

# SIRT1介导的铁死亡在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用及其机制

刘宝林, 曹维福\*

南阳市第一人民医院麻醉科, 河南南阳 473000

[中图分类号] R749.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0526.2024.1025

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘宝林, 曹维福. SIRT1介导的铁死亡在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(3): 332-340.

[收稿日期] 2024-04-19 [录用日期] 2024-07-13 [上线日期] 2024-10-25

**[摘要]** **目的** 探讨沉默信息调节因子1 (SIRT1)对七氟烷(SEV)麻醉老年小鼠术后认知功能障碍(POCD)的作用及其机制。**方法** (1)将雄性C57BL/6老年(15月龄)小鼠随机分为对照组( $n=8$ )与SEV组( $n=24$ ),采用Western blotting检测小鼠2% SEV暴露后1、3、7 d海马组织中SIRT1的表达水平。(2)将15月龄雄性C57BL/6小鼠随机分为AAV-GFP组、AAV-SIRT1组、SEV+AAV-GFP组与SEV+AAV-SIRT1组,每组20只。将AAV-SIRT1载体和对照载体AAV-GFP分别转染至相应组别小鼠脑内;5 d后,相应组别小鼠在2% SEV中暴露5 h。采用Morris水迷宫实验评估小鼠SEV暴露前后的空间记忆功能,TUNEL染色分析海马神经元凋亡情况,Western blotting检测海马组织中SIRT1、胱氨酸转运蛋白SLC7A11 (xCT)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的表达水平。(3)将小鼠海马神经元分为对照组、AAV-SIRT1组、Fer-1组、SEV组、SEV+AAV-SIRT1组与SEV+铁死亡抑制剂亚铁素-1(Fer-1)组。SEV组、SEV+AAV-SIRT1组和SEV+Fer-1组神经元暴露在5% SEV中4 h,SEV+AAV-SIRT1组和SEV+Fer-1组在SEV暴露前分别进行AAV-SIRT1转染或Fer-1处理。采用碘化丙啶(PI)染色评估细胞死亡情况,ELISA法检测丙二醛(MDA)水平和铁含量,荧光探针检测活性氧(ROS)水平。**结果** (1)Western blotting检测结果显示,与对照组比较,SEV组小鼠海马组织中SIRT1蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。(2)Morris水迷宫实验结果显示,与AAV-GFP组比较,SEV+AAV-GFP组和SEV+AAV-SIRT1组逃逸潜伏期明显延长( $P<0.05$ ),穿越原始平台的次数明显减少( $P<0.05$ );与SEV+AAV-GFP组比较,SEV+AAV-SIRT1组逃逸潜伏期明显缩短( $P<0.05$ ),在第7天穿越原始平台的次数明显增多( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。TUNEL染色、Western blotting和免疫组化检测结果显示,与AAV-GFP组比较,SEV+AAV-GFP组和SEV+AAV-SIRT1组小鼠海马神经元凋亡增多,Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平升高,Bcl-2、GPX4、xCT蛋白表达水平降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$ );与SEV+AAV-GFP组比较,SEV+AAV-SIRT1组小鼠海马神经元凋亡减少,Bax、cleaved-caspase-3蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ),Bcl-2、GPX4、xCT蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。(3)体外细胞实验中PI染色和ELISA法检测结果显示,与对照组比较,SEV组小鼠海马神经元PI阳性率、MDA水平和铁含量均明显增高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$ );与SEV组比较,SEV+AAV-SIRT1组和SEV+Fer-1组小鼠海马神经元PI染色阳性率、MDA水平、铁含量和ROS水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。**结论** SEV麻醉可降低老年小鼠海马组织和神经元中SIRT1的表达水平;SIRT1上调可减轻SEV暴露诱导的神经元死亡和铁死亡。

**[关键词]** 沉默信息调节因子1;铁死亡;老年小鼠;七氟烷;认知功能

## The role and mechanism of SIRT1-mediated ferroptosis in postoperative cognitive dysfunction of aged mice

Liu Bao-Lin, Cao Wei-Fu\*

Department of Anesthesiology, Nanyang First People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

\*Corresponding author, E-mail: zhubb20080715@126.com

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划(2020SJB4)

[作者简介] 刘宝林,主治医师,主要从事电针麻醉方面的研究

[通信作者] 曹维福, E-mail: zhubb20080715@126.com

This work was supported by the Henan Province Science and Technology Research Project (2020SJB4)

**[Abstract] Objective** To explore the role and mechanism of silent information regulator 1 (SIRT1) in postoperative cognitive dysfunction (POCD) of aged mice following sevoflurane (SEV) anesthesia. **Methods** (1) Fifteen-month-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group ( $n=8$ ) and SEV group ( $n=24$ ), and SIRT1 expression in hippocampus of mice was assessed using Western blotting on the 1st, 3rd and 7th day after 2% SEV exposure. (2) Fifteen-month-old male C57BL/6 mice were randomly divided into AAV-GFP, AAV-SIRT1, SEV+AAV-GFP and SEV+AAV-SIRT1 groups ( $n=20$ ). AAV-SIRT1 and control AAV-GFP vectors were transfected into the brain of mice respectively. Five days after the transfection, the corresponding groups of mice were exposed to 2% SEV for 5 h. Morris water maze test was used to evaluate the spatial memory of mice before and after SEV exposure, TUNEL staining was applied to assess hippocampal neurons apoptosis, and Western blotting was utilized to measure the expression levels of SIRT1, xCT and glutathione peroxidase 4 (GPX4). (3) Hippocampal neurons of mice were divided into control, AAV-SIRT1, Fer-1, SEV, SEV+AAV-SIRT1 and SEV+ferrostatin-1 (Fer-1) groups. Neurons in SEV, SEV+AAV-SIRT1 and SEV+Fer-1 groups were exposed to 5% SEV for 4 h. SEV+AAV-SIRT1 and SEV+Fer-1 groups were transfected with AAV-SIRT1 or treated with Fer-1 respectively prior to SEV exposure. Neuronal death was evaluated *via* propidium iodide (PI) staining. Malondialdehyde (MDA) level and iron content were determined using ELISA, reactive oxygen species (ROS) level was determined using fluorescence probes. **Results** (1) Western blotting revealed a significant reduction in SIRT1 protein expression levels in the hippocampus tissue of SEV group mice compared to control group ( $P<0.05$ ). (2) Morris water maze test results showed that, compared with AAV-GFP group, the escape latency of mice in SEV+AAV-GFP and SEV+AAV-SIRT1 groups significantly prolonged ( $P<0.05$ ), and the frequency of crossing the platform significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with SEV+AAV-GFP group, the escape latency of mice in SEV+AAV-SIRT1 group shortened ( $P<0.05$ ), and the frequency of crossing the platform on the 7th day increased ( $P<0.05$ ). TUNEL staining, Western blotting and immunohistochemistry indicated that the apoptosis of hippocampal neurons, Bax and cleaved-caspase-3 protein expression levels significantly increased in SEV+AAV-GFP and SEV+AAV-SIRT1 groups compared with those in AAV-GFP group, while the expression of Bcl-2, GPX4, and xCT protein expression levels significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). Compared with SEV+AAV-GFP group, SEV+AAV-SIRT1 group showed that apoptosis of hippocampal neurons, Bax and cleaved-caspase-3 protein expression levels significantly decreased ( $P<0.05$ ), while Bcl-2, GPX4, and xCT protein expression levels significantly increased ( $P<0.05$ ). (3) *In vitro*, PI staining and ELISA demonstrated significantly increased PI positive rate, MDA level and iron content in hippocampus neurons of SEV group compared to control group ( $P<0.01$ ). Compared with SEV group, the positive rate of PI staining, MDA level, iron content and ROS level in hippocampus neurons of SEV+AAV-SIRT1 and SEV+Fer-1 groups significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusions** SEV anesthesia leads to a decrease in SIRT1 expression in hippocampus and neurons of aged mice, and the upregulation of SIRT1 could alleviate SEV-induced neuronal death and ferroptosis.

