

SLC31A1 通过调控线粒体自噬抑制铜死亡减轻氧糖剥夺诱导的 PC12 细胞损伤

方 洋¹, 王梓同¹, 熊敬仪², 王朝晖¹

(1. 武汉科技大学附属汉阳医院神经内二科, 武汉 430000; 2. 武汉科技大学附属汉阳医院血透科, 武汉 430000)

【摘要】目的:探究溶质载体家族 31 成员 1 (solute carrier family 31 member 1, SLC31A1) 通过调控线粒体自噬对氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 诱导的 PC12 细胞铜死亡及细胞损伤的影响, 明确其在脑卒中病理过程中的作用机制。**方法:**以 PC12 细胞为研究对象, 构建 OGD 诱导的脑卒中细胞模型, 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8 assay, CCK-8) 法、乳酸脱氢酶释放法 (lactate dehydrogenase release assay, LDH) 验证模型有效性; 构建 SLC31A1 沉默 (si-SLC31A1) 与过表达 (pcDNA3.1-SLC31A1) 细胞模型, 通过逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法 (Western blot, WB) 验证干预效率; 分别采用 RT-PCR、WB、比色法、酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测线粒体自噬相关指标 [自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG) 5、ATG12、Parkin、PTEN 诱导假定的激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、P62]、铜死亡相关指标 [细胞内铜离子浓度、氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽 (oxidized glutathione/reduced glutathione, GSSG/GSH) 比值、脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase, DLD) 表达] 及氧化应激指标 [超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量]。**结果:**OGD 处理降低 PC12 细胞活力, 升高 LDH 释放率 ($P < 0.05$), 表明模型构建成功; SLC31A1 过表达上调线粒体自噬相关基因 (ATG5、ATG12、Parkin、PINK1) 信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达及 LC3-II/LC3-I 比值, 下调 P62 表达 ($P < 0.05$), 沉默 SLC31A1 则呈相反趋势; SLC31A1 过表达降低细胞内铜离子浓度、GSSG/GSH 比值 ($P < 0.05$); ACSL4、DLD 蛋白表达呈下降趋势, 但差异无统计学意义, 同时提升 SOD 活性, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$), 沉默 SLC31A1 则加剧铜死亡与氧化应激 ($P < 0.05$)。**结论:**SLC31A1 可通过激活线粒体自噬, 减少细胞内游离铜离子积累, 抑制铜死亡进程, 同时改善氧化应激损伤, 最终减轻 OGD 诱导的 PC12 细胞损伤, 为缺血性脑卒中的机制研究及治疗靶点开发提供实验依据。

【关键词】溶质载体家族 31 成员 1; 线粒体自噬; 铜死亡; 氧糖剥夺; PC12 细胞; 缺血性脑卒中

【中图分类号】R743

【文献标志码】A

Solute carrier family 31 member 1 alleviates oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cell injury by regulating mitophagy and inhibiting cuproptosis

Fang Yang¹, Wang Zitong¹, Xiong Yuyi², Wang Zhaohui¹

(1. Second Department of Neurology, Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology;
2. Department of Hemodialysis, Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of solute carrier family 31 member 1 (SLC31A1) on cuproptosis and injury of PC12 cells induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) by regulating mitophagy, and to clarify its mechanism of action in the pathological process of stroke. **Methods:** PC12 cells were used to construct a cell model of OGD-induced stroke, and CCK-8 assay and lactate dehydrogenase (LDH) release assay were used to verify model effectiveness. The cell models of SLC31A1 silencing (si-SLC31A1) and overexpression (pcDNA3.1-SLC31A1) were constructed, and RT-PCR and Western blot (WB) were used to verify intervention efficiency; RT-PCR, WB, colorimetry, and ELISA were used to measure mitophagy-related indicators [autophagy-related protein 5 (ATG5), autophagy-related protein 12 (ATG12), Parkin, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), microtubule-associated protein light chain 3B (LC3B), and P62], cuproptosis-related indicators [intracellular copper ions, oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio, acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), and dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD)], and oxidative stress indicators [superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA)]. **Results:** OGD treatment significantly reduced the viability of PC12 cells and increased LDH release rate ($P < 0.05$), suggesting that the model was constructed successfully. Overexpression of SLC31A1 upregulated the mRNA expression levels of mitophagy-related genes (ATG5, ATG12, Parkin, and PINK1) and the LC3-II/LC3-I ratio, and downregulated P62 expression ($P < 0.05$), while silencing of SLC31A1 showed the opposite trend. Overexpression of

作者介绍: 方 洋, Email: Fang13163265455@163.com,

研究方向: 缺血性脑血管病及神经介入方向。

通信作者: 王朝晖, Email: 758055600@qq.com。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260421.2121.006>

(2026-04-22)

SLC31A1 significantly reduced the concentration of copper ions and GSSG/GSH ratio ($P<0.05$), whereas ACSL4 and DLD protein levels showed a decreasing trend without statistical significance. SLC31A1 overexpression also increased SOD activity and reduced MDA content ($P<0.05$); silencing of SLC31A1 exacerbated cuproptosis and oxidative stress ($P<0.05$). **Conclusion:** SLC31A1 can alleviate OGD-induced PC12 cell injury by activating mitophagy, reducing the accumulation of free copper ions, inhibiting cuproptosis, and improving oxidative stress injury, which provides an experimental basis for research on the mechanism of ischemic stroke and the development of therapeutic targets.

