

# 右美托咪定对铁超载诱导的小鼠海马神经元损伤的保护作用

丁 慧<sup>1</sup>,王京燕<sup>1</sup>,黄 艳<sup>2</sup>,钟薇薇<sup>3</sup>,鲁显福<sup>3</sup>,李元海<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨右美托咪定(Dex)对柠檬酸铁铵(FAC)诱导的小鼠海马神经元细胞(HT22)铁超载毒性的保护作用及相关机制。方法 选取状态良好的HT22细胞随机分为4组:对照组(Ctrl组)、FAC处理组(FAC组)、Dex处理组(Dex组)、铁死亡抑制剂Fer-1处理组(Fer-1组)。采用FAC诱导细胞制备铁超载模型。随后采用CCK-8法检测HT22细胞的增殖存活率;Western blot检测铁死亡标志性蛋白前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、长链酯酰辅酶A合成酶4(ACSL4)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、转铁蛋白受体1(TFR1)及膜铁输出蛋白(Fpn)的蛋白表达;qPCR检测HT22细胞内PTGS2和ACSL4的基因表达水平;DHE荧光探针检测HT22细胞内的活性氧簇(ROS)水平;MDA检测试剂盒检测HT22细胞内脂质氧化水平;Mito-FerroOrange—亚铁离子探针检测HT22细胞内Fe<sup>2+</sup>水平;电镜检测细胞内超微结构的改变。结果 Dex组和Fer-1组预处理2h后细胞死亡率明显下降,铁死亡标志物PTGS2和ACSL4蛋白表达和基因表达水平显著降低,细胞超微结构损坏程度明显改善,ROS、脂质氧化以及Fe<sup>2+</sup>的水平明显低于FAC组( $P < 0.05$ )。结论 Dex预处理可以减轻FAC诱导的HT22细胞铁超载毒性损伤,与其可能抑制铁死亡有关。

**关键词** 铁死亡;右美托咪定;铁超载;海马神经元

**中图分类号** R 977

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1633-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.022

铁死亡<sup>[1]</sup>是依赖铁的脂质过氧化物积累到毒性水平导致细胞死亡的非凋亡的程序性死亡,铁是否过量是铁死亡发生的关键<sup>[2]</sup>。脑中铁沉积足以引发脑出血<sup>[3]</sup>,免疫组化检测显示脑内的铁沉积随年龄增加<sup>[4]</sup>。脑铁水平过高会引起脂质氧化水平

升高造成神经中毒<sup>[5]</sup>。mTOR(mammalian target of rapamycin)可以调节转铁蛋白受体1(transferrin receptor1,TFR1)的稳定性,维持细胞内铁的平衡状态<sup>[6]</sup>。在脑出血疾病的发病机制中发现mTOR介导的铁代谢的证据,缺失会引起铁代谢紊乱,引起氧化应激,产生细胞毒性。

右美托咪定(dexmedetomidine,Dex)作为高选择性 $\alpha_2$ 肾上腺素能受体激动剂,能改善神经退行性疾病和脑外伤中的氧化应激水平的异常增高<sup>[7]</sup>。小鼠海马神经元(hippocampal neurons,HT22)作为中枢神经执行认知功能的神经元易受到应激刺激—尤其是铁离子刺激,诱发氧化应激引起铁死亡,导致神经系统疾病的发生<sup>[8]</sup>。该研究拟探讨Dex对铁超载造成的HT22细胞损伤的保护作用及其机制,为麻醉药物治疗神经系统疾病提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞与主要试剂** 小鼠海马神经元细胞系、HT22专用完全培养基购自中国武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司;0.25%胰酶消化液购自Gibco公司;右美托咪定购自扬子江药业(集团)有限公司;DHE荧光探针购自yeasen公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒购自碧云天生物技术研究;Mito-FerroOrange亚铁离子探针购自日本Dojindo分子技术有限公司;兔抗长链酯酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4,ACSL4)、兔抗TFR1、兔抗mTOR购自美国Abcam公司。兔抗p-mTOR、抗 $\beta$ -actin和抗前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2,PTGS2)抗体、山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)辣根过氧化物酶(HRP)二抗购自中国武汉爱博泰克(Abcclonal)生物科技有限公司。mTOR、TFR1、ACSL4、PTGS2和GAPDH引物由中国安徽通用生物科技公司合成。

**1.2 仪器** 荧光倒置显微镜(德国Zeiss公司);Centrifuge 5424 R冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Synergy2酶标仪(美国BioTek仪器公司);Bio-shine ChemiQ化学发光成像系统、CFX Connect实时

2022-06-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82001185)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属巢湖医院麻醉科,巢湖 238000

<sup>2</sup>安徽医科大学药学院炎症免疫性疾病安徽省实验室,合肥 230032

<sup>3</sup>安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介:丁 慧,女,硕士研究生;

