

# 乙酰左旋肉碱通过激活Nrf2/GPX4通路抑制神经元铁死亡并促进脊髓损伤修复

席回林<sup>1,2</sup> 吴佳俊<sup>1</sup> 田春平<sup>1</sup> 白心悦<sup>1</sup> 王青燕<sup>1</sup> 何盟泽<sup>1</sup> 杨彦玲<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>延安大学延安医学院, 延安 716000; <sup>2</sup>延安大学附属医院心脑血管医院康复医学科, 延安 716000)

**摘要** 脊髓损伤(SCI)后发生一系列病理过程, 如铁死亡是导致SCI后神经元大量丢失以及功能障碍的重要因素之一。该实验将探究乙酰左旋肉碱(ALC)对于SCI后神经元铁死亡及功能修复的作用及机制。采用HI-0400脊髓打击器打击大鼠脊髓T10节段, 建立大鼠急性SCI模型。采用BBB量表评价运动功能, HE染色观察大鼠脊髓组织形态学变化, 尼氏染色观察大鼠脊髓神经元存活情况。通过检测Nrf2/GPX4信号通路相关分子及铁死亡标志蛋白的表达水平, 并在体外使用PC12细胞评估铁死亡指标(MDA、GSH、Fe<sup>2+</sup>), 探究ALC的作用效果。结果显示, ALC可显著改善SCI大鼠的运动功能及脊髓组织形态; 其机制与上调神经元Nrf2表达进而增强GPX4活性和提高GSH含量, 同时降低脂质过氧化物MDA及Fe<sup>2+</sup>水平有关。Nrf2抑制剂Brusatol可逆转ALC的作用。ALC能促进SCI大鼠运动功能恢复, 其机制主要是通过Nrf2/GPX4信号通路抑制神经元铁死亡, 从而发挥神经保护作用。

**关键词** 脊髓损伤; 铁死亡; Nrf2; 乙酰左旋肉碱

## Acetyl-L-Carnitine Inhibits Neuronal Ferroptosis and Promotes Spinal Cord Injury Repair by Activating the Nrf2/GPX4 Pathway

XI Huilin<sup>1,2</sup>, WU Jiajun<sup>1</sup>, TIAN Chunping<sup>1</sup>, BAI Xinyue<sup>1</sup>, WANG Qingyan<sup>1</sup>, HE Mengze<sup>1</sup>, YANG Yanling<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Yan'an Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China; <sup>2</sup>Rehabilitation Medicine Department, Cardiovascular and Cerebrovascular Hospital, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

**Abstract** After SCI (spinal cord injury), a series of pathological processes occur, such as the serious neuronal ferroptosis, which is one of the important factors leading to functional disorders after SCI. Therefore, this experiment is designed to explore the effect and mechanism of ALC (acetyl-L-carnitine) on neuronal ferroptosis and functional repair after SCI. The HI-0400 spinal cord impactor was used to impact the T10 segment of the spinal cord of rats to establish an acute SCI model in rats. The BBB scale was used to evaluate the motor function, HE staining was used to observe the morphological changes of the spinal cord tissue, and Nissl staining was used to observe the survival of spinal cord neurons. By examining the expression levels of molecules related to the Nrf2/GPX4 signaling pathway and ferroptosis marker proteins, and evaluating ferroptosis indicators (MDA, GSH, Fe<sup>2+</sup>) in PC12 cells *in vitro*, the effects of ALC were investigated. The results showed that ALC could significantly improve motor function

收稿日期: 2025-09-14 接受日期: 2026-01-08

国家自然科学基金(批准号: 82560280)、陕西省科学技术厅一般项目(批准号: 2024SF-YBXM-037)和延安大学教育创新计划(YCX2024102)资助的课题

\*通信作者。Tel: 13891184889, E-mail: yangyanling8889@163.com

Received: September 14, 2025 Accepted: January 8, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82560280), the General Project of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2024SF-YBXM-037), and the Graduate Education Innovation Program of Yan'an University (Grant No.YCX2024102)

\*Corresponding author. Tel: +86-13891184889, E-mail: yangyanling8889@163.com

and spinal cord tissue morphology in SCI rats. Its mechanism is related to upregulating neuronal Nrf2 expression, thereby enhancing GPX4 activity and improving GSH content, while simultaneously reducing lipid peroxidation MDA and Fe<sup>2+</sup> levels. The Nrf2 inhibitor Brusatol could reverse the effect of ALC. ALC promotes the functional recovery in SCI rats, ALC inhibits neuronal ferroptosis through the Nrf2/GPX4 signaling pathway.

**Keywords** spinal cord injury; ferroptosis; Nrf2; acetyl-L-carnitine

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的创伤性神经系统疾病, 残疾率极高且修复困难, 分为创伤性脊髓损伤(traumatic spinal cord injury, TSCI)和非创伤性脊髓损伤(non-traumatic spinal cord injury, NTSCI)<sup>[1]</sup>。TSCI由交通事故、跌倒和运动损伤等原因引起, 而NTSCI主要归因于脊髓炎、椎管内肿瘤和血管畸形等疾病<sup>[2]</sup>。全球范围内, SCI的人数持续上升, 每年约新增20万例患者<sup>[3]</sup>。在中国, TSCI的现患人数超过75万, 每年新增病例约6万余例<sup>[4]</sup>。与此同时, NTSCI的发病率也呈逐年上升趋势, 其中退行性病变已成为主要病因<sup>[5]</sup>。SCI常导致运动、感觉及自主神经功能障碍, 并伴随慢性疼痛、痉挛和内脏功能异常, 严重影响生活质量并带来沉重的医疗负担<sup>[6-7]</sup>。现有治疗主要提供支持性管理, 难以逆转神经损害<sup>[8]</sup>。

从病理上看, SCI由原发性机械损伤及其引发的继发性损伤过程构成, 后者包括缺血、炎症、氧化应激、细胞死亡与瘢痕形成等<sup>[9]</sup>, 是功能恶化的主要原因。近年来, 多种程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)形式被证实参与继发性损伤过程。其中包括经典的凋亡, 以及调控性坏死形式如坏死性凋亡和铁死亡, 此外, 自噬依赖性细胞死亡亦被认为在其中发挥作用<sup>[10]</sup>。因此, 靶向减少神经元死亡被视为改善SCI预后的重要策略<sup>[11]</sup>。

铁死亡是由Fe<sup>2+</sup>和脂质过氧化物过量积累所引起的一种程序性细胞死亡方式<sup>[12]</sup>。其核心机制是谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭或谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活<sup>[13]</sup>, 导致细胞内脂质过氧化失控并最终破坏细胞膜<sup>[14]</sup>。SCI急性期会出现红细胞破裂和大量ROS堆积, 从而造成铁过载并加速铁死亡过程<sup>[15]</sup>。GPX4依赖GSH清除脂质氢过氧化物, 是抑制铁死亡的关键酶<sup>[16-17]</sup>; 而转录因子Nrf2通过上调GPX4等抗氧化基因, 维持细胞的氧化还原平衡<sup>[18]</sup>。

乙酰左旋肉碱(acetyl-L-carnitine, ALC)能够跨越血脑屏障, 具有清除自由基、增强抗氧化酶活性

和保护线粒体等作用<sup>[19]</sup>, 已在多种模型中显示出明显的抗氧化和细胞保护效应<sup>[20-21]</sup>。

因此, 激活Nrf2/GPX4通路并抑制铁死亡, 可能是ALC促进脊髓损伤修复的潜在机制。本研究的科学问题在于: ALC能否通过激活Nrf2/GPX4通路, 抑制SCI后的神经元铁死亡, 从而促进神经修复与功能恢复。本研究的重要意义与创新性体现在首次将ALC的神经保护作用与铁死亡这一细胞死亡模式在SCI背景下联系起来, 并聚焦于Nrf2/GPX4这一具体信号通路进行机制探讨。这不仅为阐明ALC在SCI中的作用提供了新视角, 也为开发以抑制铁死亡为策略的SCI靶向治疗提供了潜在候选方案和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

