

紫草酸甲酯抑制海马 Nox4 介导的铁死亡改善小鼠术后学习记忆障碍

刘铁龙, 亓文强, 江洪洋, 王瑞雪, 代志刚, 殷姜文

摘要 目的 探讨紫草酸甲酯(PAME)对小鼠术后学习记忆障碍的影响及机制。方法 将C57BL/6J雄性小鼠随机分为Sham组、手术组、手术+PAME组(PAME组)、手术+NADPH氧化酶4(Nox4)腺相关病毒过表达组(Nox4过表达组)、手术+Nox4腺相关病毒空载组(AAV空载组)、手术+PAME+Nox4过表达组(PN组)。手术模型采用剖腹探查术,PAME(20 mg/kg)给药时间为术后连续灌胃7 d, Nox4腺相关病毒在手术前28 d注射到海马脑区。Morris水迷宫实验和条件性恐惧实验检测小鼠学习记忆能力;免疫荧光观察Nox4表达变化;Western blot法检测Nox4、长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)表达;分光光度法检测活性氧(ROS)和铁含量。结果 与Sham组相比,手术组、Nox4过表达组、AAV空载组小鼠学习记忆能力下降, Nox4、ACSL4表达升高, GPX4表达降低, ROS、铁含量增加, PAME治疗后小鼠术后学习记忆能力改善, 海马神经元Nox4和铁死亡减轻。结论 PAME治疗后可提高术后小鼠学习记忆能力, 与其抑制海马Nox4介导的铁死亡有关。**关键词** 紫草酸甲酯;学习记忆;NADPH氧化酶4;铁死亡;海马

中图分类号 R 964

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)07-1071-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.002

学习记忆障碍是麻醉和手术后常发生的并发症,严重影响患者生活质量并增加医疗费用及社会负担^[1-3]。研究^[4-5]表明,学习记忆障碍潜在的发生机制是麻醉和手术引起的神经炎症和氧化应激。紫草酸甲酯(paederosidic acid methyl ester, PAME)是从鸡矢藤中提取的环烯醚萜类单体,具有抗炎、抗氧化应激和镇痛等作用^[6-7]。因此,PAME可能具有改善学习记忆障碍的潜在药理作用。研究表明,NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, Nox4)介导的氧化应激水平增加引起铁死亡^[8],且海马区铁死亡

会导致患有脓毒症相关性脑病的大鼠发生学习记忆障碍^[9]。PAME具有抗氧化应激作用,其对Nox4介导的氧化应激水平增加引起的铁死亡及其导致的学习记忆障碍是否产生抑制作用尚无报道。因此,该研究建立剖腹探查术小鼠动物模型,使用PAME进行干预治疗,观察其对术后小鼠学习记忆的作用及其与Nox4介导的铁死亡途径的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 PAME(货号:HY-N2433,美国Merck公司);异氟烷(货号:R510-22,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);Nox4过表达AAV病毒(上海汉恒生物科技有限公司);Nox4抗体(货号:ab133303)、山羊抗兔TRITC荧光二抗(货号:ab8135)(英国Abcam公司);长链脂酰辅酶A合成酶4(long chain acyl CoA synthetase 4, ACSL4)抗体(货号:A04372-2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(货号:BM5231)(武汉博士德生物工程有限公司);GAPDH(货号:TA-08)、山羊抗兔IgG二抗(货号:ZB-2301)、山羊抗小鼠IgG二抗(货号:ZB-2305)(北京中杉金桥生物技术有限公司);组织铁检测试剂盒(货号:A039-2-1)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(货号:E004-1-1)(南京建成生物工程研究所)。

小动物麻醉机(型号:R500,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);低温高速离心机(型号:1-14k,德国Sigma公司);激光共聚焦扫描显微镜(型号:LSM710,德国Carl Zeiss公司);Labmaze动物行为学分析系统(型号:V3.0)、小鼠脑立体定位仪(型号:ZS-FD,北京众实迪创科技发展有限公司);电泳槽(型号:DYCZ-21,北京六一生物科技有限公司);精密微量注射泵(型号:QSI,美国Stoelting公司);化学发光成像仪(型号:Tanon-2500,上海天能生命科学有限公司)。

