doi:10.11659/jjssx.04E025132

·基础研究·

转录因子SP1调控蛛网膜下腔出血后早期脑损伤铁死亡的机制研究

汤其凯[1],周晓明[1],张冰涛[1],马晨峰[2],吴 琪[1],陈姝娟[1],吴 伟[2],张 鑫[1] (1.南京大学医学院附属金陵医院神经外科,江苏 南京 210002;2.南京医科大学第一附属医院神经外科,江苏 南京 210029)

[摘 要] **目的** 探讨转录因子SP1在蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤中的表达及其对神经元铁死亡的调控作用。**方法** 构建小鼠SAH模型及体外原代神经元OxyHb刺激模型,通过Western blot、qPCR、免疫组化染色及免疫荧光染色检测SP1的表达变化。通过体外敲低和过表达SP1,检测SP1蛋白表达、细胞活性、乳酸脱氢酶(LDH)水平及丙二醛(MDA)、4-羟基壬烯醛(4-HNE)、谷胱甘肽(GSH)、Fe^{2+}铁死亡相关指标,并在不同细胞死亡抑制剂处理后检测敲低SP1的细胞活性变化。在体内过表达SP1后,通过尼氏染色、脑水肿程度、改良Garcia评分、平衡木实验、水迷宫实验评估其对神经功能的保护作用。通过双荧光素酶报告基因实验及分子检测验证SP1对GPX4表达的转录调控作用。**结果** 在SAH后早期,SP1的表达显著下调。在体外敲低SP1后,神经元中MDA、4-HNE及Fe^{2+}水平升高($P<0.05$),GSH水平下降($P<0.05$),而过表达SP1则逆转了上述变化。铁死亡抑制剂干预能够提高敲低SP1后的细胞活性,而其他抑制剂处理后细胞活性无显著变化。体内过表达SP1后,小鼠脑水肿程度改善,神经认知功能恢复。SP1通过结合GPX4启动子区域正向调控其表达,发挥抑制神经元铁死亡作用。**结论** 在SAH早期,过表达SP1可转录激活GPX4抑制神经元铁死亡,具有显著的神经保护作用,为SAH后的干预治疗提供了潜在分子靶点。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;SP1;铁死亡;GPX4;早期脑损伤

[中图分类号] R743.35 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-04-24

Mechanism of transcription factor SP1 regulating ferroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

TANG Qi-kai[1], ZHOU Xiao-ming[1], ZHANG Bing-tao[1], MA Chen-feng[2], WU Qi[1], CHEN Shu-juan[1], WU Wei[2], ZHANG Xin[1] (1. Department of Neurosurgery, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210002, China; 2. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of transcription factor SP1 in early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH) and its regulatory effect on neuronal ferroptosis. **Methods** A mouse model of SAH and an in vitro primary neuronal model with

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82071328);江苏省卫生健康委医学科研项目重点项目(ZD2022054)

[通信作者] 张 鑫,E-mail: zhangxsp@163.com

[11] Wang YC, Nakagawa M, Garitaonandia I, et al. Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis[J]. Cell Res, 2011, 21(11): 1551-1563. doi:10.1038/cr.2011.148.

[12] Liu G, Chen L, Zhao J, et al. Deciphering the metabolic impact and clinical relevance of N-Glycosylation in colorectal cancer through comprehensive glycoproteomic profiling[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(21):e2415645. doi:10.1002/advs.202415645.

[13] Wang X, Guo Q, Lu X, et al. A nanoplatform targeting endoplasmic reticulum and mitochondria overcomes chemoresistance in colorectal cancer by disrupting stemness[J]. Nat Commun, 2025, 16:1258. doi:10.1038/s41467-025-45322-0.

[14] Kolben T, Müller L, Meister S, et al. Blood group antigens SLeX, SLeA, and LeY as prognostic markers in endometrial cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(12): 3323-3335. doi:10.1007/s00432-022-04098-8.