SD雌性大鼠, 购自西安交通大学, 动物许可证号: SCXK(陕)2018-001。体质量控制控制在(200±20)g。将其置于SPF级动物饲养房中饲养2周, 生活环境为12 h光照和12 h暗室, 饲养期间给予其充足的水和食物, 且动物实验中所涉及操作均已经得到延安大学实验动物伦理委员会的批准(伦理批件为A-2025010号)。

### 1.2 脊髓损伤模型及乙酰左旋肉碱治疗

将实验动物随机分成4组: Sham组、SCI组、SCI+ALC给药组、SCI+ALC+Brusatol组。大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)麻醉。判断大鼠T10位置, 以此为中心上下左右2~6 cm对大鼠进行备皮及消毒。然后暴露脊柱, 分离肌肉, 使用咬骨钳咬除其椎板。脊髓充分暴露后, 将动物固定于脊髓损伤打击器台面, 对T10进行打击, 打击力度设置为200-kilodyne。完成打击后对大鼠进行由内至外的缝合, 进而对大鼠伤口进行消毒。双后肢各注射5 mL生理盐水用以补液, 任意一侧后肢肌肉注射氨苄青霉素钠用以防止感染; 其术后3天内持续进行生理盐水补充与氨苄青霉素。大鼠术后每一只进行单笼单独饲养, 每天进行早中晚人工排尿3次, 定时观察大鼠术后状态。

将SCI+ALC组和SCI+ALC+Brusatol组的大鼠腹腔注射ALC和Brusatol, ALC注射剂量为300 mg/kg, Brusatol的注射剂量为2 mg/kg。SCI模型建立成功后2 h首次进行注射, 每天注射1次, 连续给药3天。

### 1.3 行为学评分

大鼠运动功能学评估采用BBB评分量表<sup>[22]</sup>。满分为21分, 用于评判大鼠下肢各关节活动的情况。在大鼠术前及术后的1天、3天、5天、7天、14天、21天、28天分别进行BBB评分, 评分采用双盲制, 最终分数取平均值计入。

### 1.4 组织制备

SCI后28天, 对大鼠腹腔注射2%的戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)进行麻醉, 然后将其固定在操作台上, 暴露其心脏, 使用生理盐水进行心脏灌注, 直至大鼠四肢及肝脏发白即可。以手术打击点为中心, 上下2 cm截断脊柱, 迅速将脊髓组织冲出, 部分组织用于提蛋白, 部分组织置于4%的多聚甲醛中固定, 并于4 °C条件下固定24 h后用于切片。固定后将组织依次放于梯度乙醇(70%、85%、95%、95%、100%、100%)中进行脱水, 脱水完成后放入二甲苯中至组织透明, 采用包埋机进行石蜡包埋, 最后用石蜡切片机制片。石蜡切片在室温下保存。

### 1.5 HE染色和尼氏染色

利用二甲苯对切片进行脱蜡, 于室温下置于梯度浓度乙醇(100%两次、95%两次、85%)中处理用于脱水, 流水冲洗上述处理好的切片2 min。在室温条件下, 先使用苏木素染色10 min, 蒸馏水冲洗5 s, 接着1%盐酸乙醇分化2 s, 蒸馏水冲洗5 s, 伊红染色30 s。用中性树胶进行封片, 然后自然晾干备用。上述处理好的组织切片尼氏染色液将组织切片染色3~10 min。使用蒸馏水洗涤2次, 每次5 s。最后, 利用光学显微镜观察在同一位置切片的脊髓前角尼氏体数的变化。

### 1.6 蛋白质印迹(Western blot, WB)

将脊髓组织取出, 称取打击点附近0.1 g脊髓组织, 加入PBS缓冲液超声破碎, 后放入预冷的高速离心机, 弃上清, 加入适当的RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂(RIPA:PMSF=100:1)后离心(4 °C、12 000 ×g、30 min), 吸取上清至新离心管中并进行标记, 后进行BCA定量。根据BCA结果确定每组的上样量。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 然后转移到PVDF膜中, 并在室温下与5%脱脂牛奶封闭缓冲液一起孵育2 h。之后, 将膜与一抗在4 °C下孵

育过夜, 一抗包括抗Nrf2(1:1 000, Abcam, ab31163)、抗GPX4(1:1 000, 江苏亲科生物研究中心有限公司, DF6701)、抗xCT(1:1 000, Abcam, ab31163)。将膜与二抗(1:1 000, 武汉博士德生物工程有限公司, BA1060)在室温下孵育2 h, 并通过ECL超敏发光液在化学发光中观察。

### 1.7 qRT-PCR

**1.7.1 脊髓组织提取总RNA** 取打击点附近的组织0.1 g, 置于1.5 mL的EP管中。EP管中加入1 mL的PBS, 使用小剪刀将组织充分剪碎。放入离心机, 离心(4 °C、3 000 r/min、5 min)两次。EP管中加入Trizol、研磨珠后置于组织破碎仪上, 使组织破碎。EP管内加0.2倍体积的氯仿, 混匀后放于冰上, 静置10 min后离心(4 °C、12 000 ×g、15 min); 离心完成后将上层水相移至新的EP管中。加入体积相等的异丙醇, 混匀, 放于冰上静置10 min, 离心(4 °C、12 000 ×g、10 min)。离心完成后, RNA为白色沉淀。加入75%的乙醇进行洗涤, 混匀, 然后离心(4 °C、7 500 ×g、5 min), 弃掉上清。打开管盖, 使RNA晾干。加DEPC水使RNA沉淀溶解, 酶标仪测RNA浓度。

**1.7.2 RNA反转录** 使用Evo M-MLV反转录预混型试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司), 按照去除基因组DNA反应体系配制反应液, 进行基因组DNA去除反应。按照使用说明加入步骤1反应液、5× Evo M-MLVRT Reaction Mix和无酶水, 20 μL体系, 进行反转录反应。

**1.7.3 实时定量PCR** 引物设计见表1。按照qRT-PCR扩增体系, 在八联管中配制反应液。将反应液混匀离心(室温、4 000 r/min、5 s), 放入PCR反应仪中。扩增程序为两步法, 95 °C预变性5 min; 随后95 °C变性10 s, 60 °C退火/延伸30 s, 共40个循环。熔解曲线程序按仪器默认设置执行。

### 1.8 细胞培养

在37 °C和5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中, 用含有10%胎牛血清和0.4%青霉素-链霉素的DMEM培养PC12细胞。PC12细胞分为Control组、Erastin组、Erastin+ALC组、Erastin+ALC+Brusatol组。Erastin浓度为805 nmol/L, ALC浓度为20 μmol/L, Brusatol浓度为5 nmol/L。

### 1.9 细胞活力测定

使用CCK-8测定细胞活力, 评估药物对PC12细胞的毒性。首先, 将PC12细胞接种到96孔板, 每孔

表1 qRT-PCR引物序列  
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
xCT	F	GTC TTC TCC AAT TCG GCA CCA G
	R	ACT CCT CTT CCT CTT GCT GTA GC
GPX4	F	AAT TCG CAG CCA AGG ACA TCG
	R	GCC AGG ATT CGT AAA CCA CAC TC
$\beta$ -actin	F	CAC TAT CGG CAA TGA GCG GTT C
	R	CAG CAC TGT GTT GGC ATA GAG G