1.2 实验动物 选择12~14月龄C57BL/6J雄性小鼠108只,体质量30~35 g,购于济南朋悦实验动物有限公司。实验小鼠饲养在恒温动物房,温度

2023-05-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160235)

作者单位:石河子大学第一附属医院麻醉科,石河子 832000

作者简介:刘铁龙,男,硕士研究生;

殷姜文,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

yjw6654328@163.com

(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(55 ± 10)%, 12 h 光照/黑暗周期, 小鼠自由进食和饮水。本研究经石河子大学医学院第一附属医院伦理审查委员会批准(批准号: A2021-074-01)。

1.3 实验分组 采用随机数字法将 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为 6 组($n = 18$): ① Sham 组: 小鼠麻醉后自然苏醒, 未做特殊处理。② 手术组: 将小鼠用 2% 异氟烷吸入麻醉, 常规消毒后在腹中线上剪开约 1 cm 的垂直切口, 然后依次探查肠、肝、脾、肾等器官, 探查完毕并确认腹腔无出血, 用 4-0 无菌缝线逐层缝合伤口, 术毕置于保温箱中苏醒。③ 手术 + PAME 组(PAME 组): 在术后第 1 天开始行 20 mg/kg PAME 灌胃, 连续 7 d。④ 手术 + Nox4 腺相关病毒过表达组(Nox4 过表达组): Nox4 过表达腺相关病毒于术前 28 d 通过脑立体定位仪注射到小鼠海马脑区, 28 d 后常规进行手术。⑤ 手术 + Nox4 腺相关病毒空载组(AAV 空载组): 术前 28 d 通过脑立体定位仪将 AAV 空载病毒注射到小鼠海马脑区, 28 d 后常规进行手术。⑥ 手术 + PAME + Nox4 过表达组(PN 组): 术前 28 d 将 Nox4 过表达腺相关病毒通过脑立体定位仪注射到小鼠海马脑区, 手术后给予 20 mg/kg PAME 灌胃处理, 连续 7 d。PAME 剂量及灌胃时间根据本课题组预实验和 Chen et al^[10] 研究方案确定。

1.4 小鼠海马 AAVs 立体定位注射 小鼠面罩吸入异氟烷麻醉, 通过耳杆和齿栓将小鼠头部固定于脑立体定位仪上, 用颅骨钻在小鼠颅骨表面钻孔, 突破颅骨后, 按小鼠海马坐标(前囟向后 2.5 mm, 向左/右旁开 2.0 mm, 深度 1.8 mm), 将尖端带有玻璃微电极的微量注射针以 0.02 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度注入 AAVs 病毒, 注射时间 25 min, 总体积 0.5 μl , 注射完毕针尖停留 10 min, 缓慢移除针尖, 缝合头皮, 麻醉苏醒后放入笼中单独饲养。

1.5 Morris 水迷宫实验 调节动物行为学分析系统将圆形水池分为 4 个象限。池内加入适量的水并保持水温在 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 将一个圆柱状平台放置于第二象限正中。实验分为定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验: 从术前第 6 天起至术前第 2 天, 共测量 5 次, 每天在固定时间按顺时针方向从 4 个不同象限作为入水点, 记录小鼠寻找平台的时间即逃逸潜伏期, 如果在 90 s 内未找到平台, 则将小鼠引上平台并保持 15 s, 此时逃逸潜伏期记录为 90 s; 空间探索实验: 术前 1 d 撤除平台, 将小鼠在第四象限面向池壁放入水中, 行为学轨迹分析仪记录小鼠

在 90 s 内穿越平台位置的次数以及在第二象限探索的时间。用同样的方法在术后第 1、3、7 天内重复空间探索实验^[11]。

1.6 条件性恐惧实验 按照已报道的实验流程^[12], 在术前第 2 天, 将各组小鼠放入条件性恐惧刺激箱内, 适应 2 min, 同时给予声音刺激(70 dB)及足底电刺激(0.7 A), 间隔 1 min 后重复以上刺激, 连续 20 次。结束后小鼠在刺激箱内停留 2 min 后再放回鼠笼。在术前 1 d、术后第 1、3、7 天将各组小鼠再次放入条件性恐惧刺激箱内, 适应 2 min, 仅给予 10 s 声音刺激(70 dB), 观察并记录小鼠僵直时间百分比, 重复上述步骤 5 次, 评价小鼠认知功能。