李元海,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:liyuanhai-1@163.com;

黄 艳,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:aydhy@126.com

定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Talos L120C G2 透射电子显微镜(美国 ThermoScientific 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞分组** HT22 细胞随机分为 4 组:① 对照组(Ctrl 组):HT22 细胞使用 HT22 细胞专用培养基进行培养;② FAC 处理组(FAC 组):使用终浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  的 FAC 处理 HT22 细胞后培养 24 h;③ Dex 处理组(Dex 组):使用终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  Dex 预处理 HT22 细胞 2 h 后,使用终浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 处理 HT22 细胞后培养 24 h;④ 铁死亡抑制剂 Fer-1 处理组(Fer-1 组):使用终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1 预处理 HT22 细胞 2 h 后,使用终浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 处理 HT22 细胞后培养 24 h。

**1.3.2 CCK-8 法检测 HT22 细胞活力** 选取对数生长期的 HT22 细胞,以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板上,培养 12 h 后,加入不同浓度 Dex (0.2、1、5、25  $\mu\text{mol/L}$ ),此外设置对照组(Ctrl 组)和空白组(等量细胞培养基和 CCK-8 试剂),每孔再设置 4 个复孔。置于细胞培养箱中孵育 12 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂(每孔内加入 100  $\mu\text{l}$  培养基),于培养箱中孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度(absorbance, A)值,以此计算各孔的细胞相对存活率。相对存活率 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$ ,实验重复 3 次。

**1.3.3 Western blot 法检测蛋白表达** HT22 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,培养 12 h 后,按照上述实验分组方法加入药物处理。制取样品,经 PBS 冲洗 2 次,加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解 30 min,细胞刮刮下细胞,置于 1.5 ml EP 管中,12 000 r/min 离心 30 min。取上清液,将蛋白样品与 5  $\times$  SDS 上样缓冲液按 1:4 体积混合,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min 变性,使温度降至室温。以每孔 10  $\mu\text{l}$  的蛋白样品量进行蛋白电泳,将蛋白转至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。PTGS2、ACSL4、p-mTOR、mTOR、TFR1 抗体按 1:1 000 稀释,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜后,使用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 1:10 000 稀释的二抗室温孵育 1 h,使用 ECL 发光试剂盒显影。

**1.3.4 qPCR 检测 PTGS2 和 ACSL4 表达水平** HT22 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,培养 12 h 后,按照上述实验分组方法加入药物处理。制取样品,加入 RNA 裂解液裂解 30 min,吹下细胞转至无酶 EP 管中,加入氯仿萃取,12 000 r/min 离心 30

min。取上清液加入等量异丙醇,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  助沉 2 h。随后 12 000 r/min 离心 15 min 得到 RNA 沉淀,洗涤干燥后定量,随后加入 Mix 进行逆转录合成 cDNA。根据仪器的操作说明,利用特异性引物对单个细胞样本的 cDNA 进行 qPCR 扩增。以  $\beta$ -actin 作为内参,比较分析各组 mRNA 的表达,见表 1。采用最优稀释和融化曲线,以确保每一套引物扩增产物的特异性。所有表达式均使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算。数据分析使用 qBase + (Version 3.0, Bio Gazelle, Gent, Belgium)。

表 1 引物序列

基因名	序列(5'-3')
ACSL4	F: GTTGGTCTACTTGGAGGAACG R: CCTGAGGGCTTGAATTC
PTGS2	F: TGTGACTGTTACCCGGACTGG R: TGCACATTGTAAGTAGGTGGAC
$\beta$ -actin	F: TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG R: AGTGGCAGCTGGACATCCG

**1.3.5 MDA 试剂盒测定脂质过氧化产物** 将 HT22 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 6 孔板上,培养 12 h 后,按照上述实验分组方法加入药物处理,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱内孵育 24 h,收集细胞至 EP 管中,1 200 r/min 离心 10 min,取上清液于冰上待测,吸取 300  $\mu\text{l}$  上清液于 96 孔板,使用酶标仪在 532 nm 处检测细胞的吸光度,根据标准曲线计算 MDA 浓度。

**1.3.6 DHE 免疫荧光染色检测 ROS 生成** 将 HT22 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 6 孔板上,培养 12 h 后,按照上述细胞分组方法加入药物处理,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中孵育 24 h 后,使用 PBS 洗 2 次,将终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的 DHE 荧光染料加到 PBS 中,放入细胞培养箱中孵育 30 min 后用倒置荧光显微镜进行观察并拍照。选择 Image J 软件进行荧光半定量分析,实验重复 3 次,对结果进行统计学分析。

**1.3.7 Mito-FerroOrange 荧光探针检测细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  的变化** 以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 6 孔板上,培养 12 h 后,按照上述细胞分组方法加入药物处理。使用 DMSO 将 Mito-FerroOrange 荧光探针溶解为 1  $\mu\text{mol/L}$  的储存液,于 6 孔板上处理细胞,使用 HBSS 洗 3 次后,每孔加入储存液使其终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ,于培养箱孵育 30 min 后,置于共聚焦显微镜下观察各组的荧光强度。

