A_{\text{药物处理组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}})$ 。

1.3.3 细胞转染和体外模型构建:将对数生长期的SH-SY5Y细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔细胞的密度接种于6孔板,当细胞达到60%融合时,使用Lipofectamine 2000进行转染。设置对照(Ctrl)组、七氟烷处理(Sev)组、Sev+si-NC组、Sev+si-ACSL4组和Sev+si-ACSL4+compound C组。Ctrl组和Sev组细胞正常培养不进行转染处理,Sev+si-NC组细胞转染阴性对照(NC)-siRNA,Sev+si-ACSL4组细胞转染ACSL4-siRNA,Sev+si-ACSL4+compound C组细胞同时转染ACSL4 siRNA和compound C,转染时间为12 h。除Ctrl组外,将其余组细胞暴露于4.1% Sev中6 h,构建POCD体外模型。

1.3.4 MDA, 4-HNE, GSH和Fe<sup>2+</sup>含量测定:取各组转染后的SH-SY5Y细胞,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤后重悬,超声破碎并收集上清液,根据MDA, 4-HNE, GSH和Fe<sup>2+</sup>含量测定试剂盒操作说明加入相应的工作液孵育,用酶标仪测定吸光度值。参考标准曲线计算MDA, 4-HNE, GSH和Fe<sup>2+</sup>含量。

1.3.5 细胞内活性氧水平检测:将各组SH-SY5Y细胞以 $1.5 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板,细胞贴壁后,弃去培养液。PBS洗涤2次,加入100  $\mu$ l培养液配置的DCFH-DA探针(10  $\mu$ mol/L),在37℃下避光孵育45 min。用无血清培养液洗涤细胞后,每个样本随机选取三个视野,通过荧光显微镜观察并应用Image J软件计算荧光强度,激发光与发射光波长分别为488 nm和525 nm。

1.3.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测ACSL4, GPX4和SLC7A11 mRNA表达:取上述对数生长期的Ctrl组和Sev组细胞, PBS洗涤三次后,加入1ml Trizol裂解液反复吹打后将其转移至无酶PE管,加入200  $\mu$ l氯仿,震荡15s,在4℃ 12 000  $\times$  g条件下离心15min,将上清液转移至新无酶PE管,加入500  $\mu$ l异丙醇,上下混匀,4℃ 12 000  $\times$  g离心取沉淀,用75ml/dl乙醇洗涤沉

淀,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水溶解沉淀即可得到RNA,吸取2  $\mu$ l RNA样品检测其纯度。使用反转录试剂盒合成第一链cDNA,用合成的cDNA作为模板进行PCR扩增,扩增体系为10  $\mu$ l,其中SYBR<sup>®</sup>Green Realtime PCR Master Mix 5  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l,上下游引物各0.2  $\mu$ l, DEPC水3.6  $\mu$ l; PCR程序:95℃ 60s; 95℃ 10s, 62℃ 10s, 72℃ 10s, 循环39次, 4℃保存备用。引物序列如下: ACSL4 F: 5'-CATCCCTGGAGCAGATACTCT-3', R: 5'-TCACTTAGGATTTCCTGGTC C-3'; GPX4 F: 5'-GGGCTACAACGTCAAATTCG-3', R: 5'-TCCACTTGATGGCATTTC-3'; 溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) F: 5'-TGCTGGGCTGATTTTATCTTCG-3', R: 5'-GAAAGGGCAACCATGAAGAGG-3'; GAPDH F: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', R: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式,以GAPDH为内参计算ACSL4和GPX4相对表达量。

1.3.7 Western blot检测ACSL4, GPX4和AMPK/mTOR通路相关蛋白表达:利用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取各组细胞蛋白后,用BCA试剂盒对各组细胞总蛋白浓度进行定量,加入5  $\times$  SDS蛋白电泳上样缓冲液,100℃煮样10min后,上样进行凝胶电泳分离蛋白(80V, 2h),电湿转(350mA, 2h)将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。8%封闭液室温封闭1h, 4℃下用抗ACSL4(1:300)、抗GPX4(1:200)、抗AMPK(1:300)、抗p-AMPK(1:500)、抗mTOR(1:300)和抗p-mTOR(1:500)抗体孵育过夜。次日,洗膜后利用相对应的HRP标记二抗室温孵育1h,再次洗膜后利用ECL试剂盒并用胶片显影,保存图像用Image J进行灰度值计算,用GAPDH作为内参,对目的蛋白进行定量统计分析。