1.7 ROS、海马组织铁含量检测 在术后第 7 天, 每组取 6 只小鼠海马组织匀浆, 按照相应试剂盒说明书采用分光光度法检测海马组织 ROS 水平和铁含量。

1.8 免疫荧光染色 术后第 7 天, 每组各 6 只小鼠经心脏灌注后取脑, 脱水后制备冰冻脑切片, 经 5% BSA 封闭 1 h 后滴加 Nox4 一抗(1 : 200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤后滴加 TRITC 标记的荧光二抗(1 : 500), 室温避光孵育 2 h, DAPI 液染细胞核 3 min, 封片后激光共聚焦显微镜观察, 每张切片在 200 倍镜下随机选 3 个不同视野进行采图。用 Image J 软件进行荧光强度测定。

1.9 Western blot 术后第 7 天, 每组取 6 只小鼠快速断头取脑, 剥离海马组织, 组织匀浆、RIPA 裂解提取蛋白, 并用 BCA 法测定蛋白浓度。经上样、电泳、转膜、封闭后, 选择 GAPDH(1 : 1 000)、目标蛋白 Nox4(1 : 1 500)以及铁死亡标志性蛋白 ACSL4(1 : 1 000)和 GPX4(1 : 1 000)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗山羊抗兔(1 : 2 000)和山羊抗小鼠(1 : 2 000)室温孵育 2 h 后滴加化学发光试剂曝光, Image J 软件测定条带灰度值, 并以 GAPDH 为参照, 统计 Nox4、ACSL4 和 GPX4 相对表达量。

1.10 统计学处理 所有数据均使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 正态分布计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAME 对小鼠术后学习记忆的影响

2.1.1 各组术前行为学差异无统计学意义 各组

术前定位航行实验结果差异无统计学意义 ($F = 0.348, P > 0.05$), 但随着训练天数的增加, 各组找到平台所需平均时间缩短; 术前空间探索实验各组小鼠在 90 s 内穿越平台位置的次数以及在第二象限探索的时间差异均无统计学意义 ($F = 0.228, P > 0.05; F = 0.397, P > 0.05$)。术前条件性恐惧实验各组小鼠僵直时间百分比差异也无统计学意义 ($F = 0.365, P > 0.05$)。见图 1。

2.1.2 PAME 增加小鼠术后穿越平台次数、延长空间探索时间 空间探索实验中记录的各组小鼠的游泳轨迹如图 2 所示。与 Sham 组相比, 手术组小鼠在术后第 1、3、7 天穿越平台次数减少 ($P < 0.001$), 在第二象限探索时间更短 ($P < 0.001$)。但在给予 PAME 治疗(即 PAME 组)的小鼠穿越平台次数和第二象限探索时间比手术组增加 ($P < 0.001, P <$

0.05)。与手术组相比, Nox4 过表达组的小鼠穿越平台次数更少、第二象限探索时间更短 ($P < 0.05$), 但在给予 PAME 治疗后可被逆转 ($P < 0.001$)。AAV 空载组与手术组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、2。

表 1 PAME 对小鼠术后穿越平台次数的影响 (次, $n = 9, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天
Sham	7.00 ± 0.89	6.83 ± 0.98	6.17 ± 1.17
手术	2.33 ± 1.03***	2.17 ± 0.75***	2.00 ± 0.63***
PAME	5.83 ± 1.33###	5.50 ± 1.34###	5.67 ± 0.82###
Nox4 过表达	0.33 ± 0.52#	0.17 ± 0.41#	0.33 ± 0.52#
AAV 空载	2.17 ± 1.17	2.00 ± 0.89	1.67 ± 0.52
PN	5.33 ± 1.21&&&	5.17 ± 1.72&&&	5.00 ± 0.89&&&
F 值	35.88	32.17	56.75
P 值	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