**1.3.8 电镜检测细胞超微结构的变化** 将 HT22

细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于培养瓶中,培养 12 h 至细胞汇集到 80% ~ 90%,按上述实验分组方法处理后孵育 24 h,提取电泳样品,细胞刮刮下细胞置于 EP 管中,1 500 r/min 离心 5 min,加入戊二醛固定液固定细胞沉淀。将标本置于电镜下观察各组线粒体嵴、线粒体膜密度及细胞核的变化。

**1.3.9 低表达 mTOR 时 TFR1 蛋白水平变化** 将 HT22 细胞随机分为 3 组:① 对照组 (Ctrl 组):HT22 细胞使用 HT22 细胞专用培养基进行培养;② FAC 处理组 (FAC 组):使用终浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 处理 HT22 细胞后培养 24 h;③ FAC + AZD8055 组:使用终浓度为 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 和终浓度为 80 nmol/L AZD8055 处理 HT22 细胞后培养 24 h。根据 1.3.3 项方法,使用 Western blot 检测 p-mTOR 和 TFR1 的蛋白表达水平。

**1.4 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计,数据均来自 3 次独立实验,正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两两比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Dex 对 FAC 暴露下 HT22 细胞存活率的影响

CCK-8 实验表明,0.2、1、5  $\mu\text{mol/L}$  Dex 对 HT22 细胞活力有促进作用,而 25  $\mu\text{mol/L}$  Dex 作用不显著 ( $F = 13.31, P < 0.05$ ),见图 1A。FAC 降低 HT22 细胞的活力,而 1、5  $\mu\text{mol/L}$  Dex 预处理抑制了 HT22 细胞活力的降低 ( $F = 0.57, P < 0.05$ ),见图 1B。因此选取 5  $\mu\text{mol/L}$  Dex 作为后续实验剂量。

### 2.2 Dex 抑制 FAC 引起 HT22 细胞发生铁死亡

使用 FAC 处理 HT22 细胞 24 h 后,与 Ctrl 组相比,FAC 组铁死亡标志性蛋白 PTGS2 和 ACSL4 蛋白表

达明显升高,与 FAC 组比较,Dex 组 PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达下降,这一变化与 Fer-1 组一致 ( $P < 0.05$ ),见图 2A,且 FAC 组 PTGS2 和 ACSL4 的 mRNA 表达水平相比于 Ctrl 组也显著增加,与 FAC 组比较,Dex 组 PTGS2 和 ACSL4 的 mRNA 表达水平下降,这一变化与 Fer-1 组一致 ( $P < 0.05$ ),见图 2B。

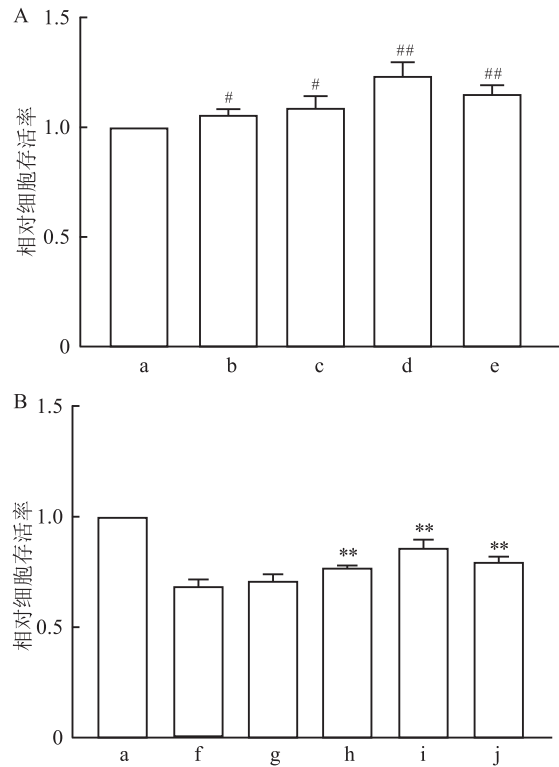


图 1 Dex 对 FAC 暴露下 HT22 细胞存活率的影响

A: CCK-8 法检测不同浓度 Dex 处理后细胞存活率; B: CCK-8 法检测 Dex 预处理细胞后加入 FAC 的细胞存活率; a: Ctrl 组; b - e: 0.2、1、5、25  $\mu\text{mol/L}$  Dex 组; f: FAC 组; g: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  Dex + FAC 组; h: 1  $\mu\text{mol/L}$  Dex + FAC 组; i: 5  $\mu\text{mol/L}$  Dex + FAC 组; j: 25  $\mu\text{mol/L}$  Dex + FAC 组; 与 Ctrl 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与 FAC 组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