[15] Chen B, Liu W, Li Y, et al. Impact of N-linked glycosylation on therapeutic proteins [J]. Molecules, 2022, 27(24): 8859. doi:10.1186/s12929-020-00670-x.

[16] Chatham JC, Zhang J, Wende AR. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho)physiology [J]. Physiol Rev, 2021, 101(2): 427-493. doi:10.1152/physrev.00043.201.

[17] Esmail S, Manolson MF. Advances in understanding N-glycosylation structure, function, and regulation in health and disease[J]. Eur J Cell Biol, 2021, 100(7-8): 151186. doi:10.1016/j.ejcb.2021.151186.

[18] Kuznetsova K, Chabot NM, Ugolini M, et al. NANOG organizes transcription bodies[J]. Curr Biol, 2023, 33(1): 164-173. e5. doi:10.1016/j.cub.2022.11.015.

[19] Fatma H, Siddique HR, Maurya SK. The multiple faces of NANOG in cancer: a therapeutic target to chemosensitize therapy-resistant cancers[J]. Epigenomics, 2021, 13(23): 1885-1900. doi:10.2217/epi-2021-0228.

(编辑:杨 颖)

OxyHb stimulation were constructed. The change of SP1 expression was detected by Western blot, qPCR, immunohistochemistry, and immunofluorescence staining. The expression of SP1 protein, cell activity, lactate dehydrogenase (LDH) level, and ferroptosis-related indicators malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE), glutathione (GSH) and Fe^{2+} were detected after knockdown and overexpression of SP1 in vitro, and the viability changes of cells with SP1 knockdown were detected after treated with different cell death inhibitors. The neuroprotective effects of SP1 after its overexpression in vivo were assessed through Nissl staining, the degree of brain edema, modified Garcia score, balance beam test, and water maze test. The transcriptional regulatory effect of SP1 on GPX4 expression was verified through dual luciferase reporter gene experiment and molecular detection. **Results** The expression of SP1 was significantly downregulated during early brain injury after SAH. After knockdown of SP1 in vitro, the levels of MDA, 4-HNE and Fe^{2+} in neurons increased ($P<0.05$), GSH levels decreased ($P<0.05$), while overexpression of SP1 in vitro reversed these changes. The activity of cells with SP1 knockdown was increased after intervention with ferroptosis inhibitors, whereas the cell viability showed no significant change after treated with other inhibitors. Overexpression of SP1 in vivo ameliorated brain edema, and recovered neurological cognitive function. SP1 positively regulated the expression of GPX4 by binding to its promoter region, thereby exerting an inhibitory effect on neuronal ferroptosis. **Conclusion** In the early stage of SAH, overexpression of SP1 can transcriptionally activate GPX4 to inhibit neuronal ferroptosis, which has a significant neuroprotective effect and provides a potential molecular target for intervention and treatment after SAH.

Keywords: subarachnoid hemorrhage; SP1; ferroptosis; GPX4; early brain injury

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后早期脑损伤与患者预后密切相关。转录因子特异性蛋白1(specificity protein 1,SP1)是一种含锌指结构的DNA结合蛋白[1],可通过识别GC盒或GT盒调控多种炎症因子、凋亡及血脑屏障相关基因的转录[2]。研究表明,SP1参与脑卒中后神经元的死亡、氧化应激和神经功能障碍等过程[3]。铁死亡是一种以铁依赖性脂质过氧化为特征的新型程序化细胞死亡方式[4],SLC7A11、GPX4等关键蛋白在其中发挥着重要作用,这些蛋白通过调节细胞内的氧化还原及脂质代谢,维持细胞的生存与死亡平衡[5-6]。然而,SP1在SAH后早期脑损伤中对神经元铁死亡的调控作用及其分子机制目前尚不清楚。因此,本研究旨在探讨SP1对SAH后早期脑损伤中神经元铁死亡的调控作用及潜在机制,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