5 000个细胞。用不同浓度的药物处理细胞,并在5% CO<sub>2</sub>和37 °C下培养12 h。然后,加入10  $\mu$ L CCK-8溶液并孵育2 h。使用酶标仪在450 nm处测量每个孔中的吸光度(D)值。

### 1.10 MDA测定

动物组织样本制备:称取大约0.1 g组织,加入1 mL提取液进行冰浴匀浆,8 000  $\times$ g、4 °C离心10 min取上清,置冰上待测;细胞样本制备:收集细胞至离心管中,离心后弃掉上清,每5 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞加入1 mL提取液,后超声破碎,8 000  $\times$ g、4 °C离心10 min取上清,置冰上待测;根据MDA检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号BC0020)说明书进行操作,计算MDA含量。

### 1.11 GSH测定

取组织用液氮速冻,然后研成粉末。按照GSH试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号为S0052)中说明依次加入试剂,4 °C放置10 min后,10 000  $\times$ g、4 °C离心10 min,取上清用于总谷胱甘肽的测定。PBS洗涤细胞1次,离心收集细胞,弃掉上清。按照GSH试剂盒说明依次加入试剂,4 °C或冰浴放置5 min。4 °C、10 000  $\times$ g离心10 min。取上清用于总谷胱甘肽的测定。

### 1.12 Fe<sup>2+</sup>测定

称取约0.1 g组织,加入1 mL提取液进行冰浴匀浆。10 000  $\times$ g、4 °C离心10 min,取上清置冰上待测。按照1 $\times$ 10<sup>7</sup>个细胞加入1 mL提取液,冰浴超声波破碎细胞;然后10 000  $\times$ g、4 °C离心10 min,取上清置于冰上待测。按照亚铁离子检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号BC5410)说明书依次操作,计算亚铁离子含量。

### 1.13 统计学分析

本研究所有实验均独立重复3次,结果以GraphPad Prism 8.0软件进行统计学处理和图表绘制。用 $\bar{x}\pm s$ 表示数据结果。独立样本t检验适用

于两组数据之间的比较,两组数据以上的比较使用单因素方差分析(One-Way ANOVA),之后采用Tukey's检验进行比较,若数据不符合方差齐数据或正态分布,则使用非参数检验法进行分析。P值表示数据的统计学意义,其中P<0.05则具有统计学意义。

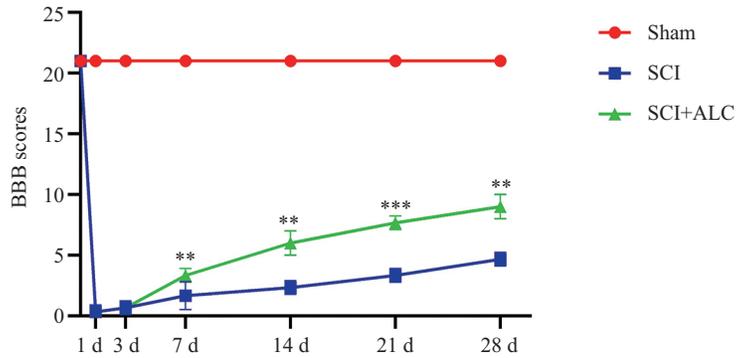
## 2 结果

### 2.1 ALC可以改善脊髓损伤大鼠运动功能和组织形态

对SCI大鼠进行运动功能评定,其结果如图所示(图1)。Sham组只打开T10椎板,对于大鼠的运动功能无影响;SCI后,其运动功能消失,随着术后时间的推移,大鼠的评分开始逐渐上升;SCI+ALC组与SCI组相比,前3天其运动功能基本丧失,从第3天开始,给药组评分开始高于SCI组,其功能恢复要更快,从第7天开始,出现明显的统计学差异(P<0.01);对组织切片进行HE染色(图2)。Sham组染色结果可见蝴蝶形对称结构,形态完整,神经元胞体饱满,中央管闭合完整;SCI组打击点有明显损伤,组织破碎,灰质白质边界模糊,神经元细胞核固缩、核碎裂;与SCI组相比,ALC给药组可见打击点附近组织较紧密,神经元存活数目多,结构较完整;尼氏染色来观察脊髓中神经元的变化(图3)。Sham组可见灰质神经元排列紧密,尼氏体丰富,均匀分布并且结构完整;SCI组可见神经元稀疏,密度降低,尼氏体溶解或消失,表明神经元损伤;与SCI组相比,ALC给药组可见神经元排列紧密,尼氏体的数目变多。

### 2.2 ALC通过增加Nrf2的表达水平来保护神经元

Nrf2是一种重要的抗氧化应激转录因子,我们使用WB检测了脊髓损伤以及给药后Nrf2蛋白的表达变化(图4)。结果发现,与Sham相比,SCI后



$n=5$ ; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与SCI组比较。

$n=5$ ; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the SCI group.

图1 各组大鼠BBB评分结果  
Fig.1 BBB scores of rats in each group

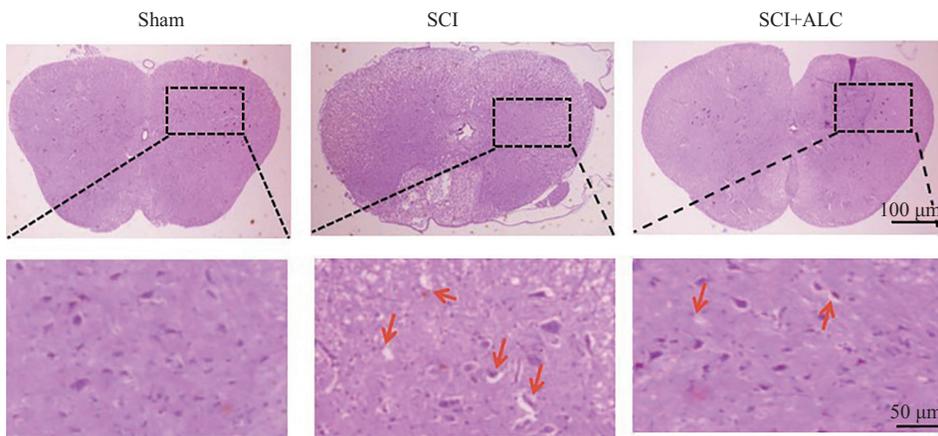


图2 脊髓损伤大鼠28天后组织形态学变化  
Fig.2 Histological changes in spinal cord injury rats at 28 days post-injury

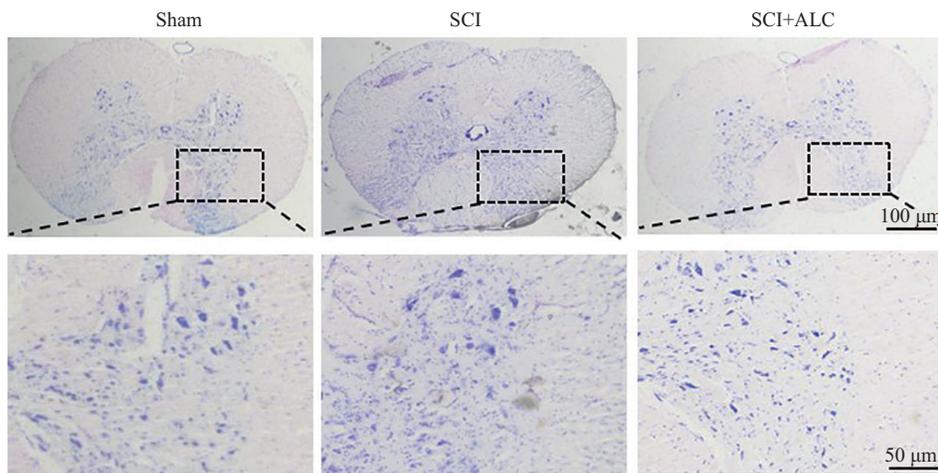


图3 脊髓损伤大鼠28天后神经元变化  
Fig.3 Neuronal changes in the rat spinal cord at 28 days post-injury

