

基于 NLRP3 炎症小体介导的铁死亡探究七氟烷诱导的大鼠术后认知功能障碍的作用机制

李磊, 王鹏程, 张国庆, 王震* (驻马店市中心医院麻醉科, 河南 驻马店 463000)

摘要:目的 探究 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体介导的铁死亡机制在七氟烷 (Sev) 诱导大鼠术后认知功能障碍 (POCD) 中的作用。方法 采取体积分数 4% Sev 吸入麻醉及腹腔探查术构建 POCD 大鼠模型。首先, 将 18~20 月龄 SD 大鼠随机分为对照组 (Control) 和 Sev 麻醉组, 每组各 10 只。其次, 将 SD 大鼠随机分为 Control 组、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体抑制剂组 (MCC950)、Sev 组、Sev + MCC950 组, 每组各 10 只。MCC950 组和 Sev + MCC950 组大鼠麻醉前 1 h 腹腔注射 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MCC950; Control 组和 Sev 组大鼠腹腔注射等量的生理盐水。通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆功能, HE 染色观察海马组织病理学变化, TUNEL 检测海马神经元细胞凋亡情况, 普鲁士蓝染色检测海马组织铁离子沉积情况, Western blot 检测海马组织 NLRP3 炎症小体相关蛋白及细胞铁死亡相关蛋白表达, ELISA 检测海马组织氧化应激水平, 比色法检测 Fe^{2+} 含量, 二氢乙锭 (DHE) 染色法检测活性氧 (ROS) 水平。结果 与 Control 组相比, MCC950 组大鼠学习记忆功能、海马组织结构形态、海马组织氧化应激、ROS 及 Fe^{2+} 水平、NLRP3 炎症小体相关蛋白及细胞铁死亡相关蛋白表达均无明显差异 ($P > 0.05$), Sev 和 Sev + MCC950 组大鼠出现明显的学习记忆功能障碍和海马组织病理损伤, 海马组织超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) 活性显著降低, 丙二醛 (MDA)、ROS、 Fe^{2+} 水平显著升高, NLRP3 炎症小体相关蛋白和 ACSL4 蛋白表达显著升高, SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠学习记忆功能, 海马组织病理损伤程度明显减轻, 海马组织 SOD、GSH 活性显著增强, MDA、ROS、 Fe^{2+} 水平显著降低, NLRP3 炎症小体相关蛋白和 ACSL4 蛋白表达显著降低, SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。结论 Sev 诱导大鼠 POCD, 其机制可能与激活 NLRP3 炎症小体诱导的海马神经元细胞铁死亡有关。

关键词: 术后认知功能障碍; 七氟烷; NOD 样受体蛋白 3 炎症小体; 铁死亡

doi: 10.11669/epj.2024.19.006 中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)19-1825-09

The Role of NLRP3 Inflammasome-mediated Ferroptosis in Sevoflurane-Induced Postoperative Cognitive Dysfunction in Rats

LI Lei, WANG Pengcheng, ZHANG Guoqing, WANG Zhen* (Department of Anesthesia, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the role of NLRP3 inflammasome-mediated ferroptosis in sevoflurane (Sev) induced postoperative cognitive dysfunction (POCD) in rats. **METHODS** The POCD rat model was established by 4% Sev inhalation anesthesia and abdominal exploration. Firstly, 18-20-month-old SD rats were randomly divided into control group and Sev anesthesia group, with 10 rats in each group. Secondly, SD rats were randomly divided into control group, NLRP3 inflammasome inhibitor group (MCC950), Sev group, and Sev + MCC950 group, with 10 rats in each group. The rats in MCC950 group and Sev + MCC950 group were intraperitoneally injected with $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MCC950 at 1 h before anesthesia. The rats in the control group and Sev group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. The learning and memory function of the rats was detected by Morris water maze test, the histopathological changes of hippocampus was observed by HE staining, the apoptosis of hippocampal neurons was detected by TUNEL, Prussian blue staining was used to detect iron deposits in the hippocampus, and the expressions of NLRP3 inflammasome-related proteins and ferroptosis-related proteins in hippocampus were detected by Western blot. Detection of oxidative stress levels in hippocampal tissue by ELISA, the content of Fe^{2+} was detected by colorimetry, and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by DHE staining. **RESULTS** Compared with the control group, there were no significant differences in learning and memory function, hippocampal tissue structure, oxidative stress, ROS and Fe^{2+} levels, NLRP3 inflammasome-related proteins and ferroptosis-related proteins expression in MCC950 group ($P > 0.05$). In the Sev group and Sev + MCC950 group of rats, there were significant

作者简介: 李磊, 男, 本科, 主治医师 研究方向: 麻醉学临床及其机制研究 * **通讯作者:** 王震, 男, 本科, 副主任医师 研究方向: 麻醉学临床及其机制研究 Tel: (0396)2726003

learning and memory dysfunction and pathological injury of hippocampus, the activities of SOD and GSH in hippocampus were significantly decreased, the levels of MDA, ROS and Fe^{2+} were significantly increased, and the expressions of NLRP3 inflammasome related proteins and ACSL4 proteins were significantly increased, the protein expressions of SLC7A11 and GPX4 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the Sev group, the learning and memory function of rats and the degree of pathological damage of hippocampal tissue were significantly alleviated, the activities of SOD and GSH in hippocampal tissue were significantly increased, the levels of MDA, ROS and Fe^{2+} were significantly decreased, and the expressions of NLRP3 inflammasome-related proteins and ACSL4 proteins were significantly decreased, the protein expressions of SLC7A11 and GPX4 were significantly increased in the Sev + MCC950 ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Sev induces POCD in rats, and its mechanism may be related to the activation of NLRP3 inflammasome-induced neuronal ferroptosis in the hippocampus.