SP1抗体、GPX4抗体、β-Tubulin抗体(英国Abcam公司);HRP标记山羊抗鼠/兔IgG二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司);BCA蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);DAPI染色液(上海碧云天生物技术有限公司);qPCR反转录试剂盒及SYBR Green预混液(南京诺唯赞生物科技有限公司);OxyHb(美国Sigma-Aldrich公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司);GPX4启动子双荧光素酶报告质粒(广州吉玛基因公司);CCK-8细胞活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)细胞毒性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);脂质氧化丙二醛(malondialdehyde,MDA)、4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal、4-HNE)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)、Fe^{2+}检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);尼氏染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);4%多聚甲醛固定液(上海源叶生物科技有限公司);封片剂及抗荧光淬灭试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。DMSO、Z-VAD-FMK、Necrostatin-1、Disulfiram、Ferrostatin-1、3-Methyladenine(美国Med Chem Express公司);荧光显微镜(德国卡尔蔡司股份公司);酶标仪(美国Thermo Fisher公司);实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司);电泳仪、转膜仪、凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 动物来源

156只SPF级雄性C57BL/6j小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。所有动物实验人员均已通过动物实验及饲养规范化培训,手术均在全身麻醉下进行。

1.3 原代神经元提取与培养

取胎鼠,剥离大脑皮质,去除脑膜及血管组织,经胰酶消化后制成单细胞悬液接种于含2% B27、1% GlutaMAX的Neurobasal培养基中,并置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,换液后继续培养7 d,用于后续实验。

1.4 SAH体内模型构建及分组

建模:30只小鼠使用2%异氟烷麻醉后放置在立体定向装置中,于小鼠脑部视交叉下注射0.07 mL非肝素化自体动脉血构建SAH模型,于刺激后6 h、12 h、24 h、48 h、72 h分别检测SP1表达;Sham组30只大鼠仅钻孔处理,选择SP1表达最低的时间点作为后续体内实验建模时间。

为了在体内增加外源性SP1表达,使用0.52 mm针头于侧脑室注射10 μL AAV-SP1及其对照AAV-

control病毒后针头停留10 min以上,感染1周后进行后续实验。

将96只小鼠随机分为Sham组(仅钻孔处理)、SAH组(仅建模)、AAV-control组(仅转染AAV-control)、AAV-SP1组(仅转染AAV-SP1)、SAH+AAV-control组(转染AAV-control 1周后建模)、SAH+AAV-SP1组(转染AAV-SP1 1周后建模)。

1.5 SAH体外模型构建及分组

建模:原代神经元暴露于OxyHb(10 μmol/L)中3 h、6 h、12 h、24 h、48 h,构建体外模型,选取在OxyHb暴露下SP1表达最低的时间点作为后续体外实验建模时间。

将原代神经元分为ctrl组(不进行暴露处理)、OxyHb组(仅进行OxyHb暴露)、sh-SP1组(仅转染敲低SP1腺病毒sh-SP1)、OxyHb+sh-SP1组(转染sh-SP1后暴露于OxyHb中)、Lv-SP1组(仅转染过表达SP1腺病毒Lv-SP1)、OxyHb+Lv-SP1组(转染Lv-SP1后暴露于OxyHb中)。

1.6 qPCR

提取组织或细胞总RNA,使用PrimeScript RT试剂盒反转录为cDNA,按说明书进行qPCR扩增。使用SYBR Green检测系统,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算SP1及GPX4的相对表达量。

1.7 Western blot

取脑组织或细胞裂解液,经BCA法测定蛋白浓度后,等量上样于SDS-PAGE胶内分离,转膜后用5%脱脂奶粉封闭,分别用SP1、GPX4、β-Tubulin一抗孵育,次日加入HRP标记二抗,采用ECL化学发光法显影,Image J软件进行灰度值分析。