Nrf2蛋白的表达水平降低, 具有显著的统计学意义 ( $P<0.001$ )。ALC给药后, 与SCI组相比, Nrf2蛋白的表达水平升高, 具有明显的统计学意义 ( $P<0.01$ )。这

表明ALC可以促进SCI大鼠脊髓中Nrf2蛋白的表达。

### 2.3 ALC抑制Erastin诱导PC12细胞铁死亡

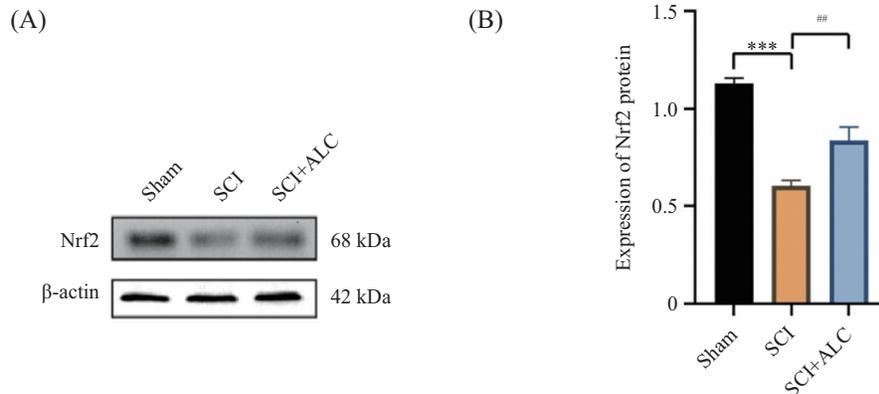
WB结果(图5)发现, 与Control组相比, Erastin组

的PC12细胞GPX4、xCT蛋白表达含量均有不同程度的降低, Erastin组的PC12细胞GPX4、xCT蛋白表达较Control组具有显著的统计学差异( $P<0.001$ ); 相较于Erastin组, Erastin+ALC组的PC12细胞GPX4、xCT蛋白表达含量均有不同程度的升高, Erastin组GPX4、xCT蛋白表达较Erastin+ALC组具有统计学

意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

#### 2.4 ALC可以改善Erastin诱导PC12细胞的形态

显微镜下如图6所示, 正常组PC12细胞大小均一, 细胞饱满, 轮廓清晰, 折光性强, 细胞贴壁紧密, Erastin组正常细胞数量明显减少, 细胞大小不一, 呈圆形, 细胞肿胀, 折光率差, Erastin+ALC组干预后正

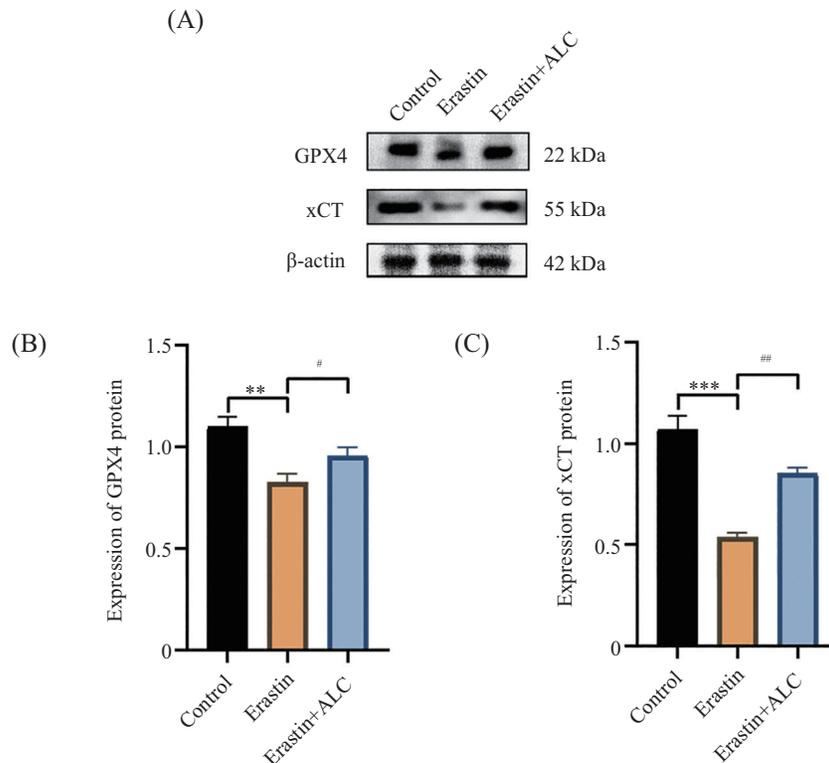


A: 蛋白印迹检测脊髓损伤大鼠脊髓中Nrf2蛋白水平; B: 脊髓损伤大鼠脊髓中Nrf2蛋白表达情况。n=3, \*\*\* $P<0.001$ , # $P<0.01$ 。

A: Western blot detection of Nrf2 protein in the spinal cord of rats with spinal cord injury; B: expression of Nrf2 protein in the spinal cord of rats with spinal cord injury. n=3, \*\*\* $P<0.001$ , # $P<0.01$ 。

图4 脊髓损伤后3天大鼠脊髓组织中Nrf2蛋白的变化

Fig.4 Nrf2 protein expression in rat spinal cord tissue at 3 days post-injury



A: Erastin诱导PC12细胞铁死亡后GPX4、xCT蛋白的表达情况; B: GPX4蛋白的相对表达水平统计图; C: xCT蛋白的相对表达水平统计图。n=3; \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ; # $P<0.05$ , # $P<0.01$ 。

A: expression of GPX4 and xCT proteins in PC12 cells after Erastin-induced ferroptosis; B: statistical chart of the relative expression level of GPX4 protein; C: statistical graph of the relative expression level of xCT protein. n=3; \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ; # $P<0.05$ , # $P<0.01$ 。

图5 Erastin诱导PC12细胞铁死亡后GPX4、xCT蛋白的变化

Fig.5 Changes in GPX4 and xCT proteins after Erastin-induced ferroptosis in PC12 cells

常细胞数量增加,细胞形态明显改善,折光率增加。

## 2.5 ALC通过Nrf2-GPX4通路抑制Erastin诱导PC12细胞铁死亡

为了探究ALC是否通过Nrf2-GPX4通路抑制铁死亡,我们设置了4个分组:Control组、Erastin组、Erastin+ALC组、Erastin+ALC+Brusatol组。并进行WB实验(图7)。与Erastin+ALC组相比,Erastin+ALC+Brusatol组的Nrf2蛋白表达量降低,具有统计学意义( $P<0.05$ ),表明Brusatol起到了抑制Nrf2的作用。WB实验结果表明,xCT、GPX4蛋白在Erastin诱导PC12细胞铁死亡后表达量降低,具有显著的统计学意义( $P<0.001$ ),ALC干预后其表达量上升,给予Nrf2抑制剂Brusatol后,xCT、GPX4蛋白的表达量较Erastin+ALC组下降,具有统计学意义( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ )。这说明ALC通过Nrf2,调控xCT、GPX4蛋白的表达,从而抑制铁死亡。