KEY WORDS: postoperative cognitive dysfunction; sevoflurane; NLRP3 inflammasome; ferroptosis

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是全身麻醉后影响中枢神经系统的常见并发症之一, 临床主要表现为注意力、记忆等认知功能障碍^[1]。POCD 可导致患者术后神经功能恢复时间延长, 尤其是对老年患者的生活能力和生活质量影响较为严重^[2]。有研究表明, 年龄的增加是 POCD 的独立危险因素, 老年患者 POCD 发病率高达 15% ~ 60%, 已经成为麻醉学领域研究的热点及社会关注的重点问题^[3]。因此, 探究 POCD 的致病机制对于临床防治 POCD 具有重要意义。

多项研究均已证明, POCD 的病理生理机制与神经炎症^[4]、氧化应激^[5]以及细胞凋亡^[6]等相关, 但是确切的级联反应机制仍难以确定。NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体作为神经炎症的关键驱动因素能够通过促进炎症细胞因子释放, 加重神经功能损伤^[7]。此外, NLRP3 炎症小体活化是诱导老年大鼠 POCD 的重要病理机制, 而抑制 NLRP3 炎症小体活化能够有效改善老年大鼠 POCD^[8], 提示 NLRP3 炎症小体可能是 POCD 致病的重要机制。

铁死亡是一种新型的细胞可调节性死亡, 区别于细胞凋亡、自噬和坏死, 是铁依赖的脂质过氧化物代谢异常, 进而导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生增加, 诱发脂质过氧化反应, 并最终触发细胞死亡^[9]。研究显示, 在 POCD 大鼠海马组织中存在神经元铁死亡发生, 抑制神经元铁死亡能够明显改善大鼠 POCD^[10], 表明神经元铁死亡可能是 POCD 的关键调节机制。Wu 等^[11]研究证实, 采用 NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 处理能够降低海马组织 ROS 聚集, 减弱大鼠脑缺血再灌注诱导的神经元铁死亡。

目前有关 NLRP3 炎症小体与铁死亡的调控关系在 POCD 中的作用尚不清楚。越来越多的研究证据表明, 吸入性麻醉药可引起老年患者神经系统毒

性和认知功能减退^[12-13]。七氟烷 (sevoflurane, Sev) 是临床广泛性使用的吸入性麻醉剂, 可通过多种分子机制诱发 POCD 的发生^[14]。因此, 本研究拟通过 Sev 诱导建立老年大鼠 POCD 模型, 探究 NLRP3 炎症小体介导的铁死亡在其中的作用, 以期 POCD 的致病机制研究提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性, 18 ~ 20 月龄, SPF 级, 体质量 550 ~ 600 g, SD 大鼠 60 只, 购自于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK (沪) 2022-0008]。动物房温度为 (25 ± 1) °C, 环境相对湿度为 50% ~ 60%, 房间内光照黑暗交替, 动物自由饮食饮水。本研究通过驻马店市中心医院医学研究伦理委员会审批 (批准号: LLSC2022010279)。

1.1.2 试剂 Sev (批号: 8023469, 江苏恒瑞医药有限公司); MCC950 (批号: S7809, 美国 Selleck 公司); 原位末端标记染色 (TUNEL) 试剂盒、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、蛋白质浓度测定试剂盒、显影液、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体、溶质载体家族 7 成员 11 (recombinant solute carrier family 7, member 11, SLC7A11) 抗体及 β -actin 抗体 (批号: C1088、C0105S、P0011、P0018FS、A0409、A0413、AF7020、AF7992、AF0003, 上海碧云天生物技术公司); 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 抗体 (批号: ab155282, 英国 Abcam 公司); 二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE, 批号: D11347, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH)、 Fe^{2+} 检测试剂盒 (批号: A001-3-2、

A003-1-2、A005-1-2、A039-2-1,南京建成生物工程研究所);NLRP3 抗体、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体、cleaved-caspase-1 抗体、IL-1 β 抗体、IL-18 抗体(批号:15101、67824、89332、12242、57058,美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.1.3 仪器 BX53 型光学显微镜、BX43 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);H-2050R-1 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);LD-96A 型酶标仪(山东莱恩德智能科技有限公司);Gel dox XR⁺ 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及 POCD 大鼠模型构建 首先,将 20 只 SD 大鼠随机分为对照组(Control)和 POCD 模型组,每组各 10 只。采用 4% Sev 吸入麻醉 6 h 及腹腔探查术构建 POCD 大鼠模型^[15-16]:首先将大鼠放置于麻醉诱导箱内麻醉,麻醉箱进气口由麻醉机通入体积分数 4% Sev + 2 L \cdot min⁻¹体积分数 30% 氧气混合气体,待大鼠麻醉后经腹部正中做大约 3 cm 长度切口,行腹腔探查术,探查术结束后腹腔注射青霉素(16 u \cdot kg⁻¹)抗感染。除 Control 组外,其余各组大鼠术后迅速置于麻醉诱导箱内,以体积分数 4% Sev + 30% 氧气混合流通气量 2 L \cdot min⁻¹速度持续吸入 6 h 构建大鼠 POCD 模型。Control 组大鼠进行腹腔探查,仅放置于麻醉箱内吸入空气及 O₂ 混合气体。其次,将 SD 大鼠随机分为 Control 组、MCC950 组、Sev 组、Sev + MCC950 组,每组各 10 只。除 Control 组外,其余各组大鼠均采取体积分数 4% sev 吸入麻醉及腹腔探查术构建 POCD 大鼠模型。MCC950 组和 Sev + MCC950 组大鼠麻醉前 1 h 腹腔注射 3 mg \cdot kg⁻¹ MCC950^[17];Control 组和 Sev 组大鼠腹腔注射等量的生理盐水。

1.2.2 Morris 水迷宫实验评估大鼠认知功能 大鼠麻醉术后 1 d 进行 Morris 水迷宫实验,将水迷宫划分 4 个象限,任意选择其中 1 个象限水面下放置隐蔽平台,将大鼠从任意象限入水点放入水中,记录大鼠寻找到隐蔽平台的时间,记为逃避潜伏期。每组大鼠均在 4 个象限入水点分别训练 2 次,每次间隔 15 min,持续 4 d,记录第 5 天的逃避潜伏期。于第 6 天对大鼠进行空间探索实验,将隐蔽平台撤去,选择任意入水点放入大鼠,记录各组大鼠在 60 s 内穿越平台的次数及目标象限停留时间占比。