**[Key words]** silent information regulator of transcription 1; ferroptosis; aged mice; sevoflurane; cognitive function

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是麻醉和手术后的一种中枢神经系统并发症, 多发生在老年人群<sup>[1]</sup>。POCD 的病因与患者本身、手术、麻醉等多种因素有关, 涉及的机制较为复杂。七氟烷 (sevoflurane, SEV) 是临床常用于多种手术的麻醉剂。研究显示, SEV 具有心脏保护作用<sup>[2]</sup>, 但 SEV 麻醉的成年大鼠呈现空间记忆能力受损<sup>[3]</sup>, SEV 麻醉引起认知障碍的潜在机制包括内质网压力、线粒体刺激、炎症和神经元凋亡等<sup>[4-5]</sup>。这些结果提示 SEV 可加重认知障碍, 但 SEV 诱导 POCD 的机制仍未明确。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator of transcription 1, SIRT1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶, 参与多种生物学过程, 包括衰老、神经发育、癌症和代谢性疾病, 并在认知功能中发挥重要作用<sup>[6-9]</sup>。SIRT1 敲除的小鼠呈现出记忆和突触可塑性受损<sup>[8]</sup>。SIRT1 过表达或激活可改善阿尔茨海默病模型小鼠的学习记忆能力及认知功能<sup>[10]</sup>。近期研究显示, 激

活 SIRT1 可缓解蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的铁死亡<sup>[11]</sup>。但 SIRT1 是否通过调控铁死亡参与 SEV 诱导的认知功能损害仍不清楚。本研究探讨 SIRT1 在 SEV 麻醉介导的老年小鼠 POCD 中的作用及其潜在机制, 以期为相关的药物开发和治疗研究提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组和药物、siRNA 的使用** 15 月龄雄性 C57BL/6 小鼠 (视为老年动物<sup>[12]</sup>) 112 只, 体重 24~30 g, 购自北京华卓康生物科技股份有限公司。所有小鼠均置于室温 22~24 ℃、湿度 50%~60%、12 h/12 h 昼夜循环的环境中, 可自由获取食物和水。本研究经南阳市第一人民医院动物伦理委员会批准 (20220508), 动物饲养和实验操作符合国家和单位的相关规定。(1) 为了观察 SEV 麻醉对 SIRT1 表达的影响, 将 32 只小鼠随机分为对照组 ( $n=8$ ) 与 SEV 组 ( $n=24$ )。SEV 组小鼠置于麻醉室中, 在 2% SEV (CAS

号: 28523-86-6, 美国 Selleck Chemicals 公司)中暴露 5 h; 对照组小鼠在没有 SEV 暴露的情况下进行相同程序。分别于 SEV 暴露后 1、3、7 d 各处死 SEV 组小鼠 8 只, 收集海马组织, 采用 Western blotting 检测海马组织中 SIRT1 的表达水平。(2)为了观察 SIRT1 上调对 SEV 诱导的老年小鼠 POCD 的影响, 将 80 只小鼠随机分为 AAV-GFP 组、AAV-SIRT1 组、SEV+AAV-GFP 组与 SEV+AAV-SIRT1 组, 每组 20 只。通过 Entanster 体内转染试剂(25  $\mu$ l/只, 南京金斯瑞生物科技有限公司)对小鼠大脑进行体内转染, 将 AAV2/9-SIRT1-3\*flag-GFP(AAV-SIRT1)载体和对照载体 AAV2/9-GFP(AAV-GFP)[汉恒生物科技(上海)有限公司]以 0.1  $\mu$ l/min 的速度注入小鼠双侧海马(每侧 1  $\mu$ l; 位置: 前侧 3.5 mm, 中侧  $\pm$ 2.0 mm, 背腹 3.5 mm)。5 d 后, 相应(SEV)组别的小鼠在 2% SEV 中暴露 5 h。

## 1.2 方法

**1.2.1 Morris 水迷宫实验** 在 SEV 暴露前 1~5 d 和暴露后进行水迷宫实验, 评估各组小鼠的空间记忆功能。水迷宫实验在一个圆形黑色水池(直径 120 cm, 深度 21 cm)内完成, 由不透明的水填充, 水温(24 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C。将水池分成 4 个象限, 一个隐形的平台(圆形, 直径 12 cm, 低于水面 2 cm)隐藏在水池的指定目标象限内。小鼠在麻醉前连续训练 5 d, 每只小鼠每天测试 4 次, 每次将小鼠以不同的起始位置面对池壁, 测试持续到小鼠发现平台为止, 未能在 90 s 内找到逃生平台的小鼠被实验者轻轻放在平台上 15 s。测试试验在 SEV 暴露后 1、3 和 7 d 各进行一次, 记录小鼠找到隐藏平台的潜伏时间。第 7 天, 将平台从水池中移出, 在最后一次测试的入口处将动物从象限中放出, 让其游泳 60 s, 同时记录其穿越原始平台的次数。

**1.2.2 小鼠海马组织 HE 染色和免疫组化染色** 在 Morris 水迷宫实验后(SEV 暴露后第 7 天)取小鼠脑组织。用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠, 切开右心房并用肝素化的 0.9% NaCl 注射液和 4% 甲醛溶液进行经心灌注; 提取脑组织并在 4  $^{\circ}$ C 下用 0.9% NaCl 注射液冲洗; 将大脑剥离并在 4% 甲醛溶液中固定过夜, 在含 15% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 4  $^{\circ}$ C)中固定 24 h, 然后在含 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 4  $^{\circ}$ C)中固定 24~48 h。将样本嵌入石蜡中。在冠状面切割海马的石蜡包埋脑切片(厚度 5  $\mu$ m), 用苏木精和伊红染色。光学显微镜下观察海马组织的病理变化。每组分析 6 只小鼠的大脑切片。