[Key words] solute carrier family 31 member 1; mitophagy; cuproptosis; oxygen-glucose deprivation; PC12 cells; ischemic stroke

缺血性脑卒中占脑卒中总发病率的 70% 以上^[1-2],其高致残率与高复发率给社会和家庭带来沉重负担,临床核心治疗手段重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)静脉溶栓受限于狭窄的治疗时间窗和出血风险,仅少数患者获益^[3-5]。缺血缺氧微环境可直接诱发线粒体功能紊乱,促使受损线粒体释放活性氧(reactive oxygen species, ROS)和游离铜离子,一方面引发氧化应激,另一方面导致细胞内铜离子异常积累,进而激活脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)介导的铜死亡,最终加剧神经细胞死亡,这一病理链条已成为脑卒中损伤的关键机制^[3-4]。铜死亡依赖细胞内铜离子异常积累、谷胱甘肽(oxidized glutathione/reduced glutathione, GSSG/GSH)抗氧化系统耗竭及 ACSL4 介导的脂质过氧化^[6-7],推测其可能参与脑卒中神经细胞损伤;而线粒体自噬可通过 Parkin/PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)通路清除受损线粒体^[8-9],进而减少 ROS 和线粒体来源铜离子的释放,发挥神经保护作用,但二者调控关系尚未明确。溶质载体家族 31 成员 1 (solute carrier family 31 member 1, SLC31A1)[铜转运蛋白 1 (copper transporter 1, CTR1)]作为介导细胞铜离子跨膜摄取与转运的关键蛋白,其功能研究目前集中于铜代谢异常相关疾病^[10],在脑卒中中的作用及机制尚未见报道。基于此,本研究推测 SLC31A1 可能通过调控线粒体自噬影响铜死亡,参与神经细胞损伤的调控。

PC12 细胞具有神经元样表型,对缺血缺氧的应激反应与神经细胞高度相似,且培养稳定性高、实验重复性好,是脑卒中研究中常用的经典细胞系^[11-12]。因此,本研究以 PC12 细胞为神经细胞模型,构建氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)诱导的脑卒中细胞模型,通过 SLC31A1 沉默与过表达干预,结合分子生物学检测技术,检测线粒体自噬、铜死亡及氧化应激相关指标,明确 SLC31A1 对

OGD 诱导的细胞损伤的调控效应及相关作用机制,为缺血性脑卒中的机制研究及潜在治疗靶点开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 永生化大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞(购自中国科学院上海细胞库,编号:SCSP-504)。

1.1.2 主要试剂 细胞培养试剂:高糖杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)(Gibco, 货号 11965-092)、低糖 DMEM 培养基(Gibco, 货号 11885-084)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco, 货号 10099-141)、青霉素-链霉素双抗(Gibco, 货号 15140-122); OGD 模型相关试剂:厌氧培养袋(Thermo Scientific, 货号 260101);转染试剂:Lipofectamine 3000 (Invitrogen, 货号 L3000015)、小干扰核糖核酸(small interfering ribonucleic acid, siRNA)及质粒; SLC31A1 小干扰 RNA (si-SLC31A1)、阴性对照 siRNA (si-NC)、pcDNA3.1-SLC31A1 过表达质粒及空载体 pcDNA3.1 (均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成, si-SLC31A1 靶序列:5'-GCAATGTCAGAGTACCTCA-3');检测试剂盒:细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8 assay, CCK-8) 细胞活力检测试剂盒(碧云天, 货号 C0037)、乳酸脱氢酶释放法(lactate dehydrogenase release assay, LDH)细胞毒性检测试剂盒(碧云天, 货号 C0016)、总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 货号 9767)、逆转录试剂盒(TaKaRa, 货号 RR047A)、SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa, 货号 RR820A)、放射免疫沉淀分析(radioimmunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)蛋白裂解液(碧云天, 货号 P0013B)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(碧云天, 货号 P0010)、细胞内铜离子检测试剂盒(Solarbio, 货号 BC4410)、GSSG/GSH 检测试剂盒(Solarbio, 货号 BC1170)、ACSL4 酶联免疫吸附测定试剂盒(enzyme-linked immunosorbent assay kit, ELISA)(Abcam, 货号 ab289883)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, DLD) ELISA 试剂盒(Abcam, 货号 ab273210)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(碧云天, 货号 S0101)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒(碧云天, 货号 S0131);抗体:兔抗大鼠 SLC31A1 多克隆抗体(Abcam, 货号 ab180777)、兔抗大鼠自噬相关蛋白(autophagy-related protein, ATG)5 多克隆抗体(CST, 货号 12994S)、兔抗大鼠 ATG12 多克隆抗体

(CST, 货号 4180S)、兔抗大鼠 Parkin 多克隆抗体 (CST, 货号 2132S)、兔抗大鼠 PINK1 多克隆抗体 (CST, 货号 62325S)、兔抗大鼠微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 多克隆抗体 (CST, 货号 2775S)、兔抗大鼠 P62 多克隆抗体 (CST, 货号 5114S)、鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体 (碧云天, 货号 AF0003)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) (碧云天, 货号 A0208)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG (碧云天, 货号 A0216)。

1.2 实验方法

1.2.1 PC12 细胞培养与传代 PC12 细胞置于含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。当细胞融合度达 80%~90% 时进行传代: 弃去旧培养基, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 1~2 min, 待细胞变圆脱壁后, 加入含血清的培养基终止消化, 吹打制成单细胞悬液, 按 1:3 比例接种至新培养瓶, 继续培养。

1.2.2 OGD 脑卒中细胞模型构建与验证 参考既往研究构建模型^[11-12]: 取对数生长期 PC12 细胞, 接种于 96 孔板 (用于活力/毒性检测) 或 6 孔板 (用于后续指标检测), 待细胞融合度达 70% 后, 弃去高糖培养基, 用无糖 PBS 洗涤 3 次, 更换为低糖 DMEM 培养基 (不含葡萄糖、血清), 随后将培养板放入含厌氧培养袋的密封培养盒中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h (预实验验证 12 h 为 OGD 诱导 PC12 细胞损伤的最佳时间点), 构建缺血缺氧模型, 即氧糖剥夺组 (OGD 组); 正常对照组 (Control 组) 始终用高糖培养基在常氧环境中培养。

模型验证: CCK-8 法检测细胞活力: OGD 处理结束后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (absorbance, A) 值, 细胞相对活力 = (OGD 组 A 值 / Control 组 A 值) $\times$ 100%; LDH 释放法检测细胞损伤: 收集各组细胞培养上清液, 按 LDH 试剂盒说明书操作, 在 490 nm 波长处检测 A 值, 细胞 LDH 释放率 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (最大释放组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times$ 100%。