1.2.3 海马组织 HE 染色、普鲁士蓝染色 取大鼠

脑组织,剥离海马组织,采用浓度 0.04 g \cdot mL⁻¹多聚甲醛固定海马组织 1 d,经石蜡包埋、切片、脱蜡等步骤,行 HE 染色和普鲁士蓝染色,并于显微镜下观察海马组织病理学变化。海马神经元损伤程度评级通过半定量方式评估。评级分为 5 级,海马神经元损伤 <20% 为 1 级,20% ~ 40% 为 2 级,40% ~ 60% 为 3 级,60% ~ 80% 为 4 级,80% ~ 100% 为 5 级。

1.2.4 海马神经元细胞凋亡检测 37 $^{\circ}$ C 下将海马组织用蛋白酶 K 溶液孵育 20 min,将 TUNEL 染色液与海马组织切片共孵育 1 h,最后使用二氨基联苯胺显色液将切片孵育 5 min,于显微镜下观察并计数海马神经元凋亡数量,每只大鼠选取 3 张切片,每张切片随机选取 5 个不同视野,取平均值。

1.2.5 氧化应激指标、Fe²⁺ 水平检测 取各组大鼠海马组织,加入预冷的浓度 0.009 g \cdot mL⁻¹的氯化钠溶液充分碾磨,置于高速冷冻离心机内并设置转速 3 000 r \cdot min⁻¹,离心时长 15 min;吸取上清液,比色法检测海马组织匀浆中 Fe²⁺ 含量,ELISA 法检测匀浆中 MDA、SOD、GSH 含量。

1.2.6 ROS 水平检测 取出 OTC 冻存液中海马组织,冰冻切片切片,切片放置在 37 $^{\circ}$ C Krebs/Hepes 缓冲溶液中孵育 30 min,PBS 清洗,加入 DHE 染色液,37 $^{\circ}$ C 孵育盒内孵育 30 min。于 400 倍显微镜下观察海马组织 ROS 染色情况。采用 ImagePro Plus 6.0 软件对海马组织 ROS 相对水平进行半定量分析。

1.2.7 电镜观察海马神经元病理变化 室温条件下,大鼠海马组织采用质量浓度 0.025 g \cdot mL⁻¹的戊二醛固定 2 h,继续放置 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜,固定的组织使用乙醇脱水并嵌入超薄切片中,最后使用乙酸铀酰和柠檬酸铅进行切片复染,于透射电镜下观察海马组织神经元超微结构变化。

1.2.8 Western blot 检测 NLRP3 炎症小体和铁死亡相关蛋白表达 提取大鼠海马组织蛋白,蛋白质变性、上样、凝胶电泳转膜,脱脂牛奶封闭后加入 ACSL4、SLC7A11、GPX4、NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 、IL-18(稀释比例均为 1:1 000)及 β -actin(1:5 000)一抗抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、洗膜,室温下加入对应的二抗孵育 2 h,洗膜,滴加显影液并通过发光成像系统显影,拍照。最后使用 ImagePro Plus 6.0 对上述蛋白条带相对表达定量。

1.2.9 统计学分析 SPSS 22.0 软件进行统计学数据处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间存在差异采

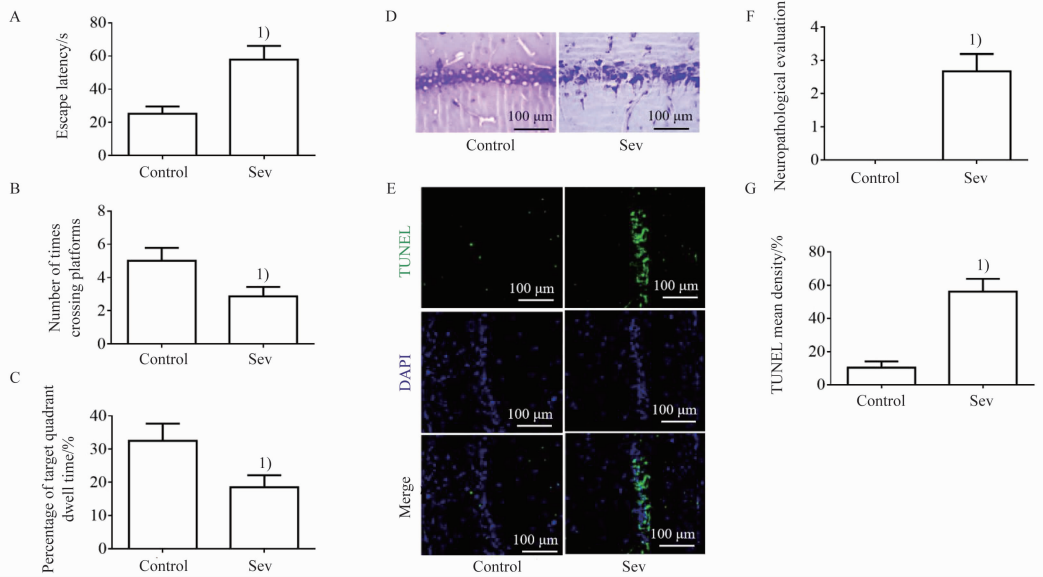
用 SNK-q 检验进行两两比较;两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Sev 对大鼠神经功能的影响

与 Control 组相比,Sev 组大鼠逃避潜伏期延长,

穿越平台次数和目标象限停留时间占比降低(图 1A~C, $P < 0.05$)。显微镜下观察海马 CA1 区域神经元排列紊乱,有部分神经元结构出现细胞核固缩、坏死等现象,神经元损伤评级明显增加(图 1D, $P < 0.05$),且海马区域神经元细胞凋亡率显著升高(图 1E, $P < 0.05$)。



A - Sev 对大鼠逃避潜伏期的影响; B - Sev 对大鼠穿越平台次数的影响; C - Sev 对目标象限停留时间占比的影响; D - 海马组织 CA1 区域病理学染色 (HE, 200 ×); E - Sev 对海马神经元细胞凋亡的影响 (TUNEL, 200 ×); F - 神经病理学评估; G - TUNEL 阳性细胞比率; 与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