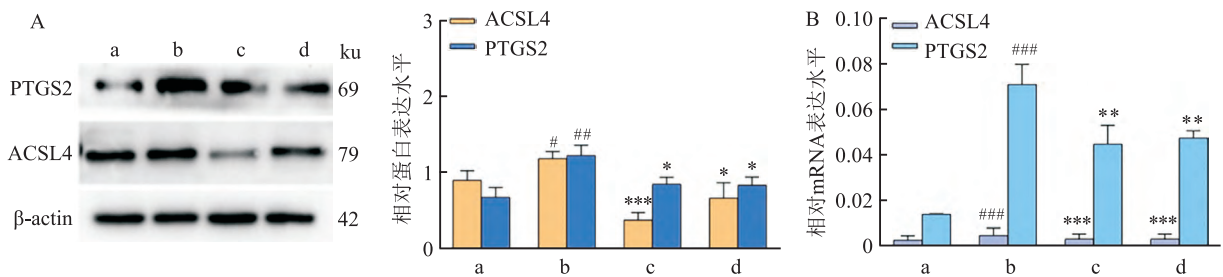


图 2 Dex 抑制 FAC 引起 HT22 细胞发生铁死亡

A: Western blot 法检测 HT22 细胞 PTGS2、ACSL4 的表达; B: qPCR 法检测 HT22 细胞 PTGS2、ACSL4 的 mRNA 表达; a: Ctrl 组; b: FAC 组; c: Dex + FAC 组; d: Fer-1 + FAC 组; 与 Ctrl 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; 与 FAC 组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



**2.3 Dex 降低 HT22 细胞内 ROS 水平** 细胞内 ROS 的水平增高会引起细胞发生氧化应激。DHE 荧光探针染色可检测细胞内 ROS 水平,使用 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 处理 HT22 细胞 24 h 后,相较于 Ctrl 组,FAC 组 ROS 水平升高( $P < 0.01$ );使用 Dex 和 Fer-1 预处理 2 h 后,与 FAC 组比较,Dex 组和 Fer-1 组 ROS 水平降低( $F = 35.90, P < 0.05$ ),见图 3。

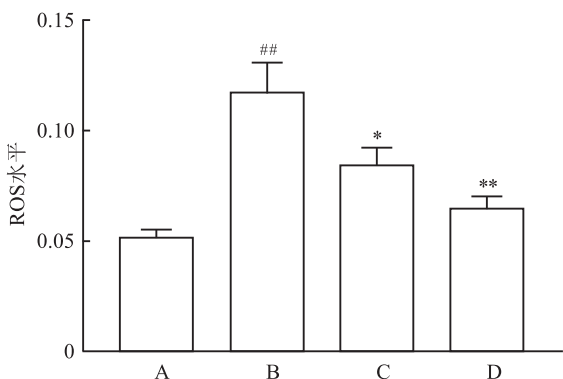
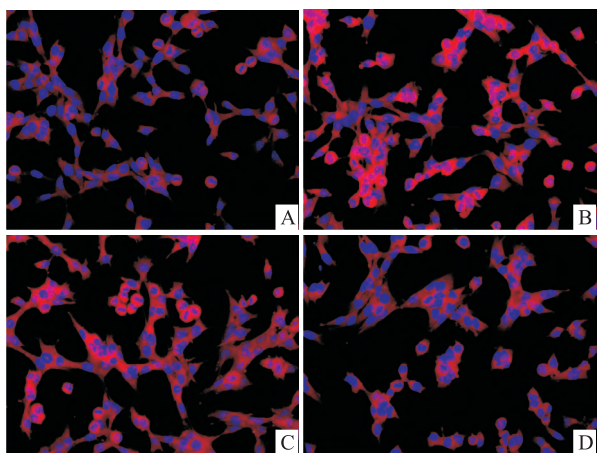


图3 DHE 荧光探针检测 HT22 细胞中的 ROS 水平  $\times 400$

A: Ctrl 组;B:FAC 组;C:Dex 组;D:Fer-1 组;与 Ctrl 组比较;##  $P < 0.01$ ;与 FAC 组比较;\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

**2.4 Dex 减轻细胞内脂质氧化水平** 使用 125  $\mu\text{mol/L}$  FAC 处理 HT22 细胞 24 h 后,相较于 Ctrl 组,FAC 组脂质氧化水平升高( $P < 0.001$ );使用 Dex 预处理 2 h 后,与 FAC 组比较,Dex 组脂质氧化水平降低( $F = 162.20, P < 0.001$ ),见图 4。

**2.5 Dex 降低细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量** Mito-FerroOrange 荧光探针检测  $\text{Fe}^{2+}$  的变化,结果显示,与 Ctrl 组相比,FAC 组细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  浓度升高( $P < 0.001$ ),而 Dex 组与 Fer-1 组细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  浓度则显著下降( $P < 0.001$ ),表明 Dex 抑制了 FAC 所引起的  $\text{Fe}^{2+}$  浓度的增加( $F = 0.36, P < 0.001$ ),见图 5。