1.2.3 SLC31A1 干预体系构建与效率验证 细胞转染: 取对数生长期 PC12 细胞, 接种于 6 孔板, 待融合度达 50%~60% 时进行转染。分为 4 组: si-NC 组 (转染 si-NC)、si-SLC31A1 组 (转染 si-SLC31A1)、pcDNA3.1 组 (转染空载体)、pcDNA3.1-SLC31A1 组 (转染过表达质粒)。参考质粒构建公司的推荐浓度, 使用 pcDNA3.1-SLC31A1 过表达质粒, 浓度为 1 μ g/ μ L, si-SLC31A1 及 si-NC 的工作浓度均为 50 nmol/L。按 Lipofectamine 3000 说明书操作: 将 2 μ g 质粒或 50 nmol/L siRNA 与转染试剂混合, 室温孵育 15 min 后, 加入细胞培养体系, 37 °C 培养 48 h 后进行后续实验。

干预效率验证: 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 SLC31A1 信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达: 采用总 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA, 用紫外分光光度计检测 RNA 纯度 (A260/A280 比值为 1.8~2.0) 与浓度。按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA), 以 cDNA 为模

板进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法计算 SLC31A1 mRNA 相对表达量。SLC31A1 引物信息如下: 上游引物: 5'-ACAGTGCTGCACATCATCCA-3', 下游引物: 5'-CATCACTGACCCAGAACCCC-3'。

蛋白质免疫印迹法 (Western blot, WB) 检测 SLC31A1 蛋白表达: 收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样本进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转印至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF), 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入一抗 (SLC31A1 抗体 1:1 000 稀释, β -actin 抗体 1:5 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, 含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 洗涤 3 次后, 加入二抗 (1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色, 用 ImageJ 软件分析条带灰度值, SLC31A1 蛋白相对表达量 = (SLC31A1 条带灰度值 / β -actin 条带灰度值)。

1.2.4 线粒体自噬相关基因检测 采用 RT-PCR 法检测线粒体自噬相关基因 (ATG5、ATG12、Parkin、PINK1) mRNA 表达。总 RNA 提取、逆转录及 PCR 扩增步骤同 1.2.3 项, 引物序列由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, 引物信息如下: ATG5 上游引物: 5'-AGAAGCTGTTCGTCCTGTG-3', 下游引物: 5'-GTTTCCACTCTCCAGCCGAA-3'; ATG12 上游引物: 5'-AAACGTGAGCCAAGGGGATT-3', 下游引物: 5'-ACGCCAGGTAAGAATGCACA-3'; Parkin 上游引物: 5'-ACACGAGCATCTTCCAGCTC-3', 下游引物: 5'-GCAGTCTGGAGATTGGCACT-3'; PINK1 上游引物: 5'-GCCTTGCCAACCCCTTCTAT-3', 下游引物: 5'-CTGTTTGCTGAACCCAAGGC-3'。

1.2.5 铜死亡相关指标检测 ① 比色法检测细胞内铜离子浓度: 收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液裂解, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。按铜离子检测试剂盒说明书操作, 在 620 nm 波长处检测 A 值, 根据标准曲线计算细胞内铜离子浓度。② 比色法检测 GSSG/GSH 比值: 收集各组细胞, 按 GSSG/GSH 试剂盒说明书提取细胞内谷胱甘肽, 在 412 nm 波长处检测 A 值, 计算 GSSG/GSH 比值 (该比值反映细胞氧化还原状态, 比值升高提示氧化应激增强)。③ ELISA 检测 ACSL4、DLD 蛋白浓度: 收集各组细胞经裂解处理后的细胞裂解液上清, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 分别在 450 nm 波长处检测 ACSL4 和 DLD 的 A 值, 根据标准曲线计算蛋白浓度。

1.2.6 氧化应激指标检测 ① 比色法检测 SOD 活性: 收集各组细胞, 裂解后取上清液, 按 SOD 试剂盒说明书操作, 在 560 nm 波长处检测 A 值。② 比色法检测 MDA 含量: 收集各组细胞, 裂解后取上清液, 按 MDA 试剂盒说明书操作, 在 532 nm 波长处检测 A 值, 根据标准曲线计算 MDA 含量。

1.3 统计学方法

所有实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析与统计图绘制, 符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用非配对 *t* 检验, 多

组间比较根据实验设计分别采用单因素或双因素方差分析,且所有方差分析后均采用Tukey's多重比较检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PC12细胞 OGD 模型的建立与验证

CCK-8 法检测显示,Control 组细胞活力维持在较高水平,OGD 组细胞相对活力明显降低($P<0.001$,表 1);LDH 释放法检测显示,Control 组细胞 LDH 释放率处于低水平,而 OGD 组 LDH 释放率明显升高($P<0.001$,表 1)。形态学观察显示,Control 组细胞贴壁良好、形态规则,呈多边形或梭形,突起完整且清晰;OGD 组细胞贴壁能力下降,细胞数量减少,细胞肿胀或脱落,部分细胞破裂(图 1A);细胞活死染色结果显示,Control 组以绿色荧光(活细胞)为主,仅见少量红色荧光(死细胞),而 OGD 组红色荧光占比明显增加,活细胞占比大幅降低(图 1B);流式细胞术检测显示,OGD 组细胞凋亡率较 Control 组明显升高(图 1C)。

表 1 OGD 诱导 PC12 细胞损伤模型验证指标($\bar{x} \pm s$)		
组别	细胞相对活力(%)	LDH 释放率(%)
Control 组	100.00 $\pm$ 0.20	5.63 $\pm$ 1.32
OGD 组	53.93 $\pm$ 2.82	46.87 $\pm$ 1.08
<i>t</i> 值	28.270	41.940
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.2 SLC31A1 干预体系的构建与效率验证

图 2A 结果显示:相差显微镜下,转染前 pcDNA3.1 组与 si-NC 组细胞形态均一、贴壁良好;转染 48 h 后 2 组细胞仍保持规则形态与良好贴壁性,未出现皱缩、脱壁等损伤特征。图 2B 显示:荧光显微镜下,转染后各组均呈现较强的荧光信号表明转染效率良好。分子水平检测结果(图 2C、表 2、表 3)显示,与 si-NC 组或 pcDNA3.1 组相比,si-SLC31A1 组的 SLC31A1 mRNA 相对表达量明显降低,而 pcDNA3.1-SLC31A1 组的 SLC31A1 mRNA 相对表达量明显升高。