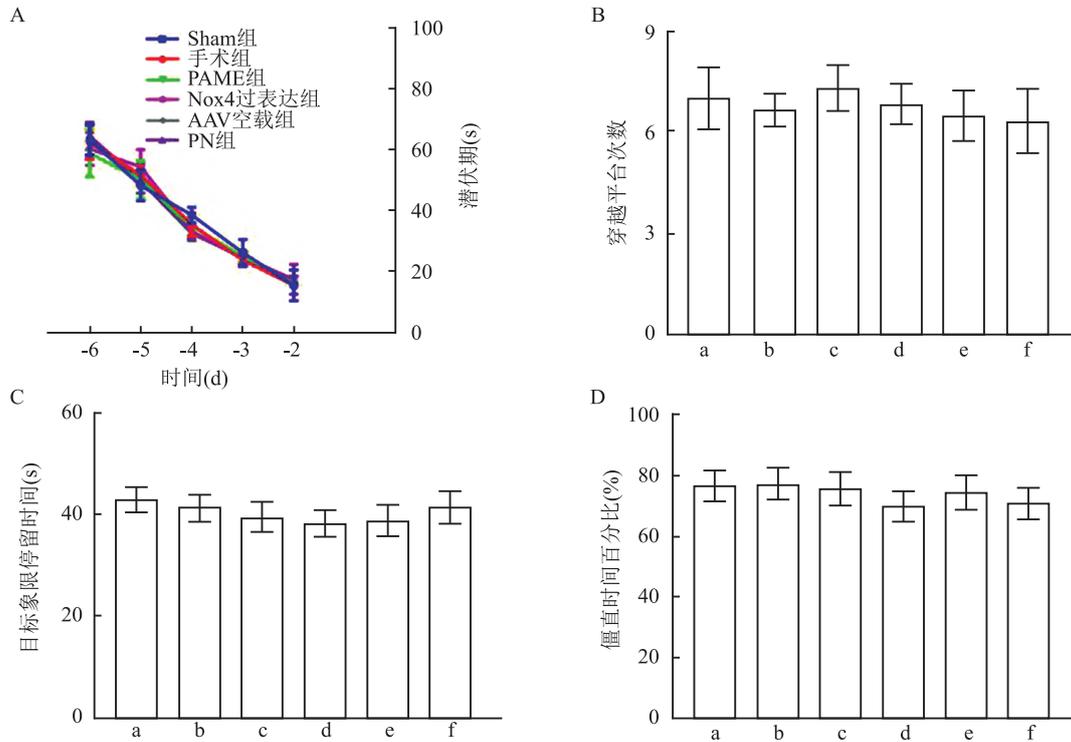


图 1 术前各组行为学比较 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

A: 定位航行训练逃逸潜伏期; B: 穿越平台次数; C: 目标象限停留时间; D: 僵直时间百分比; a: Sham 组; b: 手术组; c: PAME 组; d: Nox4 过表达组; e: AAV 空载组; f: PN 组