## 2.6 ALC可以抑制SCI后细胞铁死亡

WB实验结果发现(图8A~图8C),与正常组相比,SCI后铁死亡相关蛋白xCT和GPX4表达量降低,具有明显的统计学意义( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ );ALC给药后,与SCI组相比,增加了大鼠脊髓组织中铁死亡相关蛋白xCT、GPX4蛋白的表达,具有统计学意义( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。这表明ALC可以促进SCI大鼠脊髓组织中铁死亡相关蛋白xCT、GPX4蛋白的表达。

铁死亡的特征是亚铁离子的积累、脂质过氧化以及谷胱甘肽的消耗。我们设置了3个分组:Sham组、SCI组、SCI+ALC组,进行测定(图8D~图8F)。与Sham组相比,SCI组MDA、 $Fe^{2+}$ 含量上升,具有统计学差异( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ );与SCI组相比,SCI+ALC组MDA、 $Fe^{2+}$ 含量下降,具有统计学意义( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。与Sham组相比,SCI组

GSH含量降低,具有统计学差异( $P<0.001$ );与SCI组相比,SCI+ALC组GSH含量上升,具有统计学差异( $P<0.01$ )。结果表明,ALC可以逆转亚铁离子的积累、脂质过氧化以及谷胱甘肽的消耗。

qRT-PCR结果(图8G和图8H)表明,与Sham组相比,SCI组GPX4和xCT的mRNA水平下降,具有显著的统计学意义( $P<0.001$ );ALC给药后,SCI大鼠脊髓组织GPX4、xCT的mRNA表达水平升高,具有统计学意义( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。这表明ALC可以增加SCI后铁死亡相关蛋白xCT、GPX4的mRNA表达水平。

## 2.7 ALC通过Nrf2-GPX4通路抑制铁死亡促进SCI修复

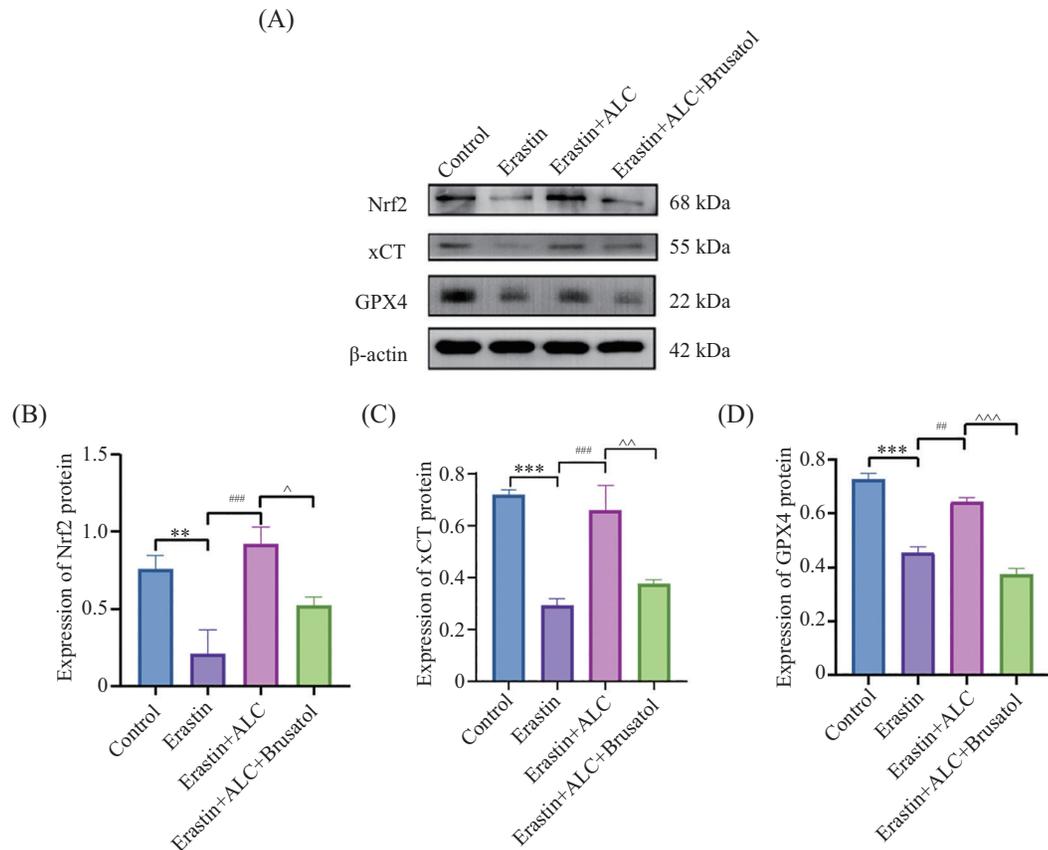
为了探究ALC是否通过Nrf2-GPX4通路抑制铁死亡,我们设置了4个分组:Sham组、SCI组、SCI+ALC组、SCI+ALC+Brusatol组。SCI+ALC+Brusatol组大鼠连续注射Brusatol 3天,并进行WB实验(图9)。与SCI+ALC组相比,SCI+ALC+Brusatol组的Nrf2蛋白表达量降低,具有统计学意义( $P<0.05$ ),表明Brusatol起到了抑制Nrf2的作用。WB实验结果表明,xCT、GPX4蛋白在SCI后表达量降低,具有统计学意义( $P<0.05$ ),ALC干预后其表达量上升,给予Nrf2抑制剂Brusatol后,xCT、GPX4蛋白的表达量较SCI+ALC组下降,具有统计学意义( $P<0.05$ )。这说明ALC通过Nrf2,调控xCT、GPX4蛋白的表达,从而抑制铁死亡。

免疫荧光双标结果(图10和图11)显示,SCI后损伤区NeuN阳性神经元中Nrf2及GPX4表达水平显著下降。ALC处理显著提升了神经元内Nrf2和GPX4的表达水平,并恢复了Nrf2的核定位。Brusatol处理能部分阻断ALC对Nrf2与GPX4的增强作用。定量分析进一步证实ALC可上调神经元中Nrf2与GPX4



图6 显微镜观察Erastin诱导PC12细胞铁死亡后细胞形态的变化

Fig.6 Changes in cell morphology of PC12 cells after Erastin-induced ferroptosis observed under a microscope



A: Nrf2抑制剂Brusatol对PC12细胞铁死亡蛋白Nrf2、xCT和GPX4蛋白表达的影响; B: Brusatol对Nrf2蛋白表达的影响; C: Brusatol对xCT蛋白表达的影响; D: Brusatol对GPX4蛋白表达的影响;  $n=3$ ; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; # $P<0.01$ , ### $P<0.001$ ; ^ $P<0.05$ , ^^ $P<0.01$ , ^^ $P<0.001$ 。

A: effects of the Nrf2 inhibitor Brusatol on the expression of ferroptosis-related proteins Nrf2, xCT, and GPX4 in PC12 cells; B: effect of Brusatol on Nrf2 protein expression; C: effect of Brusatol on xCT protein expression; D: effect of Brusatol on GPX4 protein expression;  $n=3$ ; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; # $P<0.01$ , ### $P<0.001$ ; ^ $P<0.05$ , ^^ $P<0.01$ , ^^ $P<0.001$ 。

图7 Nrf2抑制剂Brusatol对PC12细胞铁死亡相关蛋白的影响

Fig.7 Effect of the Nrf2 inhibitor Brusatol on ferroptosis-related proteins in PC12 cells