2.3 SLC31A1 对 OGD 细胞线粒体自噬的调控作用

基因层面,RT-PCR 检测线粒体自噬相关基因(ATG5、ATG12、Parkin、PINK1)表达显示(表 4):与 Control 组相比,经 OGD 处理的 pcDNA3.1 组、si-NC 组明显提高了线粒体自噬相关基因的表达水平;相应的,与经 OGD 处理的 pcDNA3.1

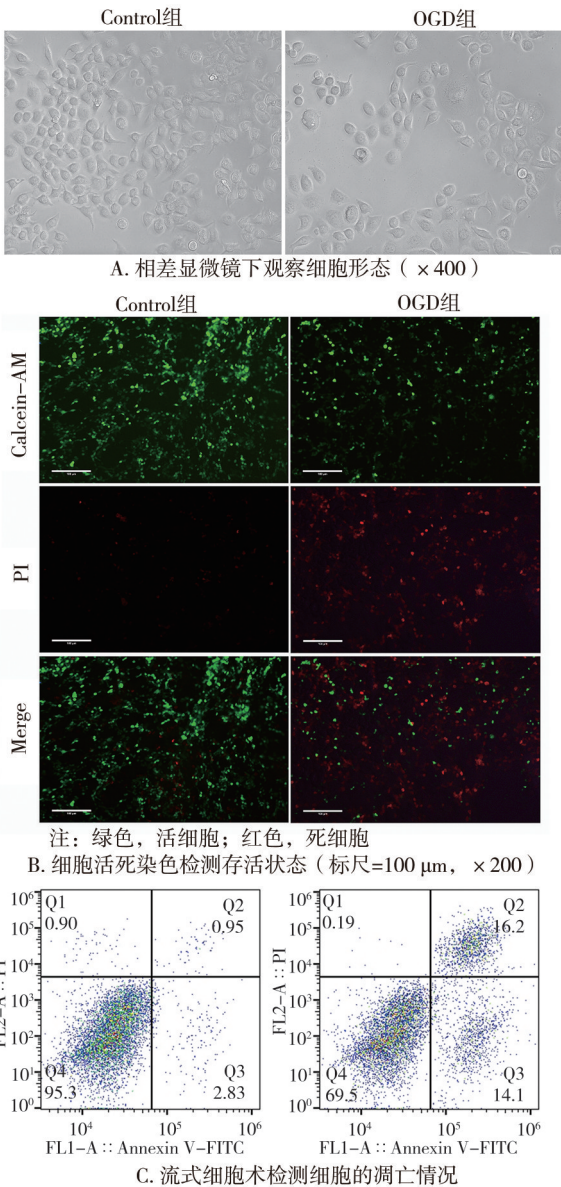


图 1 OGD 诱导 PC12 细胞损伤模型的建立与验证

组相比,经 OGD 处理的 pcDNA3.1-SLC31A1 组 ATG5、ATG12、Parkin、PINK1 mRNA 相对表达量均明显升高。类似地,与经 OGD 处理的 si-NC 相比,经 OGD 处理的 si-SLC31A1 组上述基因 mRNA 相对表达量均降低。

表 2 各组 SLC31A1 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)				
项目	si-NC 组	si-SLC31A1 组	pcDNA3.1 组	pcDNA3.1-SLC31A1 组
SLC31A1 mRNA	1.00 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.03	4.14 $\pm$ 0.23
<i>t</i> 值		28.370		23.880
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001

表 3 各组 SLC31A1 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)				
项目	si-NC 组	si-SLC31A1 组	pcDNA3.1 组	pcDNA3.1-SLC31A1 组
SLC31A1 蛋白	1.00 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.09	2.63 $\pm$ 0.21
<i>t</i> 值		13.890		15.370
<i>P</i> 值		<0.001		<0.001