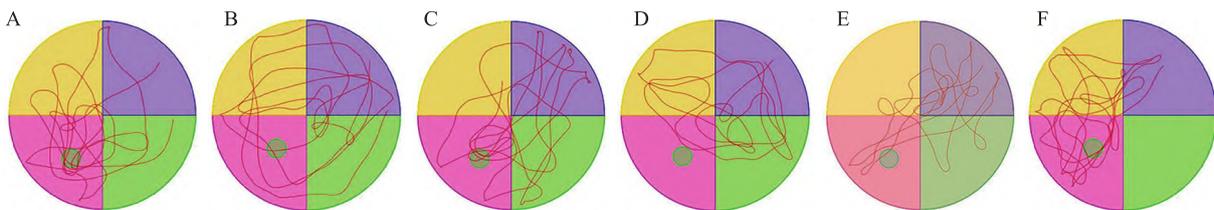


图 2 水迷宫实验小鼠活动轨迹

A: Sham 组; B: 手术组; C: PAME 组; D: Nox4 过表达组; E: AAV 空载组; F: PN 组

表2 PAME 对小鼠术后目标象限停留时间的影响(s, n = 9, $\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
Sham	41.37 ± 6.63	41.46 ± 6.17	39.06 ± 7.11
手术	19.31 ± 1.56 ^{***}	19.13 ± 4.51 ^{***}	20.42 ± 3.35
PAME	30.16 ± 6.30 [#]	36.28 ± 6.36 ^{###}	34.77 ± 6.34 ^{##}
Nox4 过表达	9.71 ± 2.34 [#]	8.92 ± 3.06 [#]	10.76 ± 2.31 [#]
AAV 空载	19.82 ± 5.94	18.37 ± 4.77	18.03 ± 3.84
PN	29.94 ± 6.76 ^{&&&}	32.92 ± 6.30 ^{&&&}	31.61 ± 5.95 ^{&&&}
F 值	25.56	34.45	24.30
P 值	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

2.1.3 PAME 增加小鼠术后条件性恐惧实验僵直时间百分比 与 Sham 组相比,手术组在术后第1、3、7 天小鼠僵直时间百分比减少($P < 0.001$),在给予 PAME 治疗后,PAME 组的小鼠僵直时间百分比增加($P < 0.05$)。与手术组相比,Nox4 过表达组的小鼠僵直时间百分比减少($P < 0.05$),但在给予 PAME 治疗后小鼠僵直时间百分比增加($P < 0.001$)。AAV 空载组与手术组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表3。

表3 PAME 对小鼠术后僵直时间百分比的影响(% , n = 9, $\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第3天	第7天
Sham	78.40 ± 11.04	80.67 ± 9.50	73.83 ± 11.04
手术	43.52 ± 11.04 ^{***}	42.08 ± 8.49 ^{***}	41.88 ± 11.04 ^{***}
PAME	64.57 ± 12.51 [#]	71.58 ± 6.84 ^{###}	68.27 ± 13.21 ^{##}
Nox4 过表达	23.77 ± 7.20 [#]	25.42 ± 4.57 [#]	20.08 ± 6.57 [#]
AAV 空载	46.03 ± 9.04	43.18 ± 9.82	41.50 ± 10.47
PN	62.60 ± 11.00 ^{&&&}	67.35 ± 12.66 ^{&&&}	66.58 ± 12.87 ^{&&&}
F 值	19.71	33.55	22.05
P 值	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

2.2 PAME 抑制小鼠术后海马组织 Nox4 介导的铁死亡

2.2.1 PAME 降低小鼠术后海马组织 ROS、铁的含量 小鼠海马组织 ROS 和铁含量检测结果显示,手术组小鼠海马组织 ROS 和铁含量高于 Sham 组($F = 40.94, P < 0.001$; $F = 36.15, P < 0.001$),PAME 灌胃治疗后小鼠海马组织 ROS 和铁含量出现降低($P < 0.001$)。给予 Nox4 过表达病毒注射的小鼠海马组织 ROS 和铁含量比单纯手术组高($P < 0.05$),在给予 PAME 治疗后,Nox4 过表达组的 ROS 和铁含量下降($P < 0.001$)。AAV 空载组与手术组相比,小鼠海马区 ROS 和铁含量差异无统计学意义($P > 0.05$),见图3。

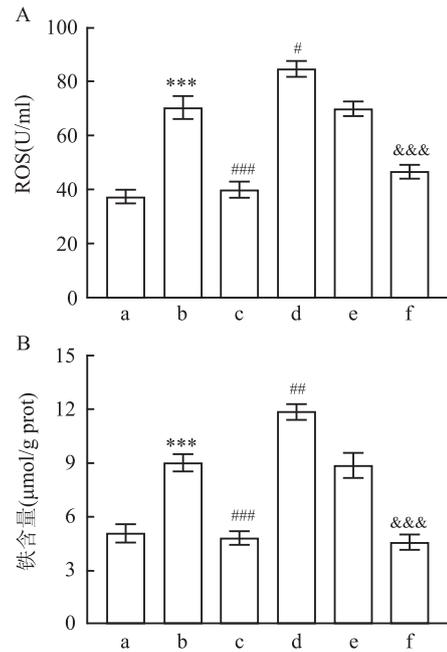


图3 各组 ROS 和铁含量变化

A: ROS 统计图; B: 铁含量统计图; a: Sham 组; b: 手术组; c: PAME 组; d: Nox4 过表达组; e: AAV 空载组; f: PN 组; 与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