1.4 统计学分析 采用SPSS 26.0统计学软件对数据进行分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本t检验;多组间比较采用单因素方差分析(one-way, ANOVA),然后进行Tukey's post hoc检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Sev暴露及对SH-SY5Y细胞活力的影响 对照组、Sev组和Sev+Fer-1组SH-SY5Y细胞活力分别为 $0.98 \pm 0.07$ ,  $0.41 \pm 0.11$ 和 $0.83 \pm 0.09$ 。与对照组相比,Sev组细胞活性明显降低( $t=7.572$ );与Sev组比较,Sev+Fer-1组细胞活力显著升高

( $t=5.118$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。

2.2 Sev 暴露对 SHSY5Y 细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量和 SLC7A11, GPX4 mRNA 水平的影响 与 Ctrl 组 SH-SY5Y 细胞相比, Sev 组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$  水平升高 ( $156.57 \pm 5.89$  vs  $100.23 \pm 6.93$ ), SLC7A11 ( $0.42 \pm 0.07$  vs  $1.03 \pm 0.06$ ) 和 GPX4 mRNA ( $0.45 \pm 0.08$  vs  $1.02 \pm 0.12$ ) 表达降低, 差异具有统计学意义 ( $t=10.730, 11.460, 6.845$ , 均  $P<0.01$ )。

2.3 干扰 ACSL4 基因表达对 SH-SY5Y 细胞 Sev

暴露后细胞活性的影响 见表 1。与 Ctrl 组 SH-SY5Y 细胞相比, Sev 组细胞 ACSL4 mRNA 和蛋白表达均升高, 而细胞活力降低, 差异具有统计学意义 ( $t=9.445, 11.334, 4.995$ , 均  $P<0.01$ )。与 Sev+si-NC 组比较, Sev+si-ACSL4 组细胞 ACSL4 mRNA 和蛋白表达均降低, 而细胞活力升高, 差异具有统计学意义 ( $t=7.918, 9.737, 2.912$ , 均  $P<0.05$ )。

表 1 各组 SH-SY5Y 细胞 ACSL4 表达和细胞活性比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	Ctrl 组	Sev 组	Sev+si-NC 组	Sev+si-ACSL4 组	F 值	P 值
ACSL4 mRNA	$1.03 \pm 0.05$	$3.12 \pm 0.38$	$3.39 \pm 0.42$	$1.38 \pm 0.13$	50.561	<0.001
ACSL4 蛋白	$0.43 \pm 0.08$	$1.32 \pm 0.11$	$1.39 \pm 0.13$	$0.56 \pm 0.07$	74.491	<0.001
细胞活力 /Ctrl	$1.03 \pm 0.04$	$0.47 \pm 0.19$	$0.52 \pm 0.12$	$0.83 \pm 0.14$	11.742	0.003

2.4 干扰 ACSL4 基因表达对 Sev 引起的 SH-SY5Y 细胞铁死亡的影响 见表 2。与 Ctrl 组 SH-SY5Y 细胞相比, Sev 组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE 和 ROS 水平均升高 ( $t=5.900, 7.421, 4.795, 13.517$ ), 而 GSH 含量和 SLC7A11, GPX4 蛋白表达均降低 ( $t=20.438, 12.211, 8.287$ ), 差异具有

统计学意义 (均  $P<0.05$ )。与 Sev+si-NC 组比较, Sev+si-ACSL4 组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ , MDA, 4-HNE 和 ROS 水平降低 ( $t=3.818, 3.164, 3.054, 4.465$ ), 而 GSH 含量和 SLC7A11, GPX4 蛋白表达升高 ( $t=7.248, 20.092, 5.915$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。

表 2 各组 SHSY5Y 细胞铁死亡相关指标水平比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	Ctrl 组	Sev 组	Sev+si-NC 组	Sev+si-ACSL4 组	F 值	P 值
$\text{Fe}^{2+}$ 含量 /Ctrl	$0.98 \pm 0.08$	$1.62 \pm 0.17$	$1.57 \pm 0.15$	$1.16 \pm 0.11$	15.465	0.001
MDA 含量 /Ctrl	$1.03 \pm 0.08$	$2.61 \pm 0.36$	$2.67 \pm 0.47$	$1.68 \pm 0.27$	17.350	<0.001
ROS 产量 /Ctrl	$0.96 \pm 0.03$	$3.08 \pm 0.27$	$3.27 \pm 0.58$	$1.68 \pm 0.21$	32.739	<0.001
4-HNE 含量 /Ctrl	$1.03 \pm 0.02$	$2.36 \pm 0.48$	$2.21 \pm 0.42$	$1.32 \pm 0.28$	8.539	0.036
GSH 含量 /Ctrl	$0.96 \pm 0.04$	$0.37 \pm 0.03$	$0.39 \pm 0.05$	$0.75 \pm 0.07$	78.205	<0.001
SLC7A11 蛋白	$0.88 \pm 0.09$	$0.23 \pm 0.02$	$0.25 \pm 0.03$	$0.83 \pm 0.04$	138.064	<0.001
GPX4 蛋白	$1.16 \pm 0.12$	$0.47 \pm 0.08$	$0.51 \pm 0.09$	$1.05 \pm 0.13$	32.844	<0.001