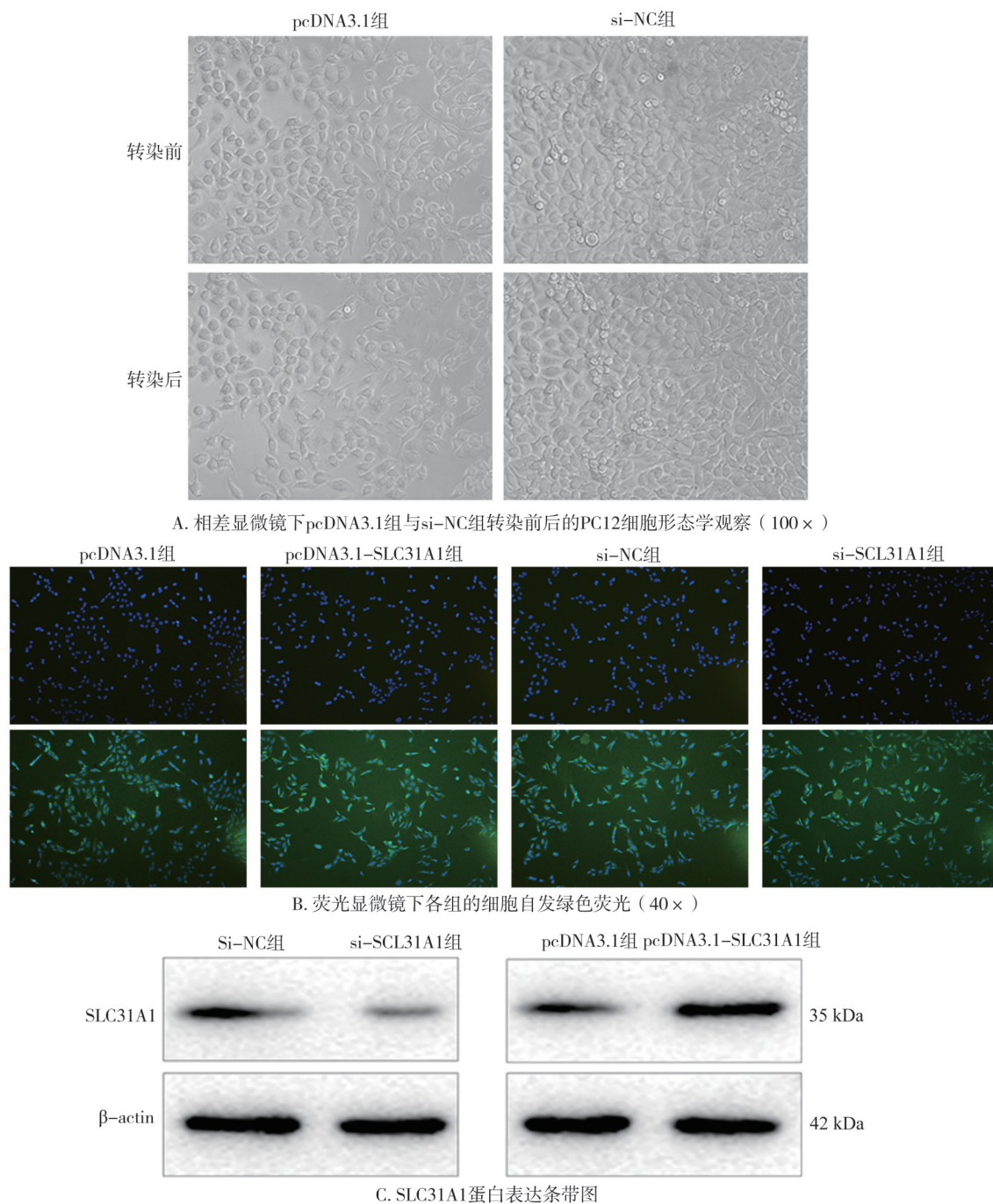


图2 SLC31A1 沉默与过表达干预体系的效率验证

蛋白层面, WB 检测线粒体自噬标志蛋白(LC3B- I / II 、 P62) 显示(图 3、表 5): 与 Control 组相比, 经 OGD 处理的 pcDNA3.1 组、si-NC 组的 LC3- II/LC3- I 比值明显升高, P62/ β -actin 比值明显降低; 进一步, 与经 OGD 处理的 pcDNA3.1 组相比, 经 OGD 处理的 pcDNA3.1-SLC31A1 组 LC3- II/LC3-I 比值明显升高, 而 P62/ β -actin 比值明显降低; 与经 OGD 处理的 si-NC 组相比, 经 OGD 处理的 si-SLC31A1 组呈现相反趋势, 即 LC3- II/LC3-I 比值明显降低, P62/ β -actin 比值明显升高。

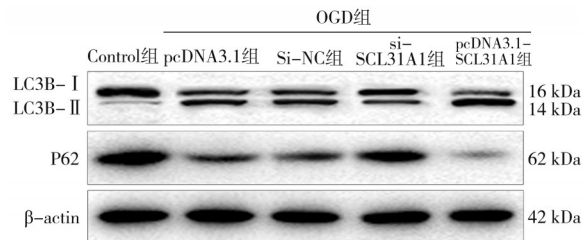


图3 自噬标志蛋白(LC3B、P62)表达代表性条带图

2.4 SLC31A1 对 OGD 细胞铜死亡的抑制作用

比色法检测细胞内铜离子浓度与 GSSG/GSH 比值(表 6)

表 4 SLC31A1 对 OGD 处理后 PC12 细胞线粒体自噬相关基因 mRNA 相对表达量的影响

指标	组别(Tukey's 多重比较检验)	均值 1	均值 2	均值差值	q 值	P 值
ATG5	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	1.00 ± 0.08	4.68 ± 0.25	-3.68	27.690	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	1.00 ± 0.08	4.70 ± 0.26	-3.70	27.807	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.00 ± 0.08	2.60 ± 0.15	-1.60	12.040	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.00 ± 0.08	7.02 ± 0.32	-6.02	45.283	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	4.68 ± 0.25	7.02 ± 0.32	-2.34	17.610	<0.001
	OGD 组+si-NC vs. OGD+si-SLC31A1 组	4.70 ± 0.26	2.60 ± 0.15	2.10	15.776	<0.001
ATG12	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	1.01 ± 0.07	3.60 ± 0.20	-2.59	17.022	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	1.01 ± 0.07	3.57 ± 0.19	-2.57	16.837	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.01 ± 0.07	1.68 ± 0.11	-0.67	4.418	0.070
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.01 ± 0.07	5.53 ± 0.28	-4.52	29.683	<0.001
	OGD 组+pcDNA3.1 vs. OGD 组+pcDNA3.1-SLC31A1 组	3.60 ± 0.20	5.53 ± 0.28	-1.93	12.668	<0.001
	OGD 组+si-NC vs. OGD+si-SLC31A1 组	3.57 ± 0.19	1.68 ± 0.11	1.89	12.425	<0.001
Parkin	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	1.01 ± 0.06	1.83 ± 0.12	-0.82	6.354	0.010
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	1.01 ± 0.06	1.91 ± 0.13	-0.91	7.017	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.01 ± 0.06	1.53 ± 0.10	-0.52	4.020	0.100
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.01 ± 0.06	2.45 ± 0.16	-1.44	11.121	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.83 ± 0.12	2.45 ± 0.16	-0.62	4.787	0.040
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.91 ± 0.13	1.53 ± 0.10	0.39	2.999	0.280
PINK1	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	1.00 ± 0.05	1.55 ± 0.09	-0.55	8.832	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	1.00 ± 0.05	1.47 ± 0.08	-0.47	7.530	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.00 ± 0.05	1.25 ± 0.07	-0.25	4.078	0.090
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.00 ± 0.05	1.92 ± 0.11	-0.91	14.760	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.55 ± 0.09	1.92 ± 0.11	-0.37	5.938	0.011
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.47 ± 0.08	1.25 ± 0.07	0.21	3.456	0.182