小鼠大脑石蜡包埋后切片(厚度 5  $\mu$ m); 对切片进行脱蜡处理后, 抗原修复 30 min, 3% 牛血清白蛋白(BSA, 美国 Sigma 公司)封闭 30 min, 加入谷胱甘

肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜进行免疫组化染色, 然后将切片与生物素化的第二抗体在室温下孵育 2 h, 再用第三抗体孵育 30 min, 最后在 DAB 中显影 5 min, 迅速脱水并密封。光学显微镜下观察, 并采用 ImageJ 软件分析图像的荧光强度。每组分析 6 只小鼠的大脑切片, 结果表示为 GPX4 免疫染色占组织面积的百分比。

**1.2.3 TUNEL 染色** 采用原位细胞死亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司)进行终端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口标记(TUNEL)反应, 然后用 DAPI 溶液(北京索莱宝科技有限公司)对切片进行细胞核染色, 在共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)下观察并拍照。每组分析 6 只小鼠的大脑切片, 结果表示为相对于对照组的 TUNEL 阳性细胞表达水平。

**1.2.4 Western blotting 检测 SIRT1、Bcl-2、活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、胱氨酸转运蛋白 SLC7A11 (又称为 xCT)、GPX4 的蛋白表达水平** 使用 RIPA 缓冲液和 1 $\times$  蛋白酶抑制剂混合物(上海碧云天生物技术股份有限公司)对各组海马组织进行匀浆, 12 000 $\times$ g 离心 20 min 后收集上清液, 采用二辛可宁酸蛋白质测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 分离 30  $\mu$ g 蛋白的等分试样并转移到硝酸纤维素膜上, 然后用 PBS(pH 7.4)中的 5% 脱脂奶粉封闭。将膜与抗 SIRT1(1:1000)、Bcl-2 (1:500)、cleaved-caspase-3(1:1000)、Bax(1:500)、xCT (1:1000)、GPX4(1:500)和 GAPDH(1:2000)抗体(购自英国 Abcam 公司)在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜。在室温下将印迹在辣根过氧化物酶偶联的兔 IgG(1:5000, 美国 Proteintech 公司)二抗中孵育 2 h。用 TBST 缓冲液反复洗涤后, 应用 ECL 试剂盒[安诺伦(北京)生物科技有限公司]的化学发光试剂对膜进行显影并通过 VersaDoc 4000MP 系统(美国 Bio-Rad 公司)捕获图像, 条带密度用自带的 Quantity One 软件进行分析, 结果表示为相对于对照组的表达水平。

**1.2.5 小鼠海马神经元的培养及处理** 取出生后 24 h 的 C57BL/6 小鼠大脑, 在冷冻的解剖缓冲液中解剖海马。使用木瓜蛋白酶对海马神经元进行消化并适度滴定。使用无血清的 B27-plus 神经基质培养基(美国赛默飞世尔科技公司)培养分离的神经元, 然后将其接种于 12 孔板中的聚二甲基赖氨酸涂层切片上(1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞/cm<sup>2</sup>), 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中培养, 每 3 d 进行半数换液。培养 21 d 后, 细胞变老<sup>[13]</sup>; 将神经元暴露在 2.5% 或 5.0% 的 SEV 中 4 h, 暴露后 24 h 收集细胞进行相关检测。用铁死亡抑制剂亚铁素-1(ferrostatin-1, Fer-1; CAS 号 347174-

05-4, 美国 Selleck Chemicals 公司)处理神经元,浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ , 同时将其暴露于 5.0% SEV 中 4 h。为了考察 SIRT1 在 SEV 诱导细胞铁死亡中的作用,将小鼠海马神经元随机分为 6 组:对照组、AAV-SIRT1 组、Fer-1 组、SEV 组、SEV+AAV-SIRT1 组与 SEV+Fer-1 组。对照组神经元采用空白溶液处理; AAV-SIRT1 组神经元通过 Lipofectamine 3000 转染 AAV-SIRT1 48 h; Fer-1 组采用  $10 \mu\text{mol/L}$  Fer-1 处理神经元; SEV 组、SEV+AAV-SIRT1 组和 SEV+Fer-1 组将神经元暴露于 5.0% SEV 中 4 h, SEV+AAV-SIRT1 组和 SEV+Fer-1 组在暴露前分别进行 AAV-SIRT1 转染或 Fer-1 处理。

**1.2.6 碘化丙啶(PI)染色评估细胞死亡情况** 在 96 孔板中加入含  $2 \times 10^4$  个细胞的悬浮液。细胞变老后,按照 1.2.5 的小鼠海马神经元分组处理细胞,并加入 PI 染料(P4170, 美国 Sigma-Aldrich 公司)处理 0.5 h, 光学显微镜下观察 PI 染色情况, 结果表示为 PI 阳性细胞率。

**1.2.7 活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定** 按照 1.2.5 的小鼠海马神经元分组处理细胞后,弃去培养基。在每个孔中加入稀释的 BODIPY 581/591C11 试剂(美国 Invitrogen 公司)处理 0.5 h, 在荧光显微镜下拍照,用 ImageJ 软件计算绿色荧光强度(氧化态, 510 nm)与红色荧光强度(非氧化态, 590 nm)的比值。

**1.2.8 丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平和铁含量测定** 使用 MDA 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定神经元匀浆中的 MDA 水平, 结果表示为 1 mg 蛋白中 MDA 水平(mmol)。使用铁比色检测试剂盒(英国 Abcam 公司)检测细胞中的铁含量, 结果表示为相对于对照组的铁含量。

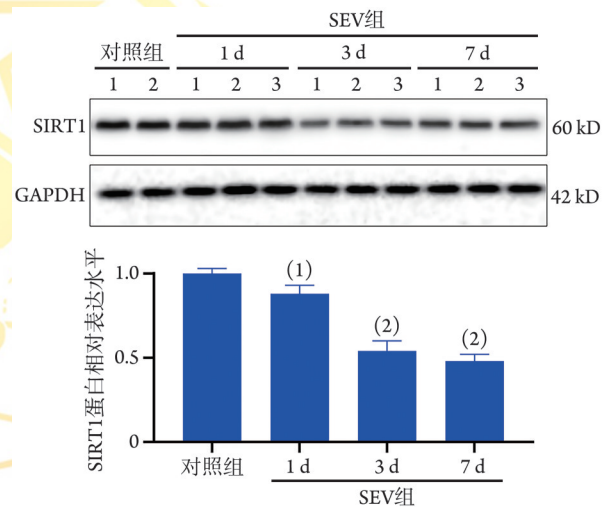
**1.2.9 实时 PCR 检测 SIRT1 mRNA 的表达水平** 分别用 TRIpure 总 RNA 提取试剂和 Super M-MLV 反转录酶(北京百泰克生物技术有限公司)从细胞和海马 CA1 区中提取总 RNA 并反转录成 cDNA。准备好 cDNA 模板、特异性基因引物和稀释后的  $2 \times$  Plus SYBR 实时 PCR 预混液(北京百泰克生物技术有限公司)的混合物, 进行实时定量 PCR。引物序列: SIRT1 正向 5'-GGTTACGCTGAGCCCCGACA-3', 反向 5'-ATCTTGTGAGCCATTCCCA-3'; GAPDH 正向 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3', 反向 5'-GGGTCGTTGATGGCAACA-3'。以 GAPDH 为内参照, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 SIRT1 mRNA 表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量数据均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较使用 Tukey 多重比较检验, 进一步两两比较采