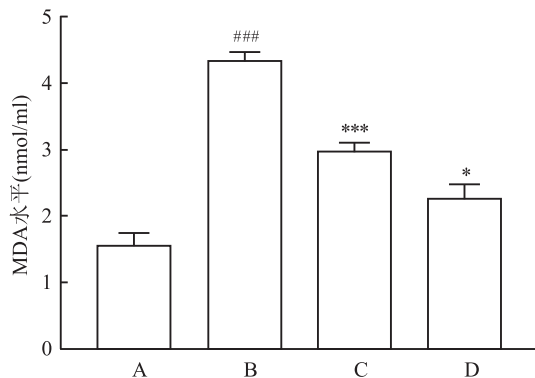


图4 MDA 试剂盒检测 HT22 细胞中脂质氧化程度

A: Ctrl 组;B:FAC 组;C:Dex 组;D:Fer-1 组;与 Ctrl 组比较;###  $P < 0.001$ ;与 FAC 组比较;\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.001$

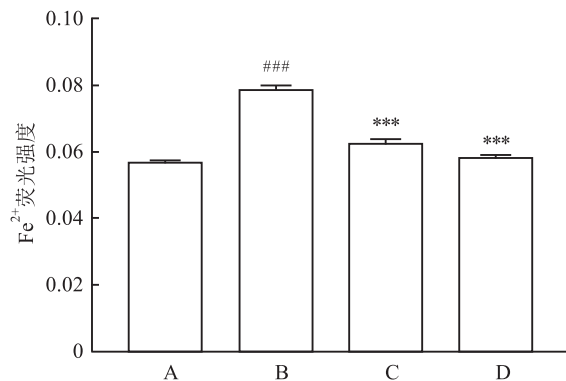
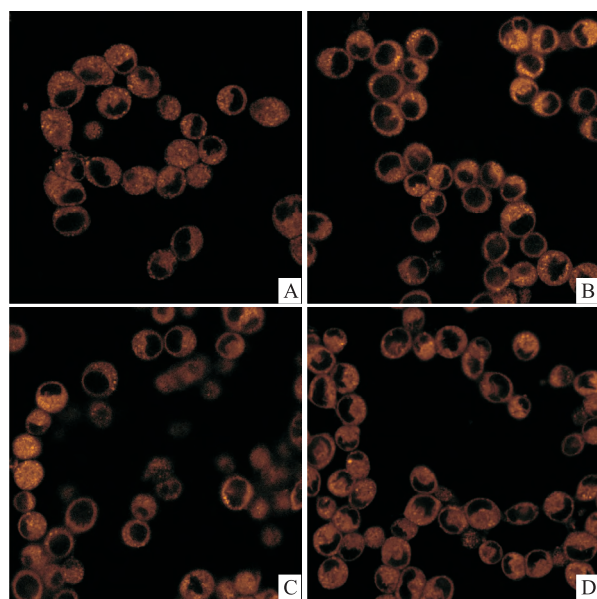


图5 Mito-FerroOrange  $\text{Fe}^{2+}$  荧光探针

检测 HT22 细胞中的  $\text{Fe}^{2+}$  含量  $\times 60$

A: Ctrl 组;B:FAC 组;C:Dex 组;D:Fer-1 组;与 Ctrl 组比较;###  $P < 0.001$ ;与 FAC 组比较;\*\*\*  $P < 0.001$

**2.6 Dex 减轻细胞超微结构损伤** 使用透射电子显微镜观察 HT22 细胞中的超微结构改变,与 Ctrl 组比较,FAC 组线粒体损伤严重,膜密度增厚,线粒

体嵴消失, Dex 组和 Fer-1 组细胞内线粒体损伤程度减轻, 见图 6。

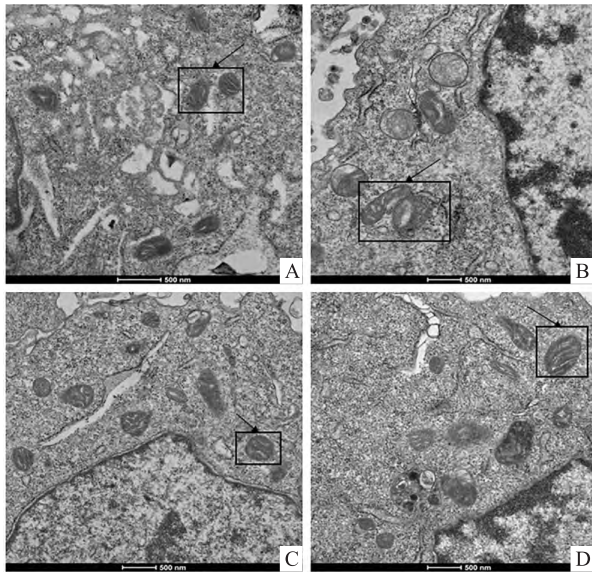


图 6 电子显微镜下 HT22 细胞中线粒体及细胞核超微结构的变化情况 ×13 500  
A: Ctrl 组; B: FAC 组; C: Dex 组; D: Fer-1 组; 箭头: 线粒体