2.2.2 PAME 降低小鼠术后海马 CA1 区 Nox4 的表达 免疫荧光实验结果显示, Nox4 在小鼠海马 CA1 区锥体神经元胞质表达,与 Sham 组相比,手术组小鼠海马 CA1 区 Nox4 的荧光强度增强($F = 175.3, P < 0.001$),在给予 PAME 治疗后荧光强度降低($P < 0.001$)。Nox4 过表达组比手术组 Nox4 的荧光强度增加($P < 0.01$),在给予 PAME 后出现逆转($P < 0.001$)。AAV 空载组与手术组相比小鼠海马 CA1 区 Nox4 的荧光强度差异无统计学意义($P > 0.05$),见图4。

2.2.3 PAME 对小鼠术后海马组织 Nox4 及铁死亡标志性蛋白(ACSL4 和 GPX4)表达的影响 Western blot 实验结果显示,与 Sham 组相比,手术组小鼠海马组织 Nox4 表达增加($F = 103, P < 0.001$),铁死亡标志性蛋白 ACSL4 的表达增加($F = 94.44, P < 0.001$),GPX4 表达水平降低($F = 73.9, P < 0.001$)。在给予 PAME 治疗后,手术组小鼠海马 Nox4 蛋白、ACSL4 的表达均降低($P < 0.001$),GPX4 表达水平增加($P < 0.001$)。同时,与手术组相比,Nox4 过表达组小鼠海马 Nox4、ACSL4 的表达均显著增加($P < 0.001$),GPX4 表达降低($P < 0.001$),给予 PAME 治疗后结果出现逆转($P < 0.001$)。AAV 空载组与手

术组相比,小鼠海马组织 Nox4、ACSL4 和 GPX4 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 5。

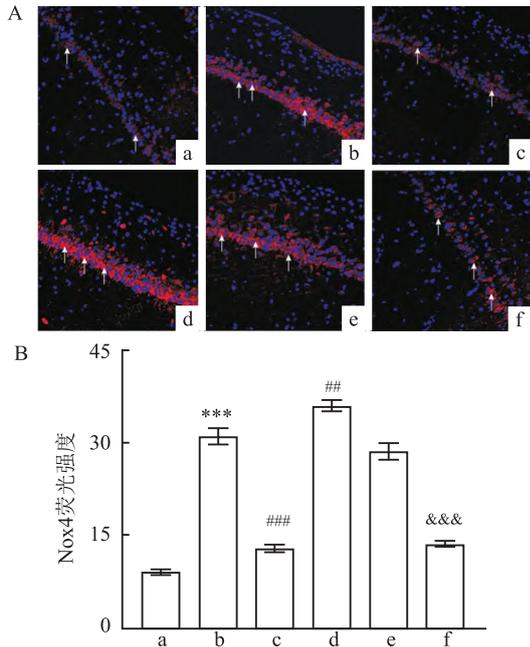


图4 免疫荧光实验检测各组 Nox4 的表达变化

A: Nox4 免疫荧光图 $\times 200$; B: Nox4 荧光表达强度的定量分析; a: Sham 组; b: 手术组; c: PAME 组; d: Nox4 过表达组; e: AAV 空载组; f: PN 组; 与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