用不成对  $t$  检验或单向 ANOVA 分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SEV 对小鼠海马中 SIRT1 表达的影响** Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, SEV 处理后 1、3、7 d, 小鼠海马中 SIRT1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 1); 与 AAV-GFP 组比较, AAV-SIRT1 组小鼠海马中 SIRT1 蛋白表达水平明显增高 ( $P < 0.01$ ), SEV+AAV-GFP 组 SIRT1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 AAV-SIRT1 组比较, SEV+AAV-SIRT1 组小鼠海马中 SIRT1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

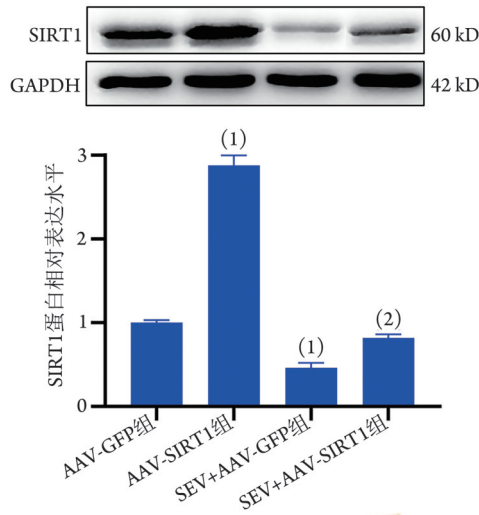


SIRT1, 沉默信息调节因子 1; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$

图 1 七氟烷(SEV)暴露后小鼠海马中 SIRT1 蛋白表达水平(Western blotting,  $n=8$ )

Fig. 1 Expression of SIRT1 after exposure to sevoflurane (SEV) in hippocampus of mouse (Western blotting,  $n=8$ )

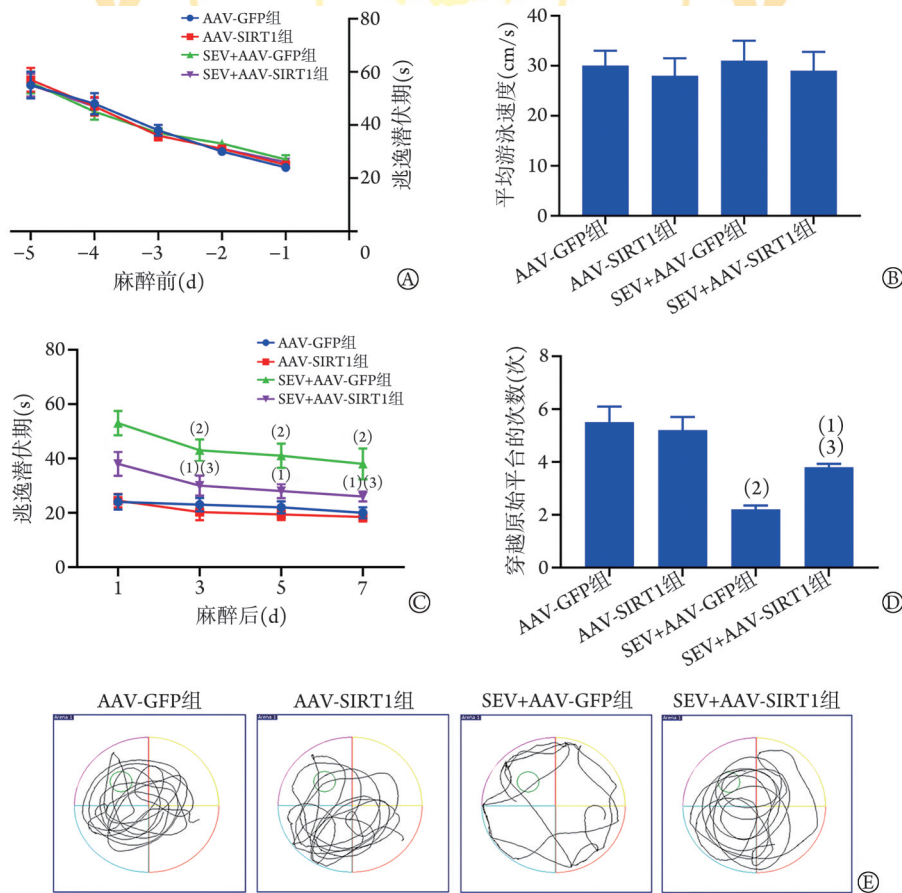
**2.2 SIRT1 对 SEV 诱导的老年小鼠 POCD 的影响** Morris 水迷宫实验结果显示, 麻醉前各组小鼠的逃逸潜伏期比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3A)。麻醉后 7 d, 各组小鼠的平均游泳速度比较差异无统计学意义 ( $P=0.725$ , 图 3B)。麻醉后, 与 AAV-GFP 组比较, AAV-SIRT1 组、SEV+AAV-GFP 组和 SEV+AAV-SIRT1 组的逃逸潜伏期明显延长 ( $P < 0.05$ ); 与 SEV+AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-SIRT1 组的逃逸潜伏差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3C)。麻醉后第 7 天, 与 AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-GFP 组和 SEV+AAV-SIRT1 组小鼠穿越原始平台的次数明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 SEV+AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-SIRT1 组小鼠穿越原始平台的次数明显增多 ( $P < 0.05$ , 图 3D、E)。



SEV. 七氟烷; SIRT1. 沉默信息调节因子1; 与 AAV-GFP 组比较, (1) $P<0.01$ ; 与 AAV-SIRT1 组比较, (2) $P<0.01$

图2 小鼠脑内 AAV-SIRT1 转染对 SIRT1 表达的影响 (Western blotting,  $n=6$ )

Fig. 2 Effects of transfection of AAV-SIRT1 on expression of SIRT1 in the brain of mouse (Western blotting,  $n=6$ )