2.5 干扰 ACSL4 基因表达对 SH-SY5Y 细胞 AMPK/mTOR 信号通路的影响 见表 3。与 Ctrl 组 SH-SY5Y 细胞相比, Sev 组细胞 p-AMPK/AMPK 比率升高, p-mTOR/mTOR 比率降低, 差异具有统计学意义 ( $t=10.825, 3.551$ , 均  $P<0.05$ )。

与 Sev+si-NC 组比较, Sev+si-ACSL4 组细胞 p-AMPK/AMPK 比率降低, p-mTOR/mTOR 比率升高, 差异具有统计学意义 ( $t=13.088, 7.574$ , 均  $P<0.01$ )。

表 3 各组 SH-SY5Y 细胞 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	Ctrl 组	Sev 组	Sev+si-NC 组	Sev+si-ACSL4 组	F 值	P 值
p-AMPK/AMPK	$1.03 \pm 0.12$	$2.28 \pm 0.16$	$2.21 \pm 0.38$	$1.32 \pm 0.21$	20.821	<0.001
p-mTOR/mTOR	$1.06 \pm 0.07$	$0.41 \pm 0.05$	$0.45 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.05$	94.426	<0.001

2.6 抑制 AMPK/mTOR 信号通路对 Sev 暴露的 SH-SY5Y 细胞活性和铁死亡相关蛋白表达的影响 见表 4。与 Sev+si-ACSL4 组 SH-SY5Y 细胞相比, Sev+si-ACSL4+compound C 组细胞的活性、

GSH 含量以及 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达降低,  $\text{Fe}$ , MDA, 4-HNE 和 ROS 水平升高, 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。

表 4 各组 SHSY5Y 细胞活性和铁死亡相关蛋白表达的比较 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

项目	Sev+si-ACSL4 组	Sev+si-ACSL4+compound C 组	t 值	P 值
细胞活力 /Ctrol	0.78 ± 0.06	0.58 ± 0.05	4.435	0.011
Fe <sup>2+</sup> 含量 /Ctrol	1.18 ± 0.04	1.47 ± 0.03	10.046	0.001
MDA 含量 /Ctrol	1.52 ± 0.23	2.34 ± 0.27	4.004	0.016
ROS 产量 /Ctrol	2.03 ± 0.12	2.67 ± 0.27	3.752	0.020
4-HNE 含量 /Ctrol	1.42 ± 0.26	2.06 ± 0.27	2.957	0.042
GSH 含量 /Ctrol	0.74 ± 0.02	0.52 ± 0.04	8.521	0.001
SLC7A11 蛋白	3.72 ± 0.91	1.32 ± 0.13	4.522	0.011
GPX4 蛋白	2.63 ± 0.11	1.43 ± 0.21	8.767	0.001

3 讨论

Sev 作为临床常用麻醉药物可对神经元产生毒性作用并导致持续性认知障碍，这一问题日益受到关注<sup>[9-10]</sup>。然而，迄今为止，它的神经毒性作用机制尚未阐明。铁死亡是一种公认的以脂质过氧化和活性氧积累为特征的细胞程序性死亡机制<sup>[11]</sup>。研究证实，铁死亡在麻醉药物诱导的神经毒性和认知功能障碍中起着关键作用，并已成为麻醉药物神经毒性防治的新靶点<sup>[12]</sup>。SH-SY5Y 细胞是呈现出类似原代神经元特征的细胞系，被广泛应用于研究化合物对神经元的保护作用，可以作为 Sev 神经毒性机制研究的模型。本研究利用 Sev 处理 SH-SY5Y 细胞建立体外 POCD 模型，发现铁螯合剂 Fer-1 能够明显抑制 Sev 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力下降。提示抑制 Sev 诱导的神经元铁死亡可能是防治 POCD 的关键机制。