注:均值 1 为对比组别的前者,均值 2 为对比组别的后者

表 5 SLC31A1 对 OGD 处理后 PC12 细胞线粒体自噬相关关键蛋白相对表达量的影响

指标	组别(Tukey's 多重比较检验)	均值 1	均值 2	均值差值	q 值	P 值
LC3B- II /LC3- I	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	0.19 ± 0.03	0.94 ± 0.12	-0.75	15.597	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	0.19 ± 0.03	0.93 ± 0.12	-0.74	15.442	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	0.19 ± 0.03	0.51 ± 0.08	-0.33	6.806	0.010
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	0.19 ± 0.03	1.75 ± 0.20	-1.56	32.547	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	0.94 ± 0.12	1.75 ± 0.20	-0.81	16.957	<0.001
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	0.93 ± 0.12	0.51 ± 0.08	0.41	8.659	<0.001
P62	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	0.96 ± 0.10	0.52 ± 0.07	0.44	17.891	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	0.96 ± 0.10	0.52 ± 0.07	0.43	17.560	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	0.96 ± 0.10	0.76 ± 0.09	0.20	7.923	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	0.96 ± 0.10	0.29 ± 0.04	0.67	27.057	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	0.52 ± 0.07	0.29 ± 0.04	0.23	9.160	<0.001
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	0.52 ± 0.07	0.76 ± 0.09	-0.24	9.659	<0.001

注:均值 1 为对比组别的前者,均值 2 为对比组别的后者

显示:与 Control 组相比,经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组及 si-NC 细胞内铜离子浓度明显升高,同时 GSSG/GSH 比值明显提高。进一步,与经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组相比,经 OGD 干预的 pcDNA3.1-SLC31A1 组细胞内铜离子浓度进一步降低,同时,GSSG/GSH 比值亦进一步降低;与经 OGD 干预的 si-NC 组相比,经 OGD 干预的 si-SLC31A1 组细胞内铜离子浓度明显升高,GSSG/GSH 比值亦明显升高。

ELISA 检测铜相关蛋白 ACSL4 和 DLD 表达(表 6)显示:与 Control 组相比,经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组和经 OGD 干预的 si-NC 组 ACSL4 及 DLD 蛋白水平均明显升高;经 OGD 干预的 pcDNA3.1-SLC31A1 组 ACSL4、DLD 蛋白水平较经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组均呈下降趋势,但差异无统计学意义,而经 OGD 干预的 si-SLC31A1 组 ACSL4、DLD 蛋白水平明显高于经 OGD 干预的 si-NC 组。

2.5 SLC31A1 对 OGD 细胞氧化应激的改善作用

与 Control 组相比,经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组及经 OGD 干预的 si-NC 组的 SOD 活性明显降低,而 MDA 含量明显升高,提示 OGD 处理可破坏细胞氧化应激平衡,加剧氧化损

伤;与经 OGD 干预的 pcDNA3.1 组相比,经 OGD 干预的 pcDNA3.1-SLC31A1 组 SOD 活性明显升高,MDA 含量明显降低;与经 OGD 干预的 si-NC 组相比,经 OGD 干预的 si-SLC31A1 组 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高。见表 7。

表 6 SLC31A1 对 OGD 处理后 PC12 细胞铜死亡相关指标的影响

指标	比较组别(Tukey's 多重比较检验)	均值 1	均值 2	均值差值	q 值	P 值 ^a
铜离子($\mu\text{mol/g}$)	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	3.67 ± 0.42	8.65 ± 0.95	-4.98	25.716	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	3.67 ± 0.42	8.70 ± 0.96	-5.03	26.000	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	3.67 ± 0.42	11.90 ± 1.28	-8.23	42.511	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	3.67 ± 0.42	5.41 ± 0.60	-1.74	8.963	<0.001
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	8.65 ± 0.95	5.41 ± 0.60	3.24	16.757	<0.001
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	8.70 ± 0.96	11.90 ± 1.28	-3.20	16.512	<0.001
GSSG/GSH	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	1.00 ± 0.09	1.78 ± 0.18	-0.78	10.429	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	1.00 ± 0.09	1.80 ± 0.19	-0.80	10.700	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.00 ± 0.09	2.45 ± 0.25	-1.45	19.334	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.00 ± 0.09	1.42 ± 0.14	-0.42	5.573	0.018
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.78 ± 0.18	1.42 ± 0.14	0.36	4.852	0.040
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.80 ± 0.19	2.45 ± 0.25	-0.65	8.631	<0.001
ACSL4(pg/mL)	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	26.35 ± 2.80	46.25 ± 4.80	-19.90	9.522	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	26.35 ± 2.80	45.64 ± 4.75	-19.29	9.230	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	26.35 ± 2.80	58.24 ± 6.00	-31.89	15.251	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	26.35 ± 2.80	37.88 ± 3.90	-11.53	5.520	0.019
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	46.25 ± 4.80	37.88 ± 3.90	8.37	4.005	0.102
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	45.64 ± 4.75	58.24 ± 6.00	-12.60	6.039	0.011
DLD(pg/mL)	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	4.55 ± 0.50	12.43 ± 1.30	-7.88	11.435	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	4.55 ± 0.50	13.14 ± 1.38	-8.58	12.456	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	4.55 ± 0.50	26.61 ± 2.80	-22.06	31.982	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	4.55 ± 0.50	9.33 ± 0.98	-4.78	6.938	0.004
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	12.43 ± 1.30	9.33 ± 0.98	3.10	4.501	0.059
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	13.14 ± 1.38	26.61 ± 2.80	-13.47	19.541	<0.001

注:均值 1 为对比组别的前者,均值 2 为对比组别的后者;a,校正后 P 值

表 7 SLC31A1 对 OGD 处理后 PC12 细胞氧化应激相关指标的影响

指标	比较组别(Tukey's 多重比较检验)	均值 1	均值 2	均值差值	q 值	P 值 ^a
SOD(U/mg)	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	183.00 ± 14.60	104.30 ± 8.30	78.66	11.264	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	183.00 ± 14.60	106.50 ± 8.50	76.42	10.947	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	183.00 ± 14.60	69.05 ± 5.50	113.90	16.314	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	183.00 ± 14.60	147.60 ± 11.80	35.40	5.075	0.032
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	104.30 ± 8.30	147.60 ± 11.80	-43.26	6.195	0.009
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	106.50 ± 8.50	69.05 ± 5.50	37.50	5.377	0.023
MDA($\mu\text{mol/g}$)	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1 组	0.79 ± 0.07	1.75 ± 0.16	-0.96	13.293	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-NC 组	0.79 ± 0.07	1.80 ± 0.17	-1.02	14.054	<0.001
	Control 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	0.79 ± 0.07	2.68 ± 0.25	-1.90	26.164	<0.001
	Control 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	0.79 ± 0.07	1.37 ± 0.13	-0.58	8.058	0.002
	OGD+pcDNA3.1 组 vs. OGD+pcDNA3.1-SLC31A1 组	1.75 ± 0.16	1.37 ± 0.13	0.38	5.243	0.026
	OGD+si-NC 组 vs. OGD+si-SLC31A1 组	1.80 ± 0.17	2.68 ± 0.25	-0.88	12.106	<0.001