SIRT1. 沉默信息调节因子1; A. 训练阶段小鼠的逃逸潜伏期(找到隐藏平台的时间); B. 麻醉后7 d的平均游泳速度; C. 麻醉后1、3和7 d的逃逸潜伏期; D. 麻醉后7 d小鼠穿越原始平台的次数; E. 麻醉后7 d移除隐藏平台的小鼠代表性游泳轨迹; 与 AAV-GFP 组比较, (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ ; 与 SEV+AAV-GFP 组比较, (3) $P<0.05$

图3 SIRT1 对七氟烷(SEV)诱导的老年小鼠术后认知功能障碍的影响(Morris 水迷宫实验,  $n=10$ )

Fig. 3 Effects of SIRT1 on postoperative cognitive dysfunction induced by sevoflurane (SEV) in aged mice (Morris water maze test,  $n=10$ )

2.3 SIRT1 对 SEV 诱导的海马组织病理改变的影响 HE 染色结果显示, AAV-GFP 组和 AAV-SIRT1 组小鼠海马锥体细胞呈圆形, 形态规则, 细胞核浅染, 细胞质染色均匀; SEV+AAV-GFP 组小鼠海马呈现明显的神经元排列紊乱, 具有嗜酸性变; SEV+AAV-SIRT1 组上述病理改变得到缓解(图 4A)。TUNEL 染色结果显示, 与 AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-GFP 组和 SEV+AAV-SIRT1 组小鼠海马组织中凋亡神经元明显增多( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与 SEV+AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-SIRT1 组小鼠海马组织中凋亡神经元明显减少( $P<0.05$ , 图 4B)。

Western blotting 检测结果显示, 与 AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-GFP 组和 SEV+AAV-SIRT1 组小鼠海马组织中 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 而 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ ); 与 SEV+AAV-GFP 组比较, SEV+AAV-SIRT1 组小鼠海马组织中 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ), 而 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ , 图 4C)。

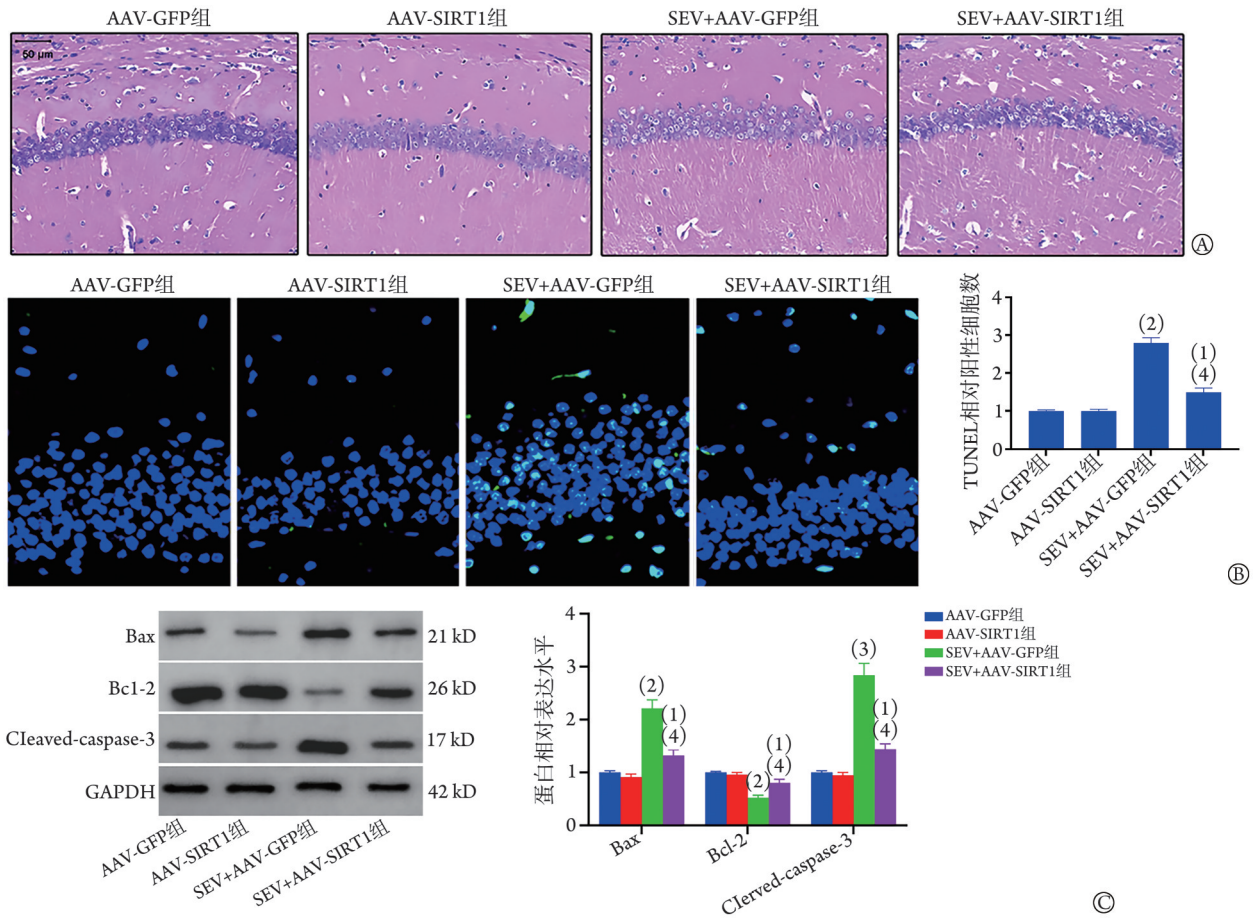


图4 SIRT1对七氟烷(SEV)诱导的小鼠海马组织病理改变的影响(n=6)

Fig.4 Effects of SIRT1 on pathology of mouse hippocampus tissue induced by sevoflurane (SEV) (n=6)

**2.4 SIRT1对SEV处理小鼠海马细胞铁死亡的影响** 免疫组化染色和Western blotting检测结果显示,与AAV-GFP组比较,SEV+AAV-GFP组和SEV+AAV-SIRT1组小鼠海马组织中GPX4和xCT蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与SEV+AAV-GFP组比较,SEV+AAV-SIRT1组海马组织中GPX4和xCT蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ,图5)。