1.8 免疫组化染色

取Sham组和SAH组小鼠脑组织,经4%多聚甲醛固定后石蜡包埋、切片,脱蜡重水化后行抗原修复。3% H_2O_2封闭内源性过氧化酶后加入SP1一抗,于37 ℃孵育1 h,加入HRP标记二抗孵育后DAB显色,苏木素复染、脱水、封片后显微镜下观察。

1.9 免疫荧光染色

取Sham组和SAH组小鼠脑组织冰冻切片以及ctrl组和OxyHb组原代神经元固定后加入0.3% Triton X-100通透,5% BSA封闭,加入SP1、NeuN一抗孵育过夜,次日加入荧光标记二抗孵育,DAPI染核后封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.10 细胞活性及毒性测定

细胞活性:细胞接种于96孔板中,加入适量的CCK-8试剂后,37 ℃下孵育2 h;然后,使用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度,以评估细胞活性。细胞毒性:采用LDH检测试剂盒按照生产商说明书检测细胞毒性。

1.11 MDA和4-HNE检测

MDA含量:各组细胞按照试剂盒说明书处理后,提取总脂质,然后加入MDA检测试剂反应,采用酶标仪在532 nm波长处测定吸光度;依据标准曲线计算样本中MDA的含量。4-HNE含量:取各组细胞,按照4-HNE试剂盒操作后,采用ELISA法通过酶标仪测定450 nm波长处的吸光度;根据标准曲线计算样本中4-HNE的浓度。

1.12 GSH和Fe^{2+}测定

GSH含量:各组细胞根据GSH检测试剂盒说明书处理后,使用酶标仪在412 nm波长处测定吸光度;根据标准曲线计算样本中GSH的浓度。Fe^{2+}含量:取各组细胞,根据Fe^{2+}检测试剂盒说明书处理后,采用酶标仪在593 nm波长处测量吸光度,然后计算Fe^{2+}含量。

1.13 细胞死亡抑制剂干预后细胞活性检测

在敲低SP1的细胞中分别加入凋亡抑制剂Z-VAD-FMK(15 μmol/L)、程序性坏死抑制剂Necrostatin(10 μmol/L)、焦亡抑制剂Disulfiram(1 μmol/L)、铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(10 μmol/L)及自噬抑制剂3-Methyladenine(10 μmol/L)后,使用CCK-8试剂盒检测细胞活性变化。

1.14 尼氏染色评价神经元存活情况

取Sham组、SAH组、SAH+AAV-control组和SAH+AAV-SP1组小鼠石蜡切片经脱蜡、重水化后用0.1%尼氏染液染色,去除背景后脱水封片,在显微镜下观察和计数尼氏小体阳性细胞。

1.15 小鼠神经功能损伤评估

采用改良Garcia评分评估Sham组、SAH组、SAH+AAV-control组和SAH+AAV-SP1组小鼠神经功能损伤程度,包括自主活动、四肢伸展、躯体感觉、前肢抓握能力、爬行反应及触须刺激反应,每项0~3分,总分18分,分值越低说明神经功能损伤越严重。

1.16 平衡木实验

将Sham组、SAH组、SAH+AAV-control组和SAH+AAV-SP1组小鼠放置于横向平衡木中央,测量小鼠跌落前平衡时间;同时将4组小鼠放置于平衡木一侧,检测小鼠穿越平衡木到另一侧的行走时间。每只小鼠重复测试3次,取平均值。

1.17 脑水肿程度评估

SAH造模后24 h,取Sham组、SAH组、SAH+AAV-control组和SAH+AAV-SP1组小鼠脑组织称湿重后,

60 ℃烘干72 h测定干重,计算脑组织含水量以评估脑水肿程度。脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.18 水迷宫实验

水迷宫实验分为定位航行实验(5 d)与空间探索实验(第6天)。记录Sham组、SAH组、SAH+AAV-control组和SAH+AAV-SP1组小鼠寻找隐藏在水面下平台的时间(寻找平台时间)和穿越目标平台所在象限时间(目标象限停留时间),以评估小鼠认知功能。