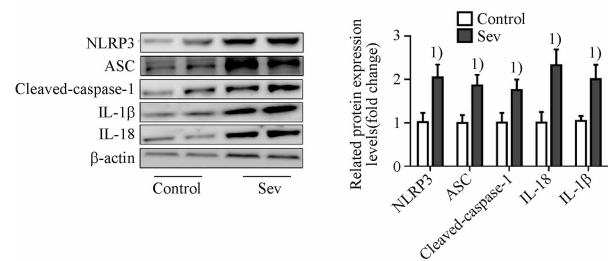
A - effect of Sev on escape latency in rats; B - Sev on the number of crossing the platform; C - effect of Sev on percentage of target quadrant dwell time; D - pathological staining of hippocampal CA1 region (HE, 200 ×); E - effect of Sev on apoptosis of hippocampal neurons (TUNEL, 200 ×); F - Neuropathological evaluation; G - Percentage of TUNEL positive cells; ¹⁾ $P < 0.05$, vs control.

图 1 七氟烷 (Sev) 对大鼠神经功能的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of sevoflurane on neural function in rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.2 Sev 对大鼠海马组织 NLRP3 炎症小体的影响

与 Control 组相比,Sev 组大鼠海马组织 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达均显著升高(图 2, $P < 0.05$)。



与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, vs control.

图 2 Sev 对大鼠海马组织 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体相关蛋白表达的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

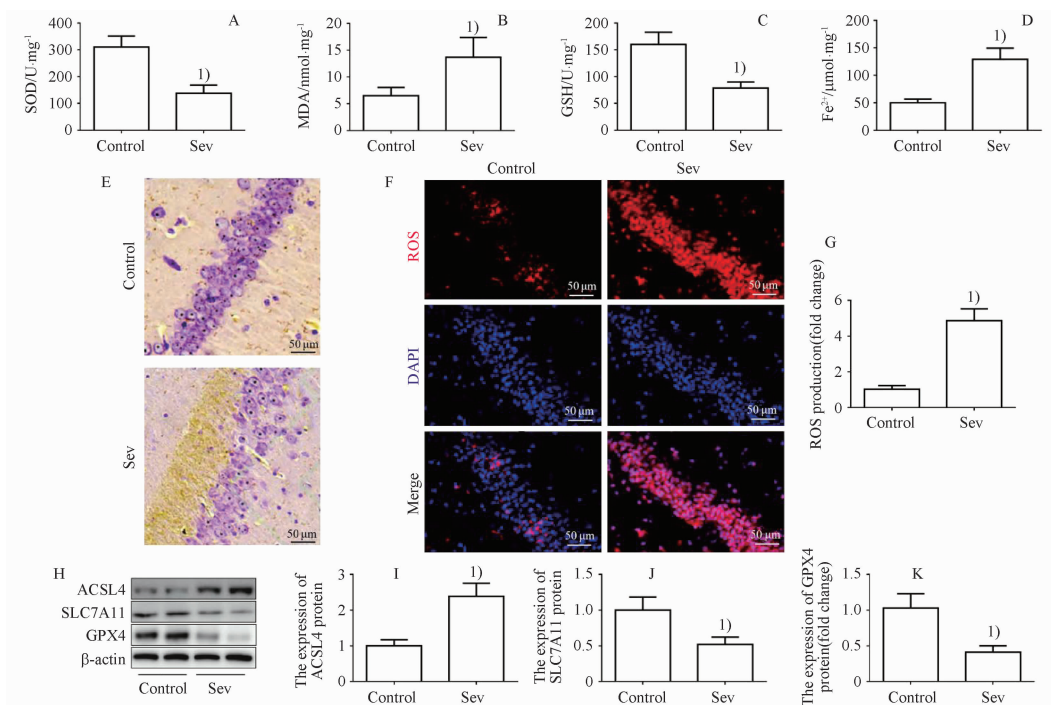
Fig. 2 Effects of sevoflurane on the expression of NLRP3 inflammasome related proteins in rat hippocampal tissue. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 Sev 对大鼠神经元细胞铁死亡的影响

与 Control 组相比,Sev 组大鼠海马组织 SOD、GSH 活性显著降低,MDA、Fe²⁺ 水平显著升高(图 3A~3D, $P < 0.05$)。普鲁士蓝染色显示棕黄色颗粒为海马组织铁离子沉积,与 Control 组相比,Sev 组大鼠海马组织 CA1 区域棕黄色铁离子沉积明显增加(图 3E, $P < 0.05$),ROS 水平升高(图 3F, $P < 0.05$)。Western blot 检测显示,与 Control 组相比,Sev 组大鼠海马组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著降低,ACSL4 蛋白表达显著升高(图 3G, $P < 0.05$)。

2.4 MCC950 对 POCD 大鼠神经功能的影响

与 Control 组相比, MCC950 组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数和目标象限停留时间占比均无显著性差异 ($P > 0.05$), Sev 组和 Sev + MCC950 组大鼠逃避潜伏期延长,穿越平台次数和目标象限停留时间占比降低 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比,



A - Sev 对海马组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响; B - Sev 对海马组织丙二醛(MDA)含量的影响; C - Sev 对海马组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)活性的影响; D - Sev 对海马组织 Fe^{2+} 水平的影响; E - 普鲁士蓝染色检测海马组织第一区域(cornu ammonis 1)铁沉积($400\times$); F - Sev 对海马组织活性氧(ROS)水平的影响(DHE, $400\times$); G - 海马组织 ROS 水平统计柱状图; H - ACSL4、SLC7A11、GPX4 蛋白表达; I - ACSL4 蛋白表达统计柱状图; J - SLC7A11 蛋白表达统计柱状图; K - GPX4 蛋白表达统计柱状图; 与 control 组相比, $^{1)}P < 0.05$ 。

A - effect of Sev on SOD activity in hippocampus; B - effect of Sev on MDA content in hippocampus; C - effect of Sev on GSH activity in hippocampus; D - effect of Sev on Fe^{2+} level in hippocampus; E - iron deposits of CA1 in hippocampus were detected by Prussian blue staining ($400\times$); F - effect of Sev on ROS levels in hippocampus (DHE, $400\times$); G - Histogram of ROS levels in hippocampal tissue; H - The expression of ACSL4, SLC7A11, GPX4 proteins; I - Histogram of ACSL4 protein expression; J - Histogram of SLC7A11 protein expression; K - Histogram of GPX4 protein expression; $^{1)}P < 0.05$, vs control.