ACSL4 是铁死亡通路上的关键基因，它能合成花生四烯酰 CoA 和肾上腺酰 CoA，进而参与膜磷脂合成。铁死亡诱导剂 RSL3 可使膜上的长链多不饱和脂肪酸容易被氧化，从而引发细胞铁死亡，因此 ACSL4 通过参与易被氧化的膜磷脂而成为铁死亡发生的必需分子<sup>[13]</sup>。MA 等<sup>[14]</sup>发现，ACSL4 上调可增加卵巢癌细胞对铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 诱导的铁死亡的敏感度。XU 等<sup>[15]</sup>指出，敲除 ACSL4 可减少脂质过氧化，增加 GSH 和 GPX4 的表达，抑制铁蛋白分泌，最终减轻缺血再灌注诱导的肺损伤。由此可见，ACSL4 是细胞铁死亡的重要调控因子。本研究结果显示，Sev 暴露增加了 SH-SY5Y 细胞 ACSL4 的表达，沉默 ACSL4 可促进 SH-SY5Y 细胞的活力，推测其可能和抑制铁死亡相关。

研究发现，铁稳态可维持机体细胞正常的生理功能，但当细胞内 Fe<sup>2+</sup> 过载引起铁代谢紊乱时，能够产生大量 ROS 破坏细胞的 DNA 和蛋白质等<sup>[11]</sup>。目前大量研究证实，可通过释放细胞内 Fe<sup>2+</sup> 作为氧

化应激反应的催化剂，促进 ROS 生成对细胞产生损伤，进而诱导铁死亡的发生<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示，Sev+si-ACSL4 组细胞中 Fe<sup>2+</sup> 含量明显降低，提示敲除 ACSL4 可通过抑制神经元中铁含量而抑制细胞铁死亡，改善 Sev 诱导的神经毒性。铁死亡依赖于铁的脂质过氧化，MDA 和 4-HNE 作为脂质过氧化的产物，被视作铁死亡的标志之一<sup>[18]</sup>。GSH 和 GPX4 等抗氧化分子能够抵抗铁死亡，两者共同作用可将脂质过氧化物还原为无细胞毒性的脂质醇。GSH 合成受阻时，GPX4 活性下降，细胞抗氧化能力下降，导致 ROS 积累。本研究结果显示，敲除 ACSL4 后细胞内 GSH 和 GPX4 水平增加，ROS，MDA 和 4-HNE 含量降低，这些结果提示敲除 ACSL4 可能通过调节氧化应激抑制铁死亡，进而改善 Sev 诱导的神经毒性。

作为一种中枢能量代谢开关，AMPK 在细胞功能过程中发挥关键作用，如细胞增殖、死亡和存活<sup>[19]</sup>。它对于维持线粒体内环境稳定至关重要，而线粒体内环境稳态是控制铁死亡的重要因素<sup>[20]</sup>。值得注意的是，AMPK 可抑制乙酰辅酶 A 羧化酶街道的多不饱和脂肪酸生物合成，从而抑制铁死亡<sup>[21]</sup>。近期研究表明，SIRT3 缺陷可抑制 AMPK/mTOR 信号的激活，并增加 GPX4 表达，从而抑制滋养层细胞中高糖和促胰岛素诱导的自噬依赖性铁死亡增多<sup>[22]</sup>。此外，抑制 AMPK 可逆转 SIRT3 诱导的铁死亡，这意味着 AMPK/mTOR 信号传导的激活可诱导铁死亡。与这些研究结果一致，本研究表明，Sev 抑制了 SH-SY5Y 细胞 AMPK/mTOR 信号通路的激活，而敲低 ACSL4 则减弱了 Sev 的抑制作用。重要的是，compound C 对 AMOK/mTOR 通路的抑制可减轻 ACSL4 沉默对 Sev 诱导铁死亡的保护作用。上述结果提示，ACSL4 敲低通过激活 AMOK/mTOR 信号通路而显示出对 Sev 诱导的神经元铁死亡的保护作用。