**2.7 Dex 通过减轻铁超载毒性抑制铁死亡** 使用 mTOR 抑制剂 AZD8055 后, TFR1 表达上调 ( $F = 73.03, P < 0.05$ ), 见图 7A; 与 Ctrl 组比较, FAC 组 mTOR 表达水平下调, TFR1 及 Fpn 水平上调, 铁蛋白 (Ferritin) 表达降低; 与 FAC 组比较, Dex 组 mTOR 表达水平升高, TFR1 和 Fpn 表达水平减少, 而 Ferritin 表达活跃 ( $P < 0.05$ ), 见图 7B。

### 3 讨论

本研究根据文献<sup>[9]</sup>和 CCK-8 法检测结果确定了 Dex 是一种安全无毒的麻醉药物, 可以保护 HT22 细胞免受毒性损伤。采用 FAC 诱导 HT22 细胞, 建立铁超载模型。结果表明, 与 Ctrl 组相比, FAC 组  $Fe^{2+}$  含量升高, 提示铁超载模型建立成功。本实验采用  $5 \mu\text{mol/L}$  Dex 预处理, 发生铁超载毒性的 HT22 细胞中  $Fe^{2+}$  含量下降, 提示 Dex 可以减轻铁超载引起的 HT22 细胞损伤。

铁死亡是迄今为止发现的一种相对较新的死亡方式, 它与神经退行性疾病和脑缺血/出血性中风均有密切关系<sup>[10]</sup>, 铁代谢紊乱可以认为是铁死亡的触

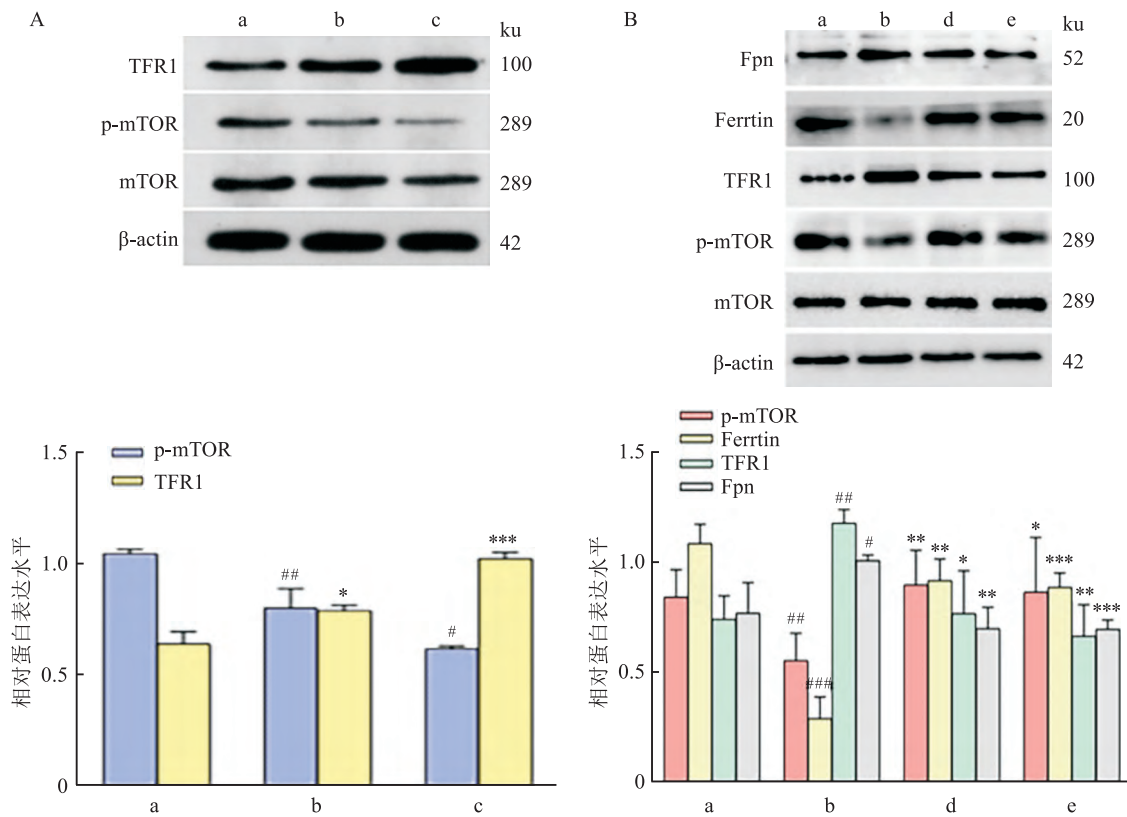


图 7 Dex 通过减轻铁超载毒性抑制铁死亡

A: Western blot 法检测 HT22 细胞经 AZD8055 处理后 p-mTOR、TFR1 的表达; B: Western blot 法检测铁代谢相关蛋白的表达; a: Ctrl 组; b: FAC 组; c: FAC + AZD8055 组; d: Dex 组; e: Fer-1 组; 与 Ctrl 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; 与 FAC 组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