图3 Sev 对大鼠神经元细胞铁死亡的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of sevoflurane on ferroptosis in rat neuronal cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Sev + MCC950 组大鼠逃避潜伏期缩短, 穿越平台次数和目标象限停留时间占比增加(图 4A, $P < 0.05$)。HE 染色显示, Control 组和 MCC950 组大鼠海马 CA1 区域神经元排列整齐, 细胞质着色均匀, 轮廓清晰, 结构形态无明显异常。Sev 组大鼠海马神经元排列紊乱, 细胞核固缩, 轮廓模糊, 且伴有大量神经元坏死, 结构出现明显异常。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠海马 CA1 区域神经元细胞排列紊乱程度减轻, 轮廓较为清晰, 且神经元坏死明显减少, 结构得到明显恢复(图 4B)。

2.5 MCC950 对 POCD 大鼠海马组织 NLRP3 炎症小体的影响

与 Control 组相比, MCC950 组大鼠海马组织 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$), Sev 组和 Sev + MCC950 组大鼠海马组织 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠

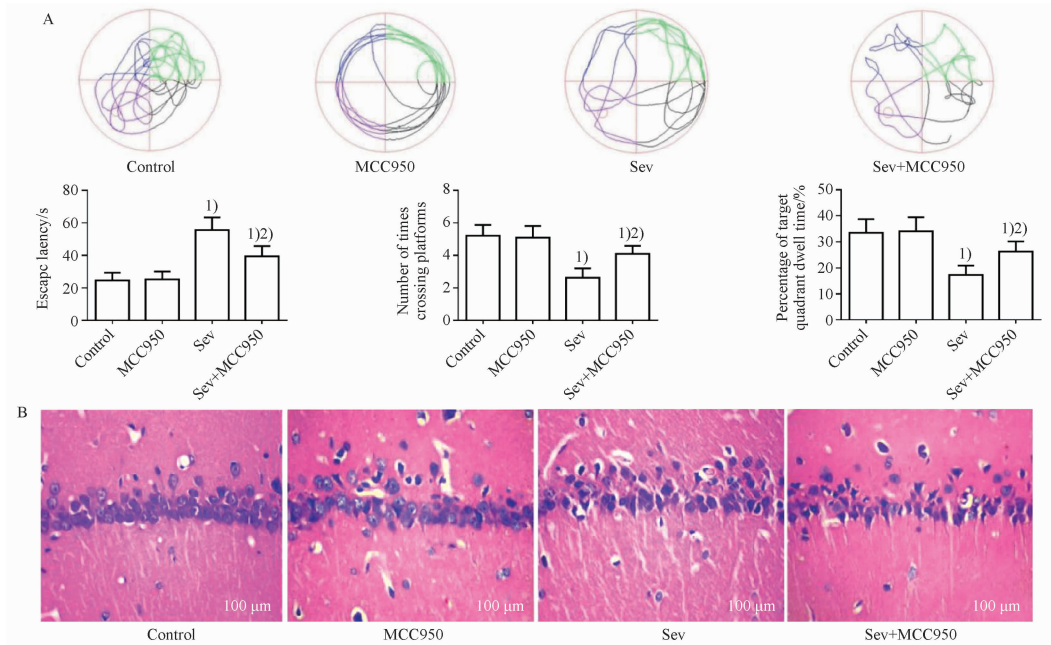
海马组织 NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达均显著降低(图 5, $P < 0.05$)。

2.6 MCC950 对 POCD 大鼠海马组织氧化应激水平的影响

与 Control 组相比, MCC950 组大鼠海马组织 SOD、GSH 活性, MDA 含量无显著性差异 ($P > 0.05$), Sev 组和 Sev + MCC950 组大鼠海马组织 SOD、GSH 活性降低, MDA 含量升高 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠海马组织 SOD、GSH 活性增强, MDA 含量降低(图 6, $P < 0.05$)。

2.7 MCC950 对 POCD 大鼠海马组织 ROS、 Fe^{2+} 水平的影响

与 Control 组相比, MCC950 组大鼠海马组织 ROS、 Fe^{2+} 水平无显著性差异 ($P > 0.05$), Sev 组和 Sev + MCC950 组大鼠海马组织 ROS、 Fe^{2+} 水平升高 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠海马组织 ROS、 Fe^{2+} 水平降低(图 7, $P < 0.05$)。



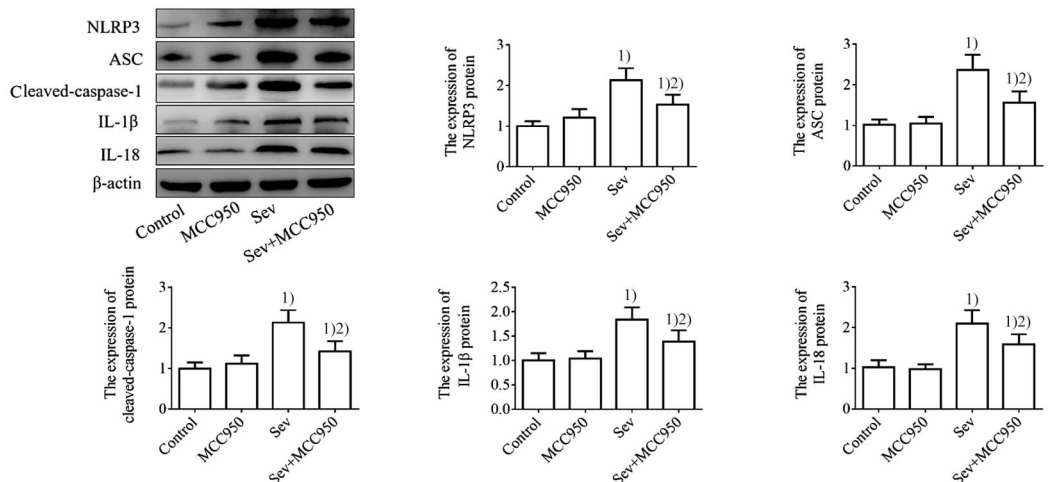
A - Morris 水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆功能; B - 海马组织 CA1 区域病理学染色 (HE, 200 ×); 与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Sev 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

A - Morris water maze experiment was used to detect the learning and memory function of rats; B - pathological staining of hippocampal CA1 region (HE, 200 ×);

¹⁾ $P < 0.05$, vs Control; ²⁾ $P < 0.05$, vs Sev.