综上所述，本研究发现干扰 ACSL4 表达可通

过激活 AMPK/mTOR 信号通路减轻 Sev 诱导的 SH-SY5Y 细胞铁死亡。这些发现揭示了 ACSL4 在 Sev 诱导 POCD 中的新的分子机制,为临床治疗提供了一个新的靶点。然而,目前的研究尚存在部分局限性,未进行动物或人体组织验证实验,难以得出可靠的结论,有待于接下来进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] WANG Congmei, CHEN Weican, ZHANG Yan, et al. Update on the mechanism and treatment of sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction [J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2021, 13: 702231.
- [2] SUN Mingyang, XIE Zhongcong, ZHANG Jiaqiang, et al. Mechanistic insight into sevoflurane-associated developmental neurotoxicity[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2022, 38(6): 927-943.
- [3] AKSENOV D P, MILLER M J, DIXON C J, et al. Impact of anesthesia exposure in early development on learning and sensory functions[J]. *Developmental Psychobiology*, 2020, 62(5): 559-572.
- [4] LU Yi, HUANG Yan, JIANG Jue, et al. Neuronal apoptosis may not contribute to the long-term cognitive dysfunction induced by a brief exposure to 2% sevoflurane in developing rats[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2016, 78: 322-328.
- [5] WU Ya'nan, SONG Juan, WANG Yafeng, et al. The potential role of ferroptosis in neonatal brain injury[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13: 115.
- [6] ZUO Yong, CHANG Yanzhong, THIRUPATHI A, et al. Prenatal sevoflurane exposure: effects of iron metabolic dysfunction on offspring cognition and potential mechanism[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2021, 81(1): 1-9.
- [7] KUWATA H, HARA S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2019, 144: 106363.
- [8] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(1): 91-98.
- [9] 马磊,蔡亲东,陈基胜.老年全麻患者血清 HIF-1 $\alpha$ , S-100 $\beta$  蛋白, BDNF 水平及 rSO<sub>2</sub> 的动态检测与围术期神经认知紊乱的相关性分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(5): 153-158.  
MA Lei, CAI Qindong, CHEN Jisheng. Correlation analysis of dynamic detection of serum HIF-1 $\alpha$ , S-100 $\beta$  protein, BDNF and rSO<sub>2</sub> with perioperative neurocognitive disorders in elderly patients undergoing general anesthesia [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(5): 153-158.
- [10] 胡雨蛟,吴安国,欧册华.麻醉药物的神经保护作用与神经毒性研究进展 [J]. *西南医科大学学报*, 2021, 44(2): 181-186.  
HU Yujiao, WU Anguo, OU Cehua. Research progress in neuroprotection and neurotoxicity of anesthetics[J]. *Journal of Southwest Medical University*, 2021, 44(2): 181-186.
- [11] MASALDAN S, BUSH A I, DEVOS D, et al. Striking while the iron is hot: iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 133: 221-233.
- [12] XIA Yimeng, SUN Xiaoyun, LUO Yan, et al. Ferroptosis contributes to isoflurane neurotoxicity[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 486.
- [13] CHEN Xin, LI Jingbo, KANG Rui, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [14] MA Linlin, LIANG Lin, ZHOU Dan, et al. Tumor suppressor miR-424-5p abrogates ferroptosis in ovarian cancer through targeting ACSL4[J]. *Neoplasma*, 2021, 68(1): 165-173.
- [15] XU Yixin, LI Xuehan, CHENG Yan, et al. Inhibition of ACSL4 attenuates ferroptotic damage after pulmonary ischemia-reperfusion[J]. *FASEB Journal*, 2020, 34(12): 16262-16275.
- [16] 张丽. ACSL4 通过介导铁死亡来调节子痫前期中滋养层细胞的迁移和侵袭 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2023, 31(8): 1615-1621.  
ZHANG Li. ACSL4 regulates trophoblast migration and invasion in preeclampsia by mediating iron death[J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2023, 31(8): 1615-1621.
- [17] 马雪,刘凡,王强,等.电针对帕金森病小鼠铁死亡诱导的氧化应激及细胞凋亡的影响 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(12): 1242-1248.  
MA Xue, LIU Fan, WANG Qiang, et al. Effect of electroacupuncture on oxidative stress and cell apoptosis induced by ferroptosis in mice with Parkinson's disease[J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(12): 1242-1248.
- [18] 孔维轩,杨鹏杰,魏起友,等.通过抑制铁死亡减轻脓毒症引起急性肺损伤的研究 [J]. *联勤军事医学*, 2023, 37(12): 998-1002, 1022.  
KONG Weixuan, YANG Pengjie, WEI Qiyu, et al. Experimental study of reducing sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis[J]. *Military Medicine of Joint Logistics*, 2023, 37(12): 998-1002, 1022.
- [19] LIN Shengcai, HARDIE D G. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(2): 299-313.
- [20] GAO Minghui, YI Junmei, ZHU Jiajun, et al. Role of mitochondria in ferroptosis[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(2): 354-363, e3.
- [21] LEE H, ZANDKARIMI F, ZHANG Yilei, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(2): 225-234.
- [22] HAN Dandan, JIANG Lili, GU Xiaolong, et al. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(11): 8839-8851.

收稿日期: 2023-12-10

修回日期: 2024-04-10