蛋白的表达 ( $P<0.05$ ), 提示 ALC通过促进神经元内 Nrf2-GPX4轴发挥抗铁死亡作用。

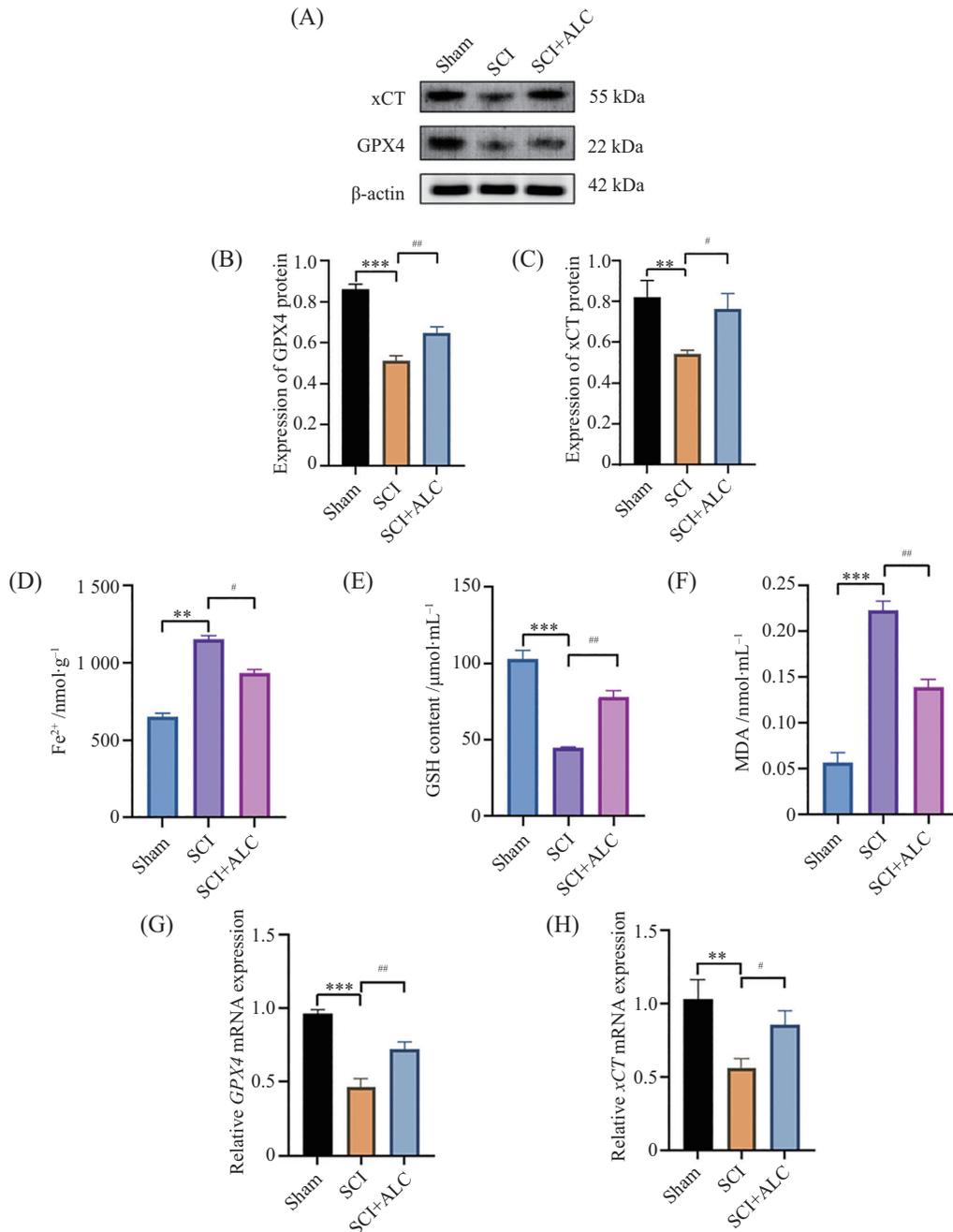
### 3 讨论

SCI后原发性损伤导致不可逆的细胞损伤和组织坏死, 脊髓组织中病理改变引起继发性损伤, 继发性损伤是神经功能不可逆恶化的关键阶段, 其中包括氧化应激、炎症反应、兴奋性毒性及铁稳态失衡等一系列复杂病理过程<sup>[23]</sup>。近年来, 铁死亡作为一种铁依赖性的细胞死亡方式被逐渐证实参与SCI急性期与亚急性期的神经损伤, 并可导致神经元大量丢失、脂质过氧化加剧以及神经网络重构受限。因此, 靶向调控铁死亡有望成为SCI继发性损伤干预的重要策略。

本研究系统评估了ALC对SCI后铁死亡的影响。我们首先发现, SCI后大鼠脊髓组织中铁死亡相

关蛋白GPX4在术后第3天下降最显著, 这一时相特征与既往研究报道的铁死亡高峰一致<sup>[24]</sup>, 从而验证了本研究取样时间点的合理性。在此基础上, ALC显著降低了 $Fe^{2+}$ 及脂质过氧化产物MDA的水平, 同时提高了GSH含量, 这些结果表明ALC能够有效阻断铁死亡典型特征, 如铁沉积与脂质过氧化<sup>[25-26]</sup>。

铁死亡的核心调控轴之一是System xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4系统, 该系统通过介导胱氨酸摄取, 为GSH合成提供前体, 进而维持GPX4活性以消除脂质过氧化物<sup>[27-28]</sup>。我们发现, ALC不仅上调了xCT与GPX4的表达, 还显著提高了组织内GSH水平, 说明ALC能够维持该抗铁死亡轴的完整性。值得注意的是, 已有研究表明, 调控GSH生物合成的多种关键酶受Nrf2直接调控, 而GPX4也是Nrf2的重要靶基因<sup>[29-30]</sup>。因此, 结合本研究的蛋白表达变化, 我们推测ALC可能通过激活Nrf2信号通路发挥抑制铁死亡的作用<sup>[31]</sup>。



A: 脊髓损伤大鼠铁死亡相关蛋白表达变化; B: 脊髓损伤大鼠铁死亡相关蛋白GPX4表达情况; C: 脊髓损伤大鼠铁死亡相关蛋白xCT表达情况; D: 脊髓损伤大鼠Fe<sup>2+</sup>表达变化; E: 脊髓损伤大鼠GSH表达变化; F: 脊髓损伤大鼠MDA表达变化; G: 脊髓损伤大鼠GPX4的mRNA表达情况; H: 脊髓损伤大鼠xCT的mRNA表达情况; n=3; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01。