图 4 MCC950 对术后认知功能障碍 (POCD) 大鼠神经功能的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effects of MCC950 on neural function in POCD rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$



与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Sev 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, vs Control; ²⁾ $P < 0.05$, vs Sev.

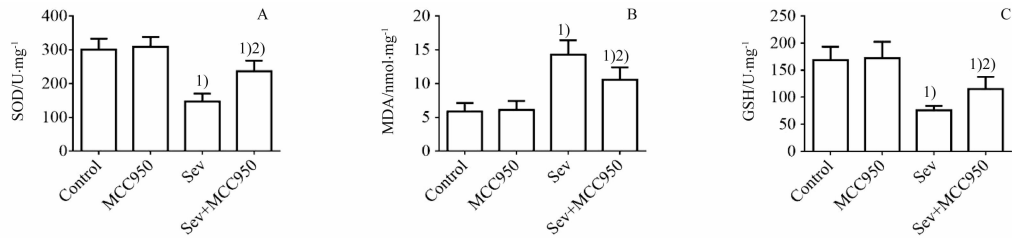
图 5 MCC950 对 POCD 大鼠海马组织 NLRP3 炎症小体的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Effects of MCC950 on NLRP3 inflammasome in hippocampal tissue of POCD rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.8 MCC950 对 POCD 大鼠海马神经元细胞铁死亡的影响

透射电镜显示, Control 组和 MCC950 组大鼠神经细胞状态良好, 线粒体形态结构正常, 胞质分布均匀, 且染色质形态正常。与 Control 组相比, Sev 组大鼠神经细胞染色质固缩, 边缘化, 且伴有线粒体外膜破裂 (细胞铁死亡相对特异性形态变化)。与 Sev 组

相比, Sev + MCC950 组大鼠神经细胞损伤明显减轻, 但是部分细胞仍然有染色质凝集, 边缘化, 无线粒体外膜破裂, 可见线粒体膜密度加深 (图 8A)。与 Control 组相比, MCC950 组大鼠海马组织 ACSL4、SLC7A11、GPX4 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$), Sev 组和 Sev + MCC950 组大鼠海马组织 ACSL4 蛋白表达显著升高, SLC7A11、GPX4 蛋白

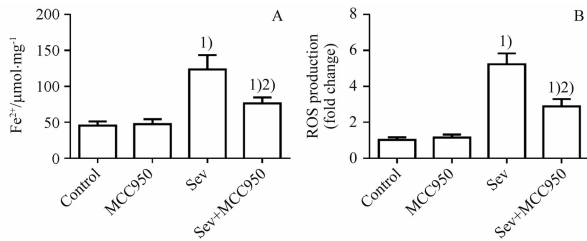


A - 各组大鼠海马组织 SOD 活性; B - 各组大鼠海马组织 MDA 含量; C - 各组大鼠海马组织 GSH 活性; 与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Sev 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

A - SOD activity in hippocampal tissue of rats in each group; B - MDA content in hippocampus of rats in each group; C - GSH activity in hippocampal tissue of rats in each group; ¹⁾ $P < 0.05$, vs Control; ²⁾ $P < 0.05$, vs Sev.

图 6 MCC950 对 POCD 大鼠氧化应激水平的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 The effect of MCC950 on oxidative stress levels in POCD rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$



A - 各组大鼠海马组织 Fe^{2+} 水平; B - 各组大鼠海马组织 ROS 水平; 与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Sev 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

A - Fe^{2+} level in hippocampal tissue of rats in each group; B - ROS levels in hippocampal tissue of rats in each group; ¹⁾ $P < 0.05$, vs Control; ²⁾ $P < 0.05$, vs Sev.

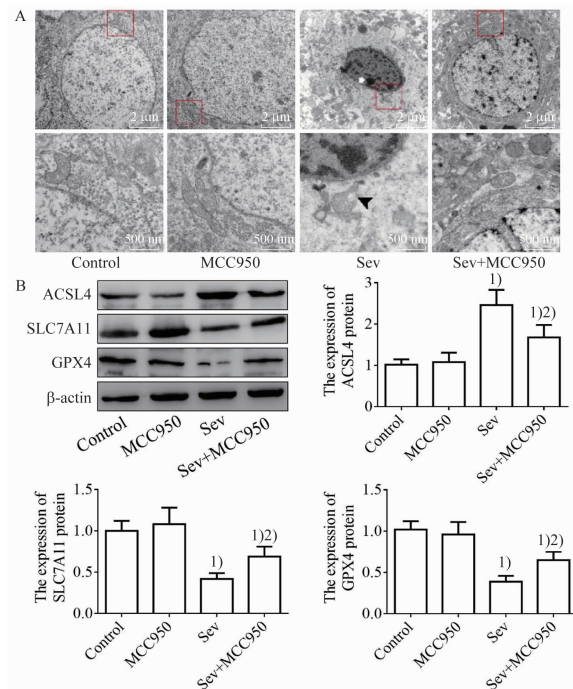
图 7 MCC950 对 POCD 大鼠海马组织 ROS、 Fe^{2+} 水平的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effects of MCC950 on ROS and Fe^{2+} levels in hippocampal tissue of POCD rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

表达显著降低 ($P < 0.05$)。与 Sev 组相比, Sev + MCC950 组大鼠海马组织 ACSL4 蛋白表达均显著降低, SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著升高 (图 8B, $P < 0.05$)。