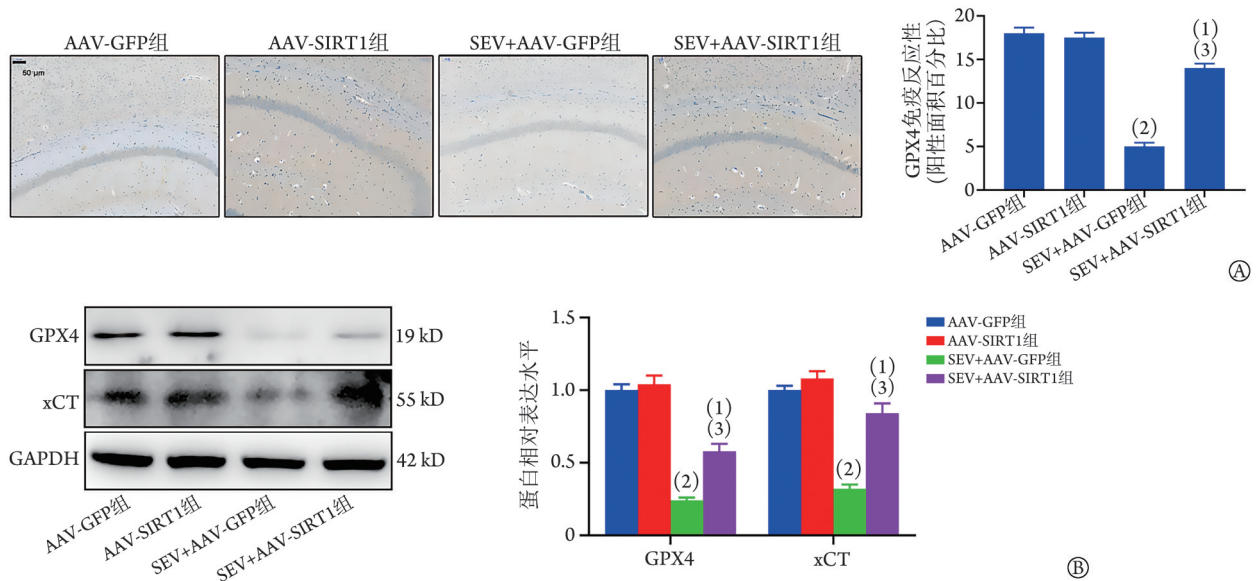
**2.5 SEV对小鼠海马神经元铁死亡的影响** PI染色结果显示,与对照组比较,2.5%SEV组和5.0%SEV组小鼠海马神经元PI阳性率明显增高( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ );与5.0%SEV组相比,5.0%SEV+Fer-1组小鼠海马神经元PI阳性率明显降低( $P<0.05$ ,图6A)。ELISA法检测结果显示,与对照组比较,2.5%SEV组和5.0%SEV组小鼠海马神经元MDA水平和铁含量明显增高( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ );与5.0%SEV组比较,5.0%SEV+Fer-1组小鼠海马神经元MDA水平和铁含量明显降低( $P<0.05$ ,图6B)。

**2.6 SIRT1对SEV诱导的小鼠海马神经元铁死亡的影响** 实时PCR检测结果显示,与对照组比较,

SEV组小鼠海马神经元中SIRT1 mRNA表达水平明显降低( $P<0.001$ ),AAV-SIRT1组小鼠海马神经元中SIRT1 mRNA表达水平明显增高( $P<0.001$ ,图7A)。与SEV组比较,SEV+AAV-SIRT1组和SEV+Fer-1组小鼠海马神经元中PI阳性率、MDA水平、铁含量和ROS水平均明显降低( $P<0.05$ ,图7B-D)。

### 3 讨论

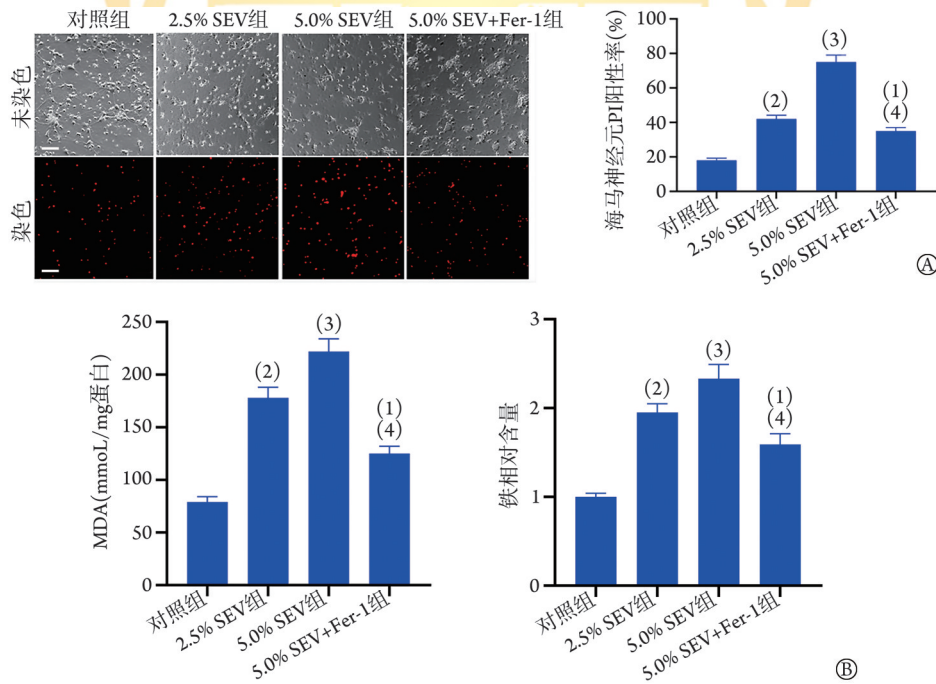
SEV诱导POCD的机制错综复杂,其基础是手术和麻醉引起的老年患者中枢神经系统变性。有研究显示,吸入2%的SEV 5 h可建立POCD动物模型,该SEV浓度接近临床应用剂量<sup>[14-15]</sup>。另有研究报道,接受SEV麻醉的部分老年患者可出现不同程度的认知功能障碍<sup>[16-17]</sup>,本研究在SEV麻醉的动物模型中也观察到类似现象,与其一致。本研究选择Morris水迷宫实验评估SIRT1对SEV麻醉后POCD的影响。Morris水迷宫实验常用于啮齿类动物,可检测小鼠的学习和记忆能力<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,麻醉前各组小鼠表现差异无统计学意义,但2%SEV暴露5 h



SEV. 七氟烷; SIRT1. 沉默信息调节因子1; GPX4. 谷胱甘肽过氧化物酶4; xCT. 胱氨酸转运蛋白SLC7A11; A. 小鼠海马CA1区GPX4的表达(免疫组化染色); B. GPX4和xCT蛋白表达水平(Western blotting); 与AAV-GFP组比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ ; 与SEV+AAV-GFP组比较, (3) $P < 0.05$

图5 SIRT1对小鼠海马组织铁死亡相关蛋白GPX4和xCT表达的影响( $n=6$ )

Fig.5 Effects of SIRT1 on expression of ferroptosis associated proteins GPX4 and XCT in mouse hippocampus tissue ( $n=6$ )



SIRT1. 沉默信息调节因子1; PI. 碘化丙啶; A. SEV暴露的小鼠原代神经元的PI染色; B. SEV处理的小鼠神经元中MDA水平和铁相对含量的ELISA检测结果; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.001$ ; 与5.0% SEV组比较, (4) $P < 0.05$