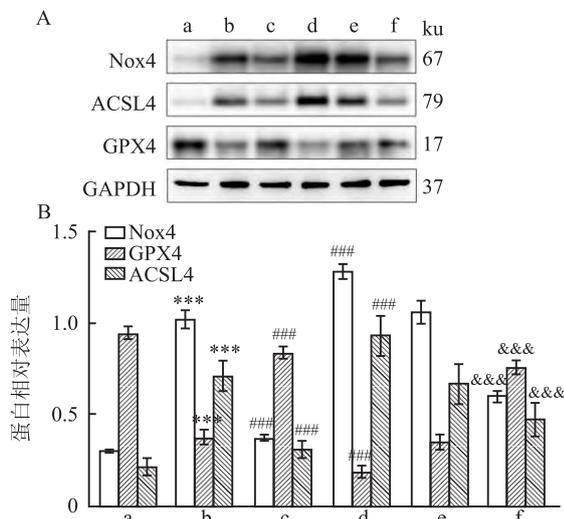


图5 Western blot 实验检测 Nox4、ACSL4、GPX4 的表达变化

A: Nox4、ACSL4、GPX4、GAPDH 蛋白条带; B: Nox4、ACSL4、GPX4 表达水平的定量分析; a: Sham 组; b: 手术组; c: PAME 组; d: Nox4 过表达组; e: AAV 空载组; f: PN 组; 与 Sham 组比较: *** $P < 0.001$; 与手术组比较: ### $P < 0.001$; 与 Nox4 过表达组比较: &&& $P < 0.001$

3 讨论

学习记忆障碍作为围术期常见的并发症,常导

致术后恢复延迟,在“加速康复外科(enhanced recovery after surgery, ERAS)”理念指导下,探讨学习记忆功能障碍的产生机制和改善围术期学习记忆功能受损值得关注并研究。研究^[4-7]证实学习记忆能力障碍与神经炎症和氧化应激有关,而我国传统中药鸡矢藤具有抗炎和抗氧化应激作用,因此其可能具有改善学习记忆障碍的作用。本研究选用鸡矢藤的主要活性物质 PAME 治疗术后学习记忆能力降低的小鼠,发现术后小鼠的认知行为学(Morris 水迷宫实验和条件性恐惧实验)得到了明显改善,这一现象证实了 PAME 能够改善小鼠术后学习记忆功能。

本研究继续探讨 PAME 改善术后小鼠学习记忆功能的机制。研究^[8-9]表明,铁死亡可引起学习记忆功能障碍, Nox4 介导的氧化应激是导致铁死亡的主要原因。PAME 具有抗氧化应激作用,其可能会通过抑制 Nox4 介导的氧化应激减轻铁死亡,改善小鼠术后学习记忆功能障碍。本研究结果显示,手术组小鼠术后海马组织 ROS、铁含量明显增加, Nox4 表达上调,铁死亡标志性蛋白 ACSL4 表达上调, GPX4 表达下调^[13]。这些结果与相关研究^[14]中铁死亡的结果一致,表明术后小鼠学习记忆能力降低的发生与海马组织 Nox4 介导的氧化应激和铁死亡相关。给予 PAME 治疗后,发现术后小鼠海马组织 ROS 和铁含量减少,且海马 Nox4 表达明显受到抑制,同时 ACSL4 生成减少而 GPX4 表达增多。这一现象初步证实了 PAME 可能通过 Nox4 抑制了铁死亡途径,改善了小鼠术后学习记忆功能。

为了进一步证实 PAME 的作用靶点是 Nox4,本研究选用了 Nox4 过表达腺相关病毒这一工具,实现了小鼠海马区 Nox4 的过表达。而 Nox4 过表达会加重氧化应激和铁死亡,与铁死亡相关的 ROS、铁含量及 ACSL4 会明显增加, GPX4 明显降低^[15]。实验结果表明海马 Nox4 过表达后小鼠术后学习记忆损害加重, ROS、铁含量、ACSL4 进一步增加, GPX4 显著降低,提示海马 Nox4 介导的铁死亡可能是小鼠术后发生学习记忆障碍的重要机制。此外,海马 Nox4 过表达后的小鼠给予 PAME 治疗,学习记忆功能改善作用、ROS 及铁含量的抑制作用均受到限制,且 Nox4、ACSL4 表达再次出现增加, GPX4 下调,这一现象证明 PAME 是通过抑制海马 Nox4 从而改变下游铁死亡相关蛋白,抑制了海马氧化应激和铁死亡,进而改善了术后学习记忆功能。