3 讨论

Sev 是一种新型的卤代羟基醚类吸入性全麻药物, 具有诱导迅速、麻醉深度易调节、苏醒快以及对呼吸循环系统抑制程度较轻等优点, 是全麻诱导的首选药物^[18]。研究表明, 吸入性麻醉剂能够通过多种机制诱导神经毒性以及老年患者认知功能损伤^[19], 但是其具体作用机制尚不完全清楚。麻醉与手术作为一种外源性刺激, 被认为是引发老年人群认知功能障碍的危险因素^[20]。然而, 研究显示 Sev 诱导的神经毒性与暴露浓度及时间相关, 当低于临床麻醉浓度或短时间暴露 (< 3 h) 无神经毒性作用^[21]。此外, 研究证实, 亚麻醉浓度 Sev 具有一定的器官保护作用, 可通过激活钾离子通道以及阻断神经毒性, 减轻脑组织损伤, 发挥神经功能保护



A - 电镜观察神经细胞病理变化, 白色箭头 - 染色质凝集并边缘化, 黑色箭头 - 异常的线粒体, 红色方框 - 神经细胞胞质放大部位; B - Western blot 检测海马组织 ACSL4、SLC7A11、GPX4 蛋白表达; 与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 Sev 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

A - observation of pathological changes in nerve cells by electron microscopy, the white arrow represents chromatin condensation and marginalization, the black arrow represents abnormal mitochondria, the red box represents the enlarged part of the cytoplasm of nerve cells; B - Western blot detection of ACSL4, SLC7A11, and GPX4 protein expression in hippocampal tissue; ¹⁾ $P < 0.05$, vs Control; ²⁾ $P < 0.05$, vs Sev.

图 8 MCC950 对 POCD 大鼠海马神经元细胞铁死亡的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 The effects of MCC950 on ferroptosis in hippocampal neurons of POCD rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

作用^[22]。本研究参照文献^[16, 23]报道体积分数 4% 的 Sev 持续性吸入麻醉 6 h 后能够诱导大鼠认知功能障碍, 损伤海马神经功能, 导致大鼠 POCD。为此本研究拟通过吸入体积分数 4% 的 Sev 持续时

间6 h和腹腔探查术构建POCD大鼠模型。Sev大鼠出现明显的认知功能障碍及神经元损伤,表明POCD大鼠模型构建成功。

海马区是大脑负责记忆储存和定向转换等功能的重要区域,在炎症、氧化应激等病理因素刺激下会导致神经元细胞出现明显损伤,主要表现为学习、记忆及空间定向能力等认知功能障碍相关症状^[24]。NLRP3炎症小体是由NLRP3、ASC、caspase-1组成,广泛表达于多种细胞中,其中神经系统内小胶质细胞是功能性NLRP3炎症小体产生的主要场所^[25]。当细胞内ROS或是ATP累积到一定程度会刺激NLRP3炎症小体形成,促进caspase-1活化,进而刺激炎症细胞因子IL-1 β 、IL-18释放,诱导炎症级联反应^[26]。既往研究发现,NLRP3炎症小体介导的炎症反应参与了POCD的发生发展,Sev能够通过ROS-NLRP3炎症小体途径介导的小胶质细胞焦亡诱导老年小鼠POCD,抑制NLRP3炎症小体能够明显减轻Sev诱导的POCD^[27]。本研究发现,Sev能够促进NLRP3炎症小体活化。铁死亡是一种新型细胞死亡方式,其核心是脂质过氧化反应失衡,参与了氧化应激、炎症反应等多种病理机制^[28]。研究证实,铁死亡的发生参与了POCD的发生发展,主要涉及氧化还原、铁离子稳态及脂质过氧化等^[29]。本研究显示,Sev能够抑制氧化应激指标及Fe²⁺水平。ACSL4、SLC7A11、GPX4蛋白是铁死亡发生的关键调控因子。ACSL4是铁死亡启动的驱动因素,能够促进细胞脂质过氧化产物增多和ROS的堆积,抑制GPX4表达,诱导细胞脂质过氧化反应加重,导致细胞铁死亡发生^[30]。SLC7A11介导的胱氨酸/谷氨酸转运系统是合成GSH所需胱氨酸的主要途径,抑制SLC7A11后会降低GSH生物合成,导致GPX4抗氧化能力减低,诱导MDA产生增多,从而导致细胞铁死亡发生^[31]。GPX4是细胞中催化还原脂质过氧化产物关键性调控酶,能够降解脂质过氧化产物诱发的细胞毒性^[32]。本研究发现,Sev能够抑制细胞铁死亡相关蛋白表达。此外,NLRP3炎症小体活化和铁死亡的发生可能是POCD发生的重要病理机制。但是,有关NLRP3炎症小体活化与铁死亡的调控关系在POCD中的作用尚不清楚。Li等^[33]研究证实,在LPS诱导的急性肾损伤小鼠模型中NLRP3炎症小体被显著活化,铁死亡水平明显升高,而抑制NLRP3表达能够降低肾组织炎症和铁死亡改善LPS诱导的小鼠急性肾损伤。此外,Wang等^[34]研究也证实,抑制NLRP3炎症小体能够通过调控Keap1-Nrf2

信号通路减轻脑缺血再灌注损伤诱导的神经细胞铁死亡。以上研究表明,NLRP3炎症小体可能是铁死亡发生的关键调控因子。为进一步明确NLRP3炎症小体与铁死亡在POCD中的调控机制。为此,本研究通过对POCD的大鼠腹腔注射MCC950,发现抑制NLRP3小体活化能够降低海马神经元铁死亡,减轻Sev诱导的老年大鼠POCD。

综上所述,本研究结果显示,NLRP3炎症小体活化介导的神经元细胞铁死亡机制参与了POCD的发生发展。本研究结果进一步阐明了POCD的致病机制,为POCD治疗研究的干预靶点提供了新的可能。