图6 七氟烷(SEV)对小鼠海马神经元铁死亡的影响( $n=3$ )

Fig.6 Effects of sevoflurane (SEV) on ferroptosis of neurons from mouse hippocampus ( $n=3$ )

后小鼠出现明显的学习和记忆障碍, 表现为逃逸潜伏期延长及原始平台穿越次数减少, 与既往研究结果一致<sup>[18]</sup>。此外, 本研究还观察到向小鼠海马内注射AAV-SIRT1可明显缓解SEV诱导的记忆缺陷。上述结果提示, SIRT1表达上调可明显减轻SEV诱导的老年大鼠认知障碍。

研究显示, 海马在空间记忆的形成中起重要作用, 但其结构和功能易受外部手术/麻醉刺激的负面影响<sup>[19-20]</sup>。SEV诱导的神经毒性可造成海马神经元发生多种形式的细胞死亡, 如凋亡、自噬和坏死性凋亡<sup>[21]</sup>。SEV诱导认知功能下降的机制与多种因素密切相关, 包括钙超载、炎症趋化因子(如肿瘤坏死因

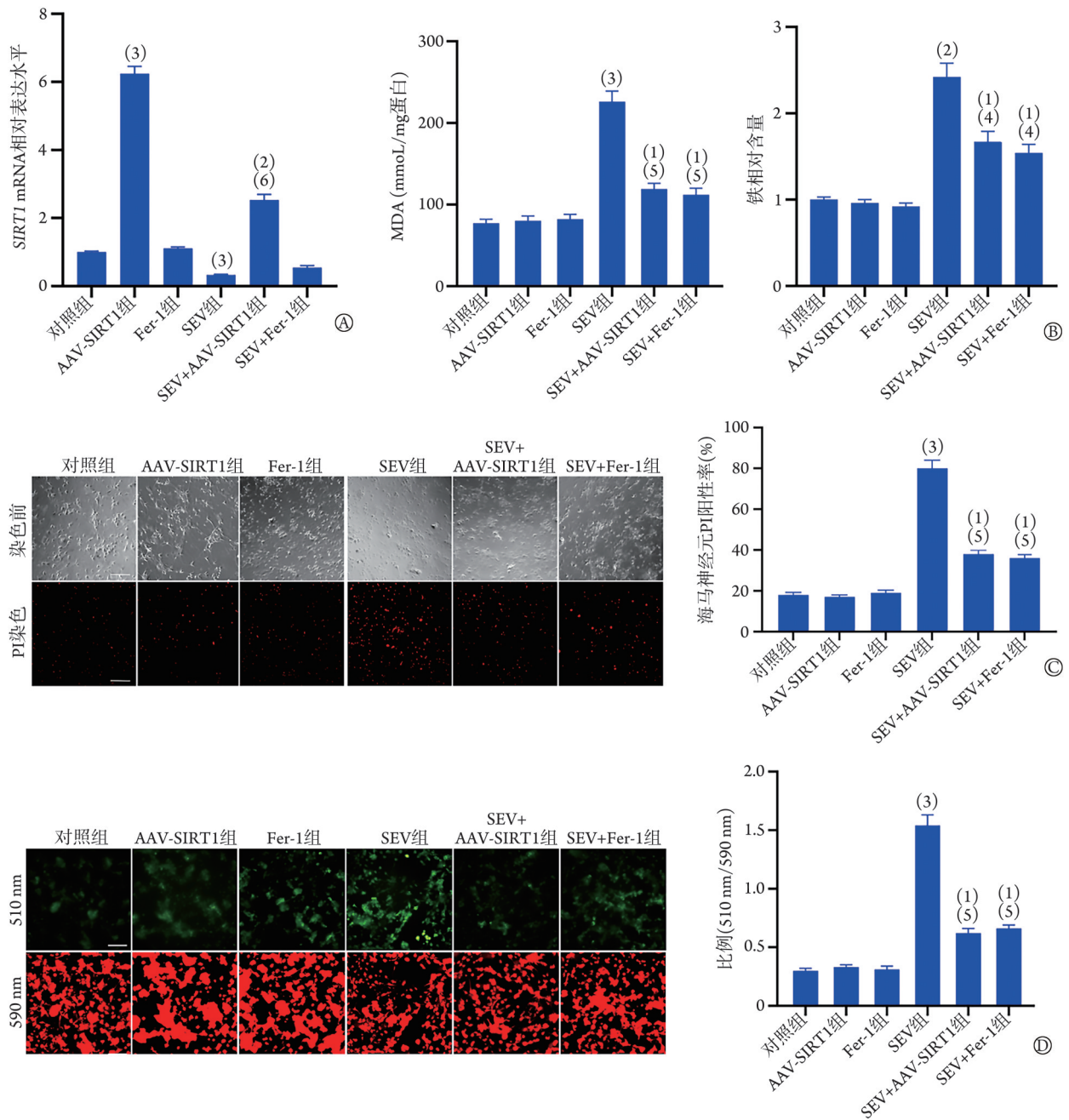


Fig.7 SIRT1 沉默信息调节因子1; ROS. 活性氧; Fer-1. 亚铁素-1; A. AAV-SIRT1 转染后小鼠神经元中 SIRT1 mRNA 表达的 PCR 检测; B. AAV-SIRT1 处理的小鼠神经元中的 MDA 水平和铁相对含量; C. SEV 暴露的小鼠原代神经元 PI 染色; D. AAV-SIRT1 处理的小鼠神经元中 ROS 的荧光探针分析结果; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.001$ ; 与 SEV 组比较, (4) $P < 0.05$ , (5) $P < 0.01$ , (6) $P < 0.001$

图7 SIRT1 对七氟烷(SEV)诱导的小鼠海马神经元铁死亡的影响 ( $n=3$ )

Fig.7 The effects of SIRT1 on ferroptosis induced by sevoflurane (SEV) a in mouse hippocampus ( $n=3$ )

子- $\alpha$ 、白细胞介素-6、Toll 样受体 4)、氧化应激等<sup>[22]</sup>; 值得注意的是, 上述指标与铁死亡的发生有关<sup>[23]</sup>。但这些指标是否参与 SEV 诱导的铁死亡尚不清楚。本研究观察了 SEV 暴露对小鼠海马神经元功能及其相关调控分子的影响, 发现 SEV 干预后小鼠海马组织和神经元中 SIRT1 的表达明显下调, 且 SEV 处理后细胞死亡明显增加, 这可能部分归因于铁死亡; 对铁死亡的相关指标进行检测发现, SEV 可促进神经元铁死亡, 而铁死亡抑制剂 Fer-1 可抑制神经

元铁死亡; SIRT1 表达上调的海马神经元在 SEV 作用下细胞死亡减少、铁死亡相关指标降低, 这与 Fer-1 对暴露于 SEV 神经元的保护作用一致。上述结果提示, SIRT1 表达上调可减轻 SEV 暴露诱导的神经元铁死亡。