注:均值 1 为对比组别的前者,均值 2 为对比组别的后者;a,校正后 P 值

3 讨 论

缺血性脑卒中的核心病理机制在于缺血缺氧微环境诱导的神经细胞不可逆损伤^[13],线粒体功能紊乱与氧化应激的异常激活是关键环节^[14-15],而线粒体自噬作为重要的神经保护机制^[16],其与铜死亡之间的调控关系尚不明确。本研究以 PC12 细胞为神经细胞模型,通过 OGD 成功模拟脑卒中缺血缺氧环境,经多指标验证模型构建成功,同时构建 SLC31A1 沉默与过表达细胞模型,为后续机制研究奠定基础。结果证实,SLC31A1 可通过激活线粒体自噬,抑制铜死亡及氧化应激,最终减轻缺血缺氧诱导的神经细胞损伤,这一发现为缺血性脑卒中的病理机制研究提供了新视角,也为潜在治疗靶点的开发提供了实验依据。

结果表明,OGD 处理后 PC12 细胞的线粒体自噬水平呈代偿性升高,同时伴随铜死亡通路激活与氧化应激损伤加剧,而 SLC31A1 的表达状态直接调控这一病理进程:SLC31A1 过表达可增强线粒体自噬活性,同时减少铜离子蓄积和氧化应激产物生成,并使铜死亡相关蛋白 ACSL4、DLD 表达呈下降趋势;反之,SLC31A1 沉默则会削弱线粒体自噬的保护作用,加重铜死亡与氧化损伤。这一结果证实 SLC31A1 在线粒体自噬、铜死亡、氧化应激调控网络中发挥核心枢纽作用,说明靶向调控 SLC31A1 表达可能成为同步干预多通路损伤的潜在策略,为后续机制研究与治疗方案设计提供了实验依据。

缺血缺氧引发的神经细胞损伤是多通路参与的复杂病理过程,其中铜稳态失衡、线粒体功能紊乱与程序性细胞死亡的相互作用是关键环节^[17-18]。SLC31A1 作为介导细胞铜离子跨膜摄取的核心转运蛋白,其主要功能是维持细胞内铜稳态,而铜离子过量积累会生成大量活性氧,诱发蛋白毒性应激和线粒体呼吸功能障碍,最终启动铜死亡程序^[19]。本研究发现,SLC31A1 过表达可明显降低 OGD 诱导的胞内铜离子蓄积,这与 SLC31A1 调控铜离子转运、避免细胞内过量铜离子滞留的功能一致。更重要的是,本研究揭示了 SLC31A1 通过线粒体自噬抑制铜死亡的关键调控机制。线粒体自噬作为选择性自噬的重要形式,可通过 PINK1/Parkin 通路特异性清除受损线粒体,减少线粒体来源的铜离子释放和活性氧生成^[19],从而阻断线粒体损伤-铜过载-氧化应激-铜死亡的恶性循环。实验结果显示,SLC31A1 过表达可上调 ATG5、ATG12、Parkin、

PINK1 等线粒体自噬关键分子的表达,同时降低自噬底物 P62 水平,提示 SLC31A1 可能通过激活 PINK1/Parkin 通路增强线粒体自噬,进而减少受损线粒体介导的铜死亡。

当前关于缺血性脑卒中的研究多集中于经典细胞死亡方式,铜死亡作为程序性细胞死亡,其在脑卒中中的调控机制尚未完全阐明。现有研究证实铜稳态失调可通过诱发氧化应激、线粒体功能障碍促进动脉粥样硬化和血栓形成,与缺血性脑卒中的发生发展密切相关,但调控这一过程的关键分子仍不明确^[20]。本研究首次将 SLC31A1 与缺血性脑卒中的铜死亡调控关联起来,填补了 SLC31A1 在神经保护领域的研究空白。此前 SLC31A1 的功能研究多集中于肿瘤和铜代谢相关疾病^[21-22],其在脑卒中病理进程中的作用及机制尚未见报道。此外,本研究构建了 SLC31A1/铜稳态/线粒体自噬/铜死亡的完整调控网络,明确了 SLC31A1 作为铜代谢与线粒体自噬交叉节点的核心作用。此外,本研究证实 SLC31A1 并非直接作用于铜死亡通路,而是通过调控铜离子稳态间接激活线粒体自噬,进而发挥神经保护作用,这为理解多通路协同调控神经细胞存活提供了新的理论依据。

尽管本研究取得了明确的实验结果,但仍存在一定局限性。首先,本研究采用的 PC12 细胞虽具有神经元样表型且广泛用于脑卒中相关研究,但其与原代脑皮层神经元的生理特性仍存在差异,研究结论需在原代神经元模型中进一步验证。其次,本研究仅在细胞水平证实了 SLC31A1 的神经保护作用,缺乏动物体内实验的验证,难以完全反映其在缺血性脑卒中病理微环境中的实际作用。第三,受实验条件限制,本研究未探究铜离子螯合剂联合 OGD 处理或外源性铜离子 OGD 处理的效果,暂无法直接判断 SLC31A1 的神经保护作用是否完全依赖其铜离子转运功能,其调控线粒体自噬、抑制铜死亡的过程中是否存在非铜离子依赖的调控途径仍有待进一步验证。第四,本研究仅选取 12 h 这一时间节点进行研究,未设置时间梯度,故暂无法明确 SLC31A1 调控线粒体自噬、抑制铜死亡的动态变化规律。最后,SLC31A1 调控线粒体自噬的具体分子靶点尚未明确,其是否采用直接结合自噬相关蛋白或间接调控下游信号通路激活 PINK1/Parkin 通路,仍需后续通过免疫共沉淀、基因沉默等技术深入探究。未来研究可围绕以下方向展开:采用原代大鼠脑皮层神经元和大脑中动脉栓塞动物模型,验