REFERENCES

- [1] YANG X, HUANG X, LI M, *et al.* Identification of individuals at risk for postoperative cognitive dysfunction (POCD)[J]. *Theor Adv Neurol Disord*, 2022, 15:17562864221114356.
- [2] LIN X, CHEN Y, ZHANG P, *et al.* The potential mechanism of postoperative cognitive dysfunction in older people [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 130:110791.
- [3] EVERED L A, SILBERT B S. Postoperative cognitive dysfunction and noncardiac surgery [J]. *Anesth Analg*, 2018, 127(2): 496-505.
- [4] YANG Y, LIU Y, ZHU J, *et al.* Neuroinflammation-mediated mitochondrial dysregulation involved in postoperative cognitive dysfunction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 178:134-146.
- [5] NETTO M B, DE OLIVEIRA JUNIOR A N, GOLDIM M, *et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73:661-669.
- [6] LIANG J, HAN S, YE C, *et al.* Minocycline attenuates sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction in aged mice by suppressing hippocampal apoptosis and the notch signaling pathway-mediated neuroinflammation [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(3): 512.
- [7] HE X F, LI L L, XIAN W B, *et al.* Chronic colitis exacerbates NLRP3-dependent neuroinflammation and cognitive impairment in middle-aged brain [J]. *J Neuroinflamm*, 2021, 18(1):153.
- [8] ZHAO S, CHEN F, WANG D, *et al.* NLRP3 inflammasomes are involved in the progression of postoperative cognitive dysfunction: from mechanism to treatment [J]. *Neurosurg Rev*, 2021, 44(4):1815-1831.
- [9] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266-282.
- [10] MA Z, MA Y, CAO X, *et al.* Avenanthramide-C activates Nrf2/ARE pathway and inhibiting ferroptosis pathway to improve cognitive dysfunction in aging rats [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(2):393-403.
- [11] WU X, WANG B, ZHOU Y, *et al.* NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 reduces cerebral ischemia/reperfusion induced neuronal ferroptosis [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 795:137032.
- [12] SUN M, XIE Z, ZHANG J, *et al.* Mechanistic insight into sevoflurane-associated developmental neurotoxicity [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(6):927-943.
- [13] LIU Q, SUN Y M, HUANG H, *et al.* Sirtuin 3 protects against anesthesia/surgery-induced cognitive decline in aged mice by suppressing hippocampal neuroinflammation [J]. *J*

- Neuroinflamm*, 2021, 18(1):41.
- [14] WANG C M, CHEN W C, ZHANG Y, *et al.* Update on the mechanism and treatment of sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 702231.
- [15] HUANG Y B, CHEN S L, HUANG J. The role of TLR4/NF- κ B signaling pathway in elderly rats with postoperative cognitive impairment induced by sevoflurane [J]. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2021, 41(13):2782-2785.
- [16] WEI H T, REN F, LIU L L, *et al.* The role of hippocampal Toll like receptor 4 signaling pathway in cognitive dysfunction induced by sevoflurane anesthesia in aged rats [J]. *Chin J Anesthesiol*(中华麻醉学杂志), 2017, 37(12):1507-1511.
- [17] PAN H Y, ZHANG N, ZHOU Y, *et al.* The effect of MCC950 on NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2022, 41(12):754-758.
- [18] JABAUDON M, BOUCHER P, IMHOFF E, *et al.* Sevoflurane for sedation in acute respiratory distress syndrome. A randomized controlled pilot study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(6):792-800.
- [19] MILLER D, LEWIS S R, PRITCHARD M W, *et al.* Intravenous versus inhalational maintenance of anaesthesia for postoperative cognitive outcomes in elderly people undergoing non-cardiac surgery [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 8(8):CD012317.
- [20] TASBIHGOU S R, ABSALOM A R. Postoperative neurocognitive disorders [J]. *Korean J Anesthesiol*, 2021, 74(1):15-22.
- [21] WANG Y, YIN S, XUE H, *et al.* Mid-gestational sevoflurane exposure inhibits fetal neural stem cell proliferation and impairs postnatal learning and memory function in a dose-dependent manner [J]. *Dev Biol*, 2018, 435(2):185-197.
- [22] ATHIRAMAN U, LIU M, JAYARAMAN K, *et al.* Anesthetic and subanesthetic doses of isoflurane conditioning provides strong protection against delayed cerebral ischemia in a mouse model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Brain Res*, 2021, 1750:147169.
- [23] ZHANG D X, ZOU Y, XUE B X. Dexamethasone improves cognitive impairment in mice after sevoflurane anesthesia surgery by reducing S100A8 expression [J]. *Int J Anesth Resus* (国际麻醉学与复苏杂志), 2016, 37(12):1083-1088.
- [24] KHATRI N, THAKUR M, PAREEK V, *et al.* Oxidative stress: major threat in traumatic brain injury [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(9):689-695.
- [25] PRAKASH R, VYAWAHARE A, SAKLA R, *et al.* NLRP3 inflammasome-targeting nanomicelles for preventing ischemia-reperfusion-induced inflammatory injury [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(9):8680-8693.
- [26] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [27] ZHOU Y, ZHANG Y, WANG H, *et al.* Microglial pyroptosis in hippocampus mediates sevoflurane-induced cognitive impairment in aged mice via ROS-NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116:109725.
- [28] LIU J, KANG R, TANG D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22):7038-7050.
- [29] ZHAO L, GONG H, HUANG H, *et al.* Participation of mind Bomb-2 in sevoflurane anesthesia induces cognitive impairment in aged mice via modulating ferroptosis [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(13):2399-2408.
- [30] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1):91-98.
- [31] DONG H, XIA Y, JIN S, *et al.* Nrf2 attenuates ferroptosis-mediated IIR-ALI by modulating TERT and SLC7A11 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11):1027.
- [32] WANG J, ZHU Q, WANG Y, *et al.* Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187:171-184.
- [33] LI Z, WANG X, PENG Y, *et al.* Nlrp3 deficiency alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury via suppressing renal inflammation and ferroptosis in mice [J]. *Biology (Basel)*, 2023, 12(9):1188.
- [34] WANG Z, LI Y, YE Y, *et al.* NLRP3 inflammasome deficiency attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 193:37-46.

(收稿日期:2024-03-13)