SIRT1 参与了多种细胞及生理过程的调节, 包括神经发育、脑缺血、神经病理性疼痛、情绪障碍、衰老等<sup>[10]</sup>。SIRT1 还被证实海马体的神经元中高度表达, 而海马是学习和记忆的关键结构, 对于正

常的认知功能必不可少<sup>[13]</sup>。近期研究显示, SIRT1功能降低与认知功能减退和痴呆有关<sup>[11]</sup>。还有研究认为, SIRT1可影响小鼠海马的空间记忆和突触可塑性<sup>[24]</sup>。本研究结果显示, 通过向小鼠海马内注射AAV-SIRT1使海马组织过表达SIRT1, 可逆转SEV诱导的小鼠认知功能下降; SIRT1表达上调可减少铁死亡相关蛋白GPX4和xCT的表达。上述结果提示, 上调SIRT1可能直接或间接调节铁死亡相关通路, 推测SIRT1通过GPX4调节铁死亡, 并参与SEV麻醉诱导的认知功能障碍和神经元损伤的调节。

综上所述, 本研究结果显示, SEV麻醉可降低小鼠海马组织和神经元中SIRT1的表达水平, 而上调SIRT1的表达可减轻SEV暴露诱导的神经元死亡和铁死亡。上述结果有助于探究SEV引起认知功能障碍的机制, 并可为开发靶向SIRT1的药物以治疗POCD提供理论基础。

#### 【参考文献】

- [1] Borchers F, Spies CD, Feinkohl I, *et al.* Methodology of measuring postoperative cognitive dysfunction: a systematic review[J]. *Br J Anaesth*, 2021, 126(6): 1119-1127.
- [2] Wang C, Chen W, Zhang Y, *et al.* Update on the mechanism and treatment of sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 702231.
- [3] Wei W, Sun Z, He S, *et al.* Protective role of dexmedetomidine against sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction via the microRNA-129/TLR4 axis[J]. *J Clin Neurosci*, 2021, 92: 89-97.
- [4] 张邓新, 朱海萌, 梁俊杰, 等. 米诺环素对七氟烷麻醉致老龄小鼠认知障碍的改善作用及其机制[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2021, 30(8): 673-678.
- [5] 余畅, 朱登彦, 杨建军, 等. Cx43在七氟烷麻醉诱发老龄大鼠认知功能障碍中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2020, 40(8): 945-949.
- [6] 王歆, 刘维英, 武晨, 等. 1 $\alpha$ ,25-二羟基维生素D<sub>3</sub>对哮喘小鼠SIRT1、GATA-3表达及气道炎症水平的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(6): 686-693.
- [7] Shi J, Zou X, Jiang K, *et al.* SIRT1 mediates improvement of cardiac surgery-induced postoperative cognitive dysfunction via the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *World J Biol Psychiatry*, 2020, 21(10): 757-765.
- [8] Yan WJ, Wang DB, Ren DQ, *et al.* AMPK $\alpha$ 1 overexpression improves postoperative cognitive dysfunction in aged rats through AMPK-Sirt1 and autophagy signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7): 11633-11641.
- [9] 林正霄, 徐朝霞, 陈娟, 等. miR-34a/SIRT1在重症监护病房获得性衰弱中的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(7): 796-803.
- [10] Yan J, Luo A, Gao J, *et al.* The role of SIRT1 in neuroinflammation and cognitive dysfunction in aged rats after anesthesia and surgery[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3): 1555-1568.
- [11] Yuan B, Zhao XD, Shen JD, *et al.* Activation of SIRT1 alleviates ferroptosis in the early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9069825.
- [12] Liu P, Gao Q, Guan L, *et al.* Atorvastatin attenuates surgery-induced BBB disruption and cognitive impairment partly by suppressing NF- $\kappa$ B pathway and NLRP3 inflammasome activation in aged mice[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53(5): 528-537.
- [13] Qiu LL, Pan W, Luo D, *et al.* Dysregulation of BDNF/TrkB signaling mediated by NMDAR/Ca<sup>2+</sup>/calpain might contribute to postoperative cognitive dysfunction in aging mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 23.
- [14] Fang P, Chen C, Zheng F, *et al.* NLRP3 inflammasome inhibition by histone acetylation ameliorates sevoflurane-induced cognitive impairment in aged mice by activating the autophagy pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2021, 172: 79-88.
- [15] Mei X, Zheng HL, Li C, *et al.* The effects of propofol and sevoflurane on postoperative delirium in older patients: a randomized clinical trial study[J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 76(4): 1627-1636.
- [16] Zhang Y, Shan GJ, Zhang YX, *et al.* Propofol compared with sevoflurane general anaesthesia is associated with decreased delayed neurocognitive recovery in older adults[J]. *Br J Anaesth*, 2018, 121(3): 595-604.
- [17] Müller D, Lewis SR, Pritchard MW, *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): CD012317.
- [18] Jiang W, Liu F, Li H, *et al.* TREM2 ameliorates anesthesia and surgery-induced cognitive impairment by regulating mitophagy and NLRP3 inflammasome in aged C57/BL6 mice[J]. *Neurotoxicology*, 2022, 90: 216-227.
- [19] Chen Y, Zhang S, Fang M, *et al.* Egr2 contributes to age-dependent vulnerability to sevoflurane-induced cognitive deficits in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(11): 2828-2840.
- [20] 李燕君, 俄洛吉, 李玉琴. 泽泻醇提取物对亚临床性甲状腺功能减退症母鼠甲状腺功能及仔鼠神经功能的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(2): 183-189.
- [21] Zhang Q, Li Y, Yu J, *et al.* TLR3 deletion inhibits programmed necrosis of brain cells in neonatal mice with sevoflurane-induced cognitive dysfunction[J]. *Aging*, 2022, 14(11): 4714-4727.
- [22] Li N, Ma Y, Li C, *et al.* Dexmedetomidine alleviates sevoflurane-induced neuroinflammation and neurocognitive disorders by suppressing the P2X4R/NLRP3 pathway in aged mice[J]. *Int J Neurosci*, 2024, 134(5): 511-521.
- [23] Zhu Y, Zhang M, Wang J, *et al.* Knockdown of UAF1 alleviates sevoflurane-induced cognitive impairment and neurotoxicity in rats by inhibiting pro-inflammatory signaling and oxidative stress[J]. *J Toxicol Sci*, 2022, 47(9): 349-357.
- [24] Liu S, Fang Y, Yu J, *et al.* Hawthorn polyphenols reduce high glucose-induced inflammation and apoptosis in ARPE-19 cells by regulating miR-34a/SIRT1 to reduce acetylation[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(2): e13623.

(责任编辑: 蒋铭敏)