发阶段<sup>[11]</sup>,影响细胞中 ROS 和脂质氧化的水平。HT22 细胞分离自大脑海马体,是铁死亡高度敏感的细胞,目前广泛应用于神经系统疾病的研究。FAC 诱导的细胞外高铁浓度,使 HT22 细胞受到铁超载毒性攻击。HT22 细胞发生铁超载后,会产生过量脂质氧化产物,加速细胞的损伤,引起氧化应激。细胞外高铁能增加 TFR1 入口的铁积累量,刺激 TFR1 通道打开,大量铁流入细胞,细胞内 Ferritin 可以调节细胞内铁水平,对其进行贮存,维持细胞内铁的稳态。一旦 Ferritin 降解,铁将变成游离态并促进 Fenton 反应发生,生成脂质过氧自由基(PUFA-OO·),并最终形成脂质氢过氧化物(PUFA-OOH),加速脂质积聚,最终导致铁死亡<sup>[12]</sup>。PTGS2 和 ACSL4 是已知的铁死亡关键的标志性蛋白,参与上述脂质积累的过程,本研究结果显示,与 Ctrl 组比较,FAC 组 HT22 细胞 PTGS2 和 ACSL4 的蛋白和 mRNA 表达水平升高,ROS、脂质氧化水平和 Fe<sup>2+</sup> 水平表达升高,细胞内线粒体结构损坏程度加重,提示 FAC 可以促进铁死亡的发生;且 Dex 能降低 FAC 引起的 HT22 细胞中 PTGS2 和 ACSL4 的蛋白和 mRNA 表达水平升高,减轻 ROS、脂质氧化水平和 Fe<sup>2+</sup> 水平表达的升高,以及缓解细胞内线粒体结构损坏程度,提示 Dex 可能是通过抑制铁死亡的方式保护 HT22 细胞。

mTOR 通路失控通常表现在脑出血、神经退行性疾病和衰老等许多疾病中,因此靶向 mTOR 治疗在近年来快速兴起<sup>[13]</sup>,mTOR 在铁死亡的研究中越发受到重视,许多研究者认为 mTOR 介导的铁代谢与脑出血之间存在联系。mTOR 作为调节铁离子代谢的上游靶点已被证实<sup>[14]</sup>,mTOR-TFR1 信号通路作为调节铁离子代谢的关键通路,因此 mTOR 在铁死亡的发生机制中具有重要作用。细胞高铁浓度会使 mTOR 的表达受到抑制,导致细胞内铁稳态失衡,引起氧化应激诱发铁死亡<sup>[15]</sup>。本研究显示,在 HT22 细胞铁超载的模型中,使用 mTOR 抑制剂 AZD8055 处理,在 mTOR 表达量低的组别中下游 TFR1 蛋白表达水平升高,这表明在 HT22 细胞的铁超载模型中存在该通路的调控;使用 Dex 处理后,由 FAC 诱导的 mTOR 蛋白表达上调,下游的 TFR1 蛋白表达被抑制,并且降低了 FAC 引起的 HT22 细胞中 Ferritin 和 Fpn——铁相关的蛋白表达水平的上调。这说明 Dex 可能是通过调节铁代谢的方式影响

细胞存活,从而改善铁超载引起的 HT22 细胞损伤。

本研究证实 Dex 可以抑制 FAC 诱导的 HT22 细胞发生铁死亡,从而减轻 HT22 细胞的铁超载毒性,其机制可能与激活 mTOR-TFR1 通路有关,自噬可能参与其中,但本研究尚未证实。本研究使用的 Dex 是商品针剂,对细胞实验存在一定影响;其次,在细胞机制方面,本研究证实 Dex 对铁超载引起的 HT22 细胞氧化应激损伤具有明确的保护作用,但尚未在原代神经元上验证;在动物体内 Dex 对铁超载引起的认知和记忆功能障碍是否具有保护作用是本课题组下一步的研究方向。

(致谢:本实验在安徽医科大学药学院教育部抗炎免疫药物重点实验室完成,感谢各位老师和同学的帮助。)