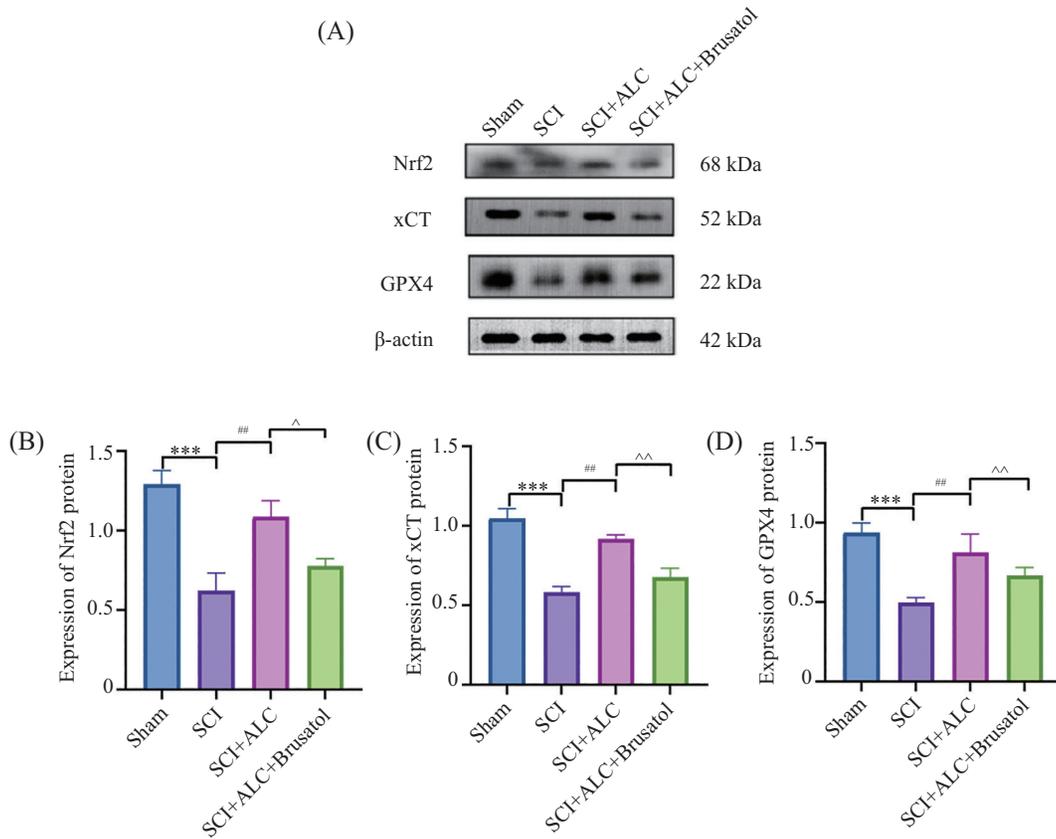
A: changes in ferroptosis-related protein expression in spinal cord-injured rats; B: expression of the ferroptosis-related protein GPX4 in spinal cord-injured rats; C: expression of the ferroptosis-related protein xCT in spinal cord-injured rats; D: changes in Fe<sup>2+</sup> expression in spinal cord-injured rats; E: changes in GSH expression in spinal cord-injured rats; F: changes in MDA expression in spinal cord-injured rats; G: mRNA expression of GPX4 in spinal cord-injured rats; H: mRNA expression of xCT in spinal cord-injured rats; n=3; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01.

图8 脊髓损伤大鼠铁死亡相关蛋白、mRNAs及铁死亡特征指标变化

Fig.8 Changes in ferroptosis-related proteins, mRNAs, and ferroptosis characteristic indicators in rats with spinal cord injury

为进一步验证这一假设,本研究补充进行了Nrf2-NeuN与GPX4-NeuN的免疫荧光双标实验。结果显示,SCI后神经元中Nrf2核定位信号减弱,而ALC显著增强了神经元Nrf2信号并上调了神经元中

的GPX4表达,提示ALC的保护效应在很大程度上直接作用于神经元。更重要的是,当使用Nrf2抑制剂Brusatol时,ALC对xCT与GPX4的促进作用被明显逆转,进一步佐证了ALC通过Nrf2-GPX4轴抑制铁死

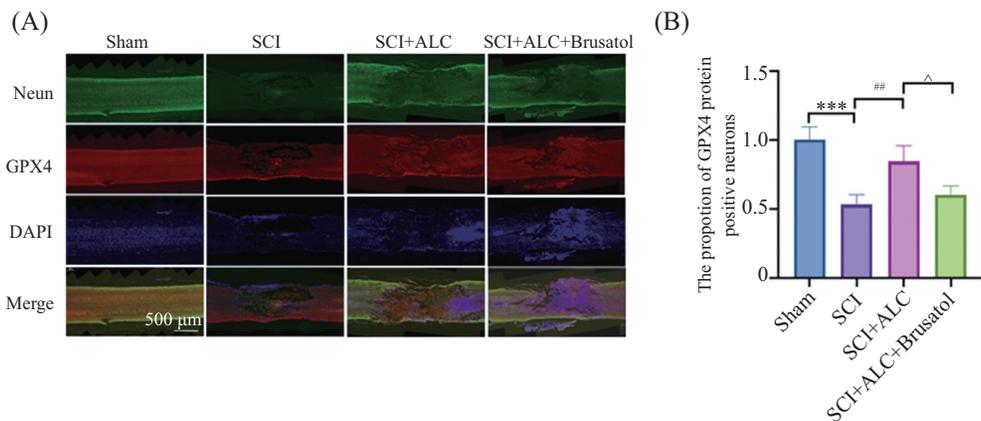


A: Nrf2抑制剂Brusatol对脊髓损伤大鼠Nrf2、GPX4、xCT蛋白的影响; B: 脊髓损伤大鼠Nrf2蛋白的表达; C: 脊髓损伤大鼠xCT蛋白的表达; D: 脊髓损伤大鼠GPX4蛋白的表达;  $n=3$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ## $P<0.01$ ; ^ $P<0.05$ , ^^ $P<0.01$ 。

A: effects of the Nrf2 inhibitor Brusatol on Nrf2, GPX4, and xCT proteins in rats with spinal cord injury; B: expression of Nrf2 protein in rats with spinal cord injury; C: expression of xCT protein in rats with spinal cord injury; D: expression of GPX4 protein in rats with spinal cord injury;  $n=3$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ## $P<0.01$ ; ^ $P<0.05$ , ^^ $P<0.01$ .

图9 Nrf2抑制剂Brusatol对脊髓损伤大鼠铁死亡相关蛋白的影响

Fig.9 Effects of Nrf2 inhibitor Brusatol on ferroptosis-related proteins in rats with spinal cord injury

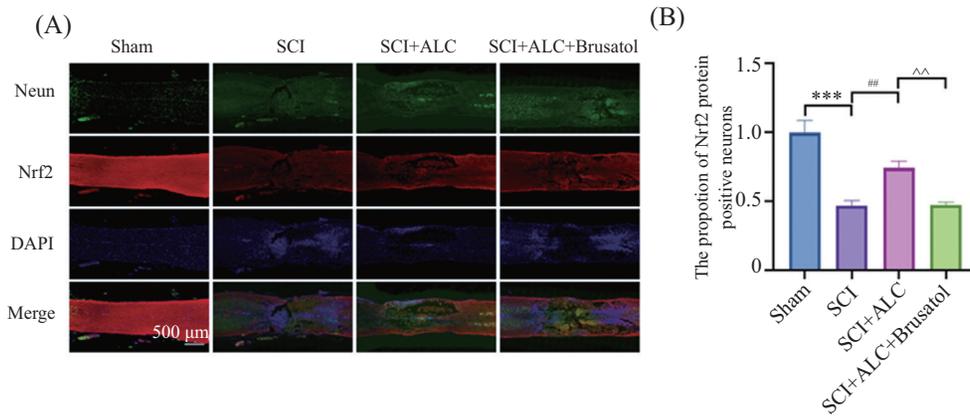


A: 脊髓组织中铁死亡蛋白GPX4在神经元中的表达变化; B: 脊髓组织中铁死亡蛋白GPX4在神经元中的表达统计图。  $n=3$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ## $P<0.01$ ; ^ $P<0.05$ 。

A: changes in the expression of ferroptosis protein GPX4 in neurons within spinal cord tissue; B: statistical chart of GPX4 expression in neurons within spinal cord tissue.  $n=3$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ## $P<0.01$ ; ^ $P<0.05$ .