参考文献

- [1] Ge X, Zuo Y, Xie J, et al. A new mechanism of POCD caused by sevoflurane in mice: cognitive impairment induced by cross-dysfunction of iron and glucose metabolism [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(18): 22375–89.
- [2] Ran J, Bai X, Wang R, et al. Role of dexmedetomidine in early POCD in patients undergoing thoracic surgery [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8652028.
- [3] Cui R S, Wang K, Wang Z L. Sevoflurane anesthesia alters cognitive function by activating inflammation and cell death in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(5): 4127–30.
- [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: 134–46.
- [5] Jiang L, Dong R, Xu M, et al. Inhibition of the integrated stress response reverses oxidative stress damage-induced postoperative cognitive dysfunction [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 992869.
- [6] 吕心蕊, 许哲昊, 马颖, 等. 环氧化酶-2 与家兔 UA 及鸡矢藤提取物的干预作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(10): 1504–7, 1512.
- [7] 王绍军, 吴闯, 赵赶. 鸡矢藤提取物对 STZ 致糖尿病小鼠肾脏的氧化应激作用和晚期糖基化终产物的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(15): 1459–62.
- [8] Park M W, Cha H W, Kim J, et al. NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation *via* the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer's diseases [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101947.
- [9] 姚鹏, 陈勇, 李依玲, 等. 海马神经细胞铁死亡通过 Nr12/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(11): 1389–94.
- [10] Chen Y F, Liu D H, Wu Q, et al. Possible mechanism involved in the antinociceptive activity of dimer of paederosidic acid and paederosidic acid methyl ester in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(2): 188–90.
- [11] Zhang Y, Li M, Cui E, et al. Dexmedetomidine attenuates sevoflurane-induced neurocognitive impairment through $\alpha 2$ -adrenoceptors [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 38.
- [12] Vizcaychipi M P, Xu L, Barreto G E, et al. Heat shock protein 72 overexpression prevents early postoperative memory decline after orthopedic surgery under general anesthesia in mice [J]. *Anesthesiology*, 2011, 114(4): 891–900.
- [13] Chen G H, Song C C, Pantopoulos K, et al. Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis *via* the NRF2-ARE pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 95–107.
- [14] Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054–81.
- [15] Zhang X, Song T, Zhao M, et al. Sirtuin 2 alleviates chronic neuropathic pain by suppressing ferroptosis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 827016.

Paederosidic acid methyl ester inhibits hippocampal Nox4-mediated ferroptosis and improves postoperative learning and memory in mice

Liu Tielong, Qi Wenqiang, Jiang Hongyang, Wang Ruixue, Dai Zhigang, Yin Jiangwen
(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the effect of paederosidic acid methyl ester (PAME) on postoperative learning and memory impairment in mice and its mechanism. **Methods** C57BL/6J male mice were randomly divided into Sham group, operation group, operation + PAME group (PAME group), operation + NADPH oxidase 4 (Nox4) adeno-associated virus overexpression group (Nox4 overexpression group), operation + Nox4 adeno-associated virus no-laden group (AAV no-load group), and operation + PAME + Nox4 overexpression group (PN group). Exploratory laparotomy was performed. PAME (20 mg/kg) was administered by continuous gavage for 7 days after operation, and adeno-associated virus was injected into the hippocampus 28 days before operation. Morris water maze test and conditioned fear test were used to detect the learning and memory ability of mice. The expression of Nox4 protein was observed by immunofluorescence. The protein expressions of Nox4, long chain acyl CoA synthetase 4 (ACSL4) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected by Western blot. Reactive oxygen species (ROS) and iron content were determined by spectrophotometry. **Results** Compared with the Sham group, the learning and memory ability of the operation group, the Nox4 overexpression group and the AAV no-load group decreased, the protein expression of Nox4 and ACSL4 increased, the protein expression of GPX4 decreased, and the ROS and iron content increased. After PAME treatment, the postoperative learning and memory ability of mice was improved, and Nox4 and ferroptosis in hippocampal neurons were alleviated. **Conclusion** PAME treatment can improve the learning and memory ability of postoperative mice, which may be related to the inhibition of hippocampal Nox4-mediated ferroptosis.

Key words paederosidic acid methyl ester; learning and memory; NADPH oxidase 4; ferroptosis; hippocampus