### 参考文献

- [1] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-72.
- [2] Rodriguez R, Schreiber S L, Conrad M. Persister cancer cells: Iron addiction and vulnerability to ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2021, S1097-2765(21):1038-8.
- [3] Li M Y, Dai X H, Yu X P, et al. Scalp acupuncture protects against neuronal ferroptosis by activating the p62-Keap1-Nrf2 pathway in rat models of intracranial haemorrhage[J]. *J Mol Neurosci*, 2022, 72(1):82-96.
- [4] Connor J R, Menzies S L, Martin S M S, et al. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains[J]. *J Neurosci Res*, 1990, 27(4):595-611.
- [5] Ashraf A, Jeandriens J, Parkes H G, et al. Iron dyshomeostasis, lipid peroxidation and perturbed expression of cystine/glutamate antiporter in Alzheimer's disease: Evidence of ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2020, 32:101494.
- [6] Zhao L, Zhai M, Yang X, et al. Dexmedetomidine attenuates neuronal injury after spinal cord ischaemia-reperfusion injury by targeting the CNPY2-endoplasmic reticulum stress signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12):8173-83.
- [7] 秦智刚,徐九年,李 锐.右美托咪定减轻脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的作用[J]. *安徽医科大学学报*,2021,56(1):72-6.
- [8] Li L B, Chai R, Zhang S, et al. Iron exposure and the cellular mechanisms linked to neuron degeneration in adult mice[J]. *Cell*, 2019, 8(2):198.
- [9] Qiu L Q, Ge L, Hu Q H. Dexmedetomidine protects SK-N-SH nerve cells from oxidative injury by maintaining[J]. *Bio Pharm Bull*, 2019, 43(3):424-31.
- [10] Zhou S Y, Cui G Z, Li X, et al. Yan mechanism of ferroptosis



- and its relationships with other types of programmed cell death: Insights for potential interventions after intracerebral hemorrhage [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:589042.
- [11] Li J Y, Liu S Q, Yao R Q, et al. A novel insight into the fate of cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury: From iron metabolism to ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 799499.
- [12] Liang D G, Minikes A M, Jiang X J. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling [J]. *Mol Cell*, 2022, S1097-2765(22):00260-X.
- [13] Bayeva M, Khechaduri A, Puig S, et al. mTOR regulates cellular iron homeostasis through tristetraprolin[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(5):645-57.
- [14] Guiney S J, Adlard P A, Bush A I, et al. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2017, 104: 34-48.
- [15] Baba Y, Higa J K, Shimada B K, et al. Protective effects of the mechanistic target of rapamycin against excess iron and ferroptosis in cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 314(3):H659-68.

## Protective effect of dexmedetomidine on iron overload-induced injury of mouse hippocampal neurons

Ding Hui<sup>1</sup>, Wang Jingyan<sup>1</sup>, Huang Yan<sup>2</sup>, Zhong Weiwei<sup>3</sup>, Lu Xianfu<sup>3</sup>, Li Yuanhai<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Anesthesiology, Chaohu Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Chaohu 238000;* <sup>2</sup>*Anhui Provincial Laboratory of Inflammatory and Immune Diseases, Anhui Institute of Innovative Drugs, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;* <sup>3</sup>*Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

**Abstract Objective** To investigate the protective effect and related mechanisms of dexmedetomidine (Dex) on iron overload toxicity in mouse hippocampal neurons (HT22) induced by ferric ammonium citrate (FAC). **Methods**

Selected HT22 cells in good condition were randomly divided into 4 groups: control group (Ctrl group), FAC treatment group (FAC group), Dex treatment group (Dex group), ferroptosis inhibitor Fer-1 treatment group (Fer-1 group). The iron overload model was established by FAC-induced cells. Subsequently, the proliferation and survival rate of HT22 cells was detected by CCK-8 method; Western blot was used to detect the ferroptosis marker proteins prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4). The protein expressions of mammalian target of rapamycin (mTOR), transferrin receptor 1 (TFR1) and ferroportin (Fpn); the gene expression levels of PTGS2 and ACSL4 in HT22 cells were detected by qPCR; Reactive oxygen species (ROS) levels in HT22 cells was detected by DHE fluorescent probe; MDA detection kit was used to detect lipid oxidation levels in HT22 cells; Mito-FerroOrange—ferrous ion probe was used to detect ferrous ion levels in HT22 cells; electron microscopy was used to detect intracellular ultrastructural changes. **Results**

Dex group and Fer-1 group significantly decreased cell death rate after 2 h of pretreatment, the protein and gene expression levels of ferroptosis markers PTGS2 and ACSL4 significantly decreased. The degree of cell ultrastructural damage was significantly improved. The levels of ROS, lipid oxidation and Fe<sup>2+</sup> were significantly lower than those of the FAC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Dex pretreatment can attenuate FAC-induced iron overload toxicity injury in HT22 cells, which may be related to the inhibition of ferroptosis.

**Key words** ferroptosis; dexmedetomidine; iron overload; hippocampal neurons