图10 免疫荧光检测脊髓损伤神经元的铁死亡

Fig.10 Immunofluorescence detection of ferroptosis in spinal cord injury neurons



A: 脊髓组织中Nrf2蛋白在神经元中的表达变化; B: 脊髓组织中Nrf2蛋白在神经元中的表达统计图。n=3; \*\*\*P<0.001; #P<0.01; ^^P<0.01。

A: changes in Nrf2 protein expression in neurons within spinal cord tissue; B: statistical chart of Nrf2 protein expression in neurons within spinal cord tissue. n=3; \*\*\*P<0.001; #P<0.01; ^^P<0.01.

图11 免疫荧光检测Nrf2在神经元中的表达变化

Fig.11 Immunofluorescence detection of changes in Nrf2 expression in neurons

亡的关键作用,因此,以上实验结果说明了ALC通过Nrf2-GPX4通路抑制神经元铁死亡,从而促进脊髓损伤修复。

值得注意的是,铁死亡不仅发生于神经元,亦可能广泛存在于少突胶质细胞、星形胶质细胞乃至小胶质细胞中<sup>[32]</sup>。这些细胞类型在SCI炎症调控、髓鞘修复中具有重要地位。尽管本研究通过神经元特异性的双标实验明确了ALC对神经元铁死亡的直接保护作用,但其对其他神经胶质细胞铁死亡的影响仍有待进一步证实。此外,本研究存在一定局限性。实验设计中未单独设立“SCI+Brusatol”组,因此无法完全排除该抑制剂本身对病理的潜在非特异性影响。尽管联合给药组蛋白未进一步恶化,且文献支持该剂量下Brusatol主要发挥通路抑制作用<sup>[33-35]</sup>,但仍需在未来研究中通过设置独立对照组以提供更严谨的因果证据。

总体来看,本研究从行为学、组织学、细胞实验到机制验证层面系统证实了ALC能够显著促进SCI后神经功能恢复,其机制主要是通过激活Nrf2-GPX4信号通路,抑制神经元铁死亡,从而减轻继发性损伤。这一发现不仅为SCI治疗提供了新的理论依据,也提示了ALC可能成为未来临床上可探索的神经保护候选药物。然而,铁死亡的调控网络复杂,后续研究仍需进一步明确ALC对多种细胞类型的作用,以及其在不同损伤阶段、不同剂量和给药方案下的长期效果。

### 参考文献 (References)

[1] GUAN B, ANDERSON D B, CHEN L, et al. Global, regional

and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. *BMJ Open*, 2023, 13(10): e75049.

- [2] GOLESTANI A, SHOBEIRI P, SADEGHI-NAINI M, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries from 2009 to 2020: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neuroepidemiology*, 2022, 56(4): 219-39.
- [3] GILBERT E, LIVINGSTON J, GARCIA-FLORES E, et al. Metformin improves functional outcomes, activates neural precursor cells, and modulates microglia in a sex-dependent manner after spinal cord injury [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2023, 12(6): 415-28.
- [4] JIANG B, SUN D, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and external causes of traumatic spinal cord injury in china: a nationally representative cross-sectional survey [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 784647.
- [5] CHOI Y, LEIGH J H, JEON J, et al. Trends in the incidence and etiology of non-traumatic spinal cord injury in korea: a nationwide population-based study from 2007 to 2020 [J]. *J Korean Med Sci*, 2023, 38(18): e158.
- [6] PAN H, DING M, ZHU L, et al. A national cross-sectional survey on community spinal cord injury individuals profiles, health-related quality of life and support services in China: implications for healthcare and rehabilitation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2024, 25(1): 761.
- [7] CRISPO J, KURAMOTO L K, CRAGG J J. Global burden of spinal cord injury: future directions [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(11): 976-8.
- [8] GRIJALVA-OTERO I, DONCEL-PÉREZ E. Traumatic human spinal cord injury: are single treatments enough to solve the problem [J]? *Arch Med Res*, 2024, 55(1): 102935.
- [9] HU X, XU W, REN Y, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 245.
- [10] SHI Z, YUAN S, SHI L, et al. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(3): e12992.

- [11] SONG Q, CUI Q, SUN S, et al. Crosstalk between cell death and spinal cord injury: neurology and therapy [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(12): 10271-87.
- [12] HUANG Y, BAI J. Ferroptosis in the neurovascular unit after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2024, 381: 114943.
- [13] WANG F, HE J, XING R, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and their role in inflammation [J]. *Int Rev Immunol*, 2023, 42(1): 71-81.
- [14] JANG S, CHAPA-DUBOCQ X R, TYURINA Y Y, et al. Elucidating the contribution of mitochondrial glutathione to ferroptosis in cardiomyocytes [J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102021.
- [15] WANG Z, WU Z, XIE Z, et al. Metformin attenuates ferroptosis and promotes functional recovery of spinal cord injury [J]. *World Neurosurg*, 2022, 167: e929-39.
- [16] FENG Z, MIN L, CHEN H, et al. Iron overload in the motor cortex induces neuronal ferroptosis following spinal cord injury [J]. *Redox Biol*, 2021, 43: 101984.
- [17] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-92.
- [18] YUAN Y, ZHAI Y, CHEN J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923.
- [19] SARZI-PUTTINI P, GIORGI V, DI LASCIO S, et al. Acetyl-L-carnitine in chronic pain: a narrative review [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 173: 105874.
- [20] HAORAH J, FLOREANI N A, KNIPE B, et al. Stabilization of superoxide dismutase by acetyl-L-carnitine in human brain endothelium during alcohol exposure: novel protective approach [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(8): 1601-9.
- [21] BAYRAK S, AKTAŞ S, ALTUN Z, et al. Antioxidant effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin-induced cardiotoxicity [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(8): 1220750945.
- [22] CHENG J, ZHANG R, XU Z, et al. Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 129.
- [23] ANJUM A, YAZID M D, FAUZI D M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7533.
- [24] NI C, YE Q, MI X, et al. Resveratrol inhibits ferroptosis via activating NRF2/GPX4 pathway in mice with spinal cord injury [J]. *Microsc Res Tech*, 2023, 86(10): 1378-90.
- [25] CHEN Y, LIU S, LI J, et al. The latest view on the mechanism of ferroptosis and its research progress in spinal cord injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6375938.
- [26] WEN R J, DONG X, ZHUANG H W, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154881.
- [27] WU Y, JIA Q, TANG Q, et al. Berberine-mediated ferroptosis through system Xc(-)/GSH/GPX4 axis inhibits metastasis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cancer*, 2024, 15(3): 685-98.
- [28] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116512.
- [29] SHI Y, XU N, LIU B, et al. Mifepristone protects acetaminophen induced liver injury through NRF2/GSH/GST mediated ferroptosis suppression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 222: 229-43.
- [30] WANG Y, YAN S, LIU X, et al. PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(10): 1982-95.
- [31] YANG S P, YANG X Z, CAO G P. Acetyl-L-carnitine prevents homocysteine-induced suppression of Nrf2/Keap1 mediated anti-oxidation in human lens epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1145-50.
- [32] NOBUTA H, YANG N, NG Y H, et al. Oligodendrocyte death in Pelizaeus-Merzbacher disease is rescued by iron chelation [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(4): 531-41.
- [33] YANG T, LIU H, YANG C, et al. Galangin attenuates myocardial ischemic reperfusion-induced ferroptosis by targeting Nrf2/Gpx4 signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2495-511.
- [34] GE M, TIAN H, MAO L, et al. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(9): 1023-40.
- [35] HUANG J, ZHAO Y, LUO X, et al. Dexmedetomidine inhibits ferroptosis and attenuates sepsis-induced acute kidney injury via activating the Nrf2/SLC7A11/FSP1/CoQ10 pathway [J]. *Redox Rep*, 2024, 29(1): 2430929.