证 SLC31A1 在体内的神经保护作用及对脑卒中预后的影响;增设铜离子螯合剂、外源性铜离子联合 OGD 的干预实验组,明确 SLC31A1 发挥作用的铜离子依赖性;设置不同时间梯度的 OGD 处理,系统检测各时间点线粒体自噬、铜死亡及氧化应激相关指标的表达变化,阐明 SLC31A1 调控作用的动态规律及阶段特异性;探索 SLC31A1 与线粒体自噬关键分子的相互作用模式,明确其调控线粒体自噬的分子机制;基于 SLC31A1 的铜转运功能,探索靶向 SLC31A1 的激动剂或铜离子螯合剂联合用药策略,为缺血性脑卒中的临床治疗提供新的思路。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 方洋:实验实施、指标检测、数据分析、论文初稿撰写;王梓同:参与实验操作、实验记录、图表绘制;熊敬仪:技术支持、实验方法优化、数据分析核对;王朝晖:研究设计、经费统筹、实验监督、论文修改定稿

参 考 文 献

- [1] Wang L, Zhang X, Xiong XX, et al. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2377.
- [2] Li JM, Wen M, Zhang ZP, et al. The R219K polymorphism of the ATP binding cassette subfamily a member 1 gene and susceptibility to ischemic stroke in Chinese population[J]. *Open Med*, 2020, 15: 274–282.
- [3] Gelhard S, Kestner RI, Armbrust M, et al. Exploring contraindications for thrombolysis: risk of hemorrhagic transformation and neurological deterioration after thrombolysis in mice with recent ischemic stroke and hyperglycemia[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(12): 3343.
- [4] Gao L, Liu F, Hou PP, et al. Neurons release injured mitochondria as “help-me” signaling after ischemic stroke[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 785761.
- [5] Msheik A, Fares Y, Mohanna M, et al. Middle meningeal artery embolisation: The review of a new treatment for chronic subdural hematomas[J]. *Surg Neurol Int*, 2023, 14: 66.
- [6] Maryam T, Rana NF, Alshahrani SM, et al. Silymarin encapsulated liposomal formulation: an effective treatment modality against copper toxicity associated liver dysfunction and neurobehavioral abnormalities in wistar rats[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1514.
- [7] Fukai T, Ushio-Fukai M, Kaplan JH. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(2): 186–201.
- [8] Yan JQ, Sun WJ, Shen MM, et al. Idebenone improves motor dysfunction, learning and memory by regulating mitophagy in MPTP-treated mice[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 28.
- [9] Zhang L, Dong YT, Wang WZ, et al. Ethionine suppresses mitochondria autophagy and induces apoptosis via activation of reactive oxygen species in neural tube defects[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 242.
- [10] Xie JM, Yang YN, Gao YB, et al. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 46.
- [11] Yin S, Bai XM, Xin DQ, et al. Neuroprotective effects of the sonic hedgehog signaling pathway in ischemic injury through promotion of synaptic and neuronal health[J]. *Neural Plast*, 2020, 2020: 8815195.
- [12] Zhang ZY, Wang Y, Chen ZY, et al. Tailoring conductive inverse opal films with anisotropic elliptical porous patterns for nerve cell orientation[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 117.
- [13] 高颖, 蒋萍, 曹克刚. 缺血性卒中证候特征及其生物学基础相关研究现状[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2026, 32(2): 229–233.
- Gao Y, Jiang P, Cao KG. Research status on syndrome characteristics of ischemic stroke and its biological basis [J]. *J Basic Chin Med*, 2026, 32(2): 229–233.
- [14] Kim Y, Lee M, Mo HJ, et al. The association between malnutrition status and hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke receiving intravenous thrombolysis[J]. *BMC Neurol*, 2023, 23(1): 106.
- [15] Sifat AE, Nozohouri S, Archie SR, et al. Brain energy metabolism in ischemic stroke: effects of smoking and diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8512.
- [16] 彭依然, 李瑞青. 缺血性脑卒中中线粒体质量控制系统的改变及针刺治疗的研究进展[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2025, 46(6): 955–963.
- Peng YR, Li RQ. Research progress on changes of mitochondrial quality control system in ischemic stroke and acupuncture therapy[J]. *J Sun Yat Sen Univ Med Sci*, 2025, 46(6): 955–963.
- [17] 陈佳佳, 胡丹. 中药调控线粒体自噬治疗缺血性脑卒中中研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2025, 41(6): 1333–1336.
- Chen JJ, Hu D. Research progress on TCM regulation of mitophagy for ischemic stroke[J]. *J Pract Tradit Chin Med*, 2025, 41(6): 1333–1336.
- [18] 王晓东, 王君, 张有志. 线粒体自噬对脑缺血再灌注损伤中细胞死亡的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2025, 41(6): 821–826.
- Wang XD, Wang J, Zhang YZ. Effect of mitophagy on cell death in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Neuroanatomy*, 2025, 41(6): 821–826.
- [19] Saunders TL, Windley SP, Gervinskas G, et al. Exposure of the inner mitochondrial membrane triggers apoptotic mitophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(3): 335–347.
- [20] 李晟, 秦莉花, 曹曦, 等. 缺血性脑卒中疾病铜稳态失衡与铜死亡的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(13): 3302–3307.
- Li S, Qin LH, Cao X, et al. Research progress of copper homeostasis imbalance and copper death in ischemic stroke disease[J]. *Chin J Gerontol*, 2025, 45(13): 3302–3307.
- [21] Tu B, Song K, Zhou ZY, et al. SLC31A1 loss depletes mitochondrial copper and promotes cardiac fibrosis[J]. *Eur Heart J*, 2025, 46(25): 2458–2474.
- [22] Kong FS, Ren CY, Jia RF, et al. Systematic pan-cancer analysis identifies SLC31A1 as a biomarker in multiple tumor types[J]. *BMC Med Genomics*, 2023, 16(1): 61.

(收稿: 2025-11-17; 修回: 2026-03-06; 录用: 2026-03-26)

(责任编辑: 曾玲)

本文引用格式:

方洋, 王梓同, 熊敬仪, 等. SLC31A1 通过调控线粒体自噬抑制铜死亡减轻氧糖剥夺诱导的 PC12 细胞损伤[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(8): 1118–1126.