1.19 GPX4与SP1的靶向关系验证

通过JASPAR数据库分析GPX4上的序列与SP1的结合序列匹配情况。构建含GPX4启动子序列及其突变型的报告质粒,分别与SP1表达质粒共转染至原代神经元,48 h后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性变化。

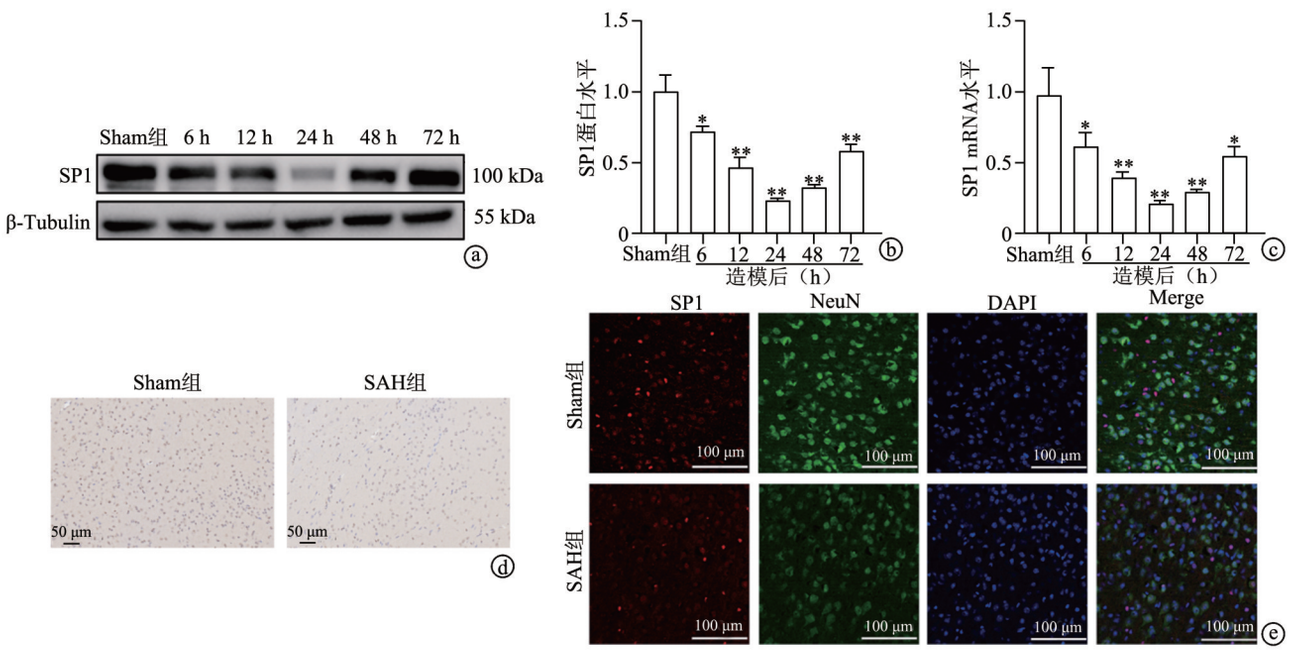
1.20 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。所有实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,2组间差异分析采用t检验。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SP1在SAH动物模型中表达显著下调

在SAH动物模型中,Western blot和qPCR检测结果显示,与Sham组比较,造模后各时间点SP1蛋白和mRNA水平均降低(P<0.05),其中造模后24 h下降最显著(图1a~c),故选择该时间点作为后续体内实验的建模时间。免疫组化染色及免疫荧光染色结果显示,与Sham组比较,SAH组小鼠脑组织中SP1表达下降(图1d、e)。



a:SP1蛋白表达灰度图;b:SP1蛋白定量分析;c:SP1 mRNA水平;d:免疫组化染色;e:脑组织免疫荧光染色 *:与Sham组比较,P<0.05;**:与Sham组比较,P<0.01

图1 SP1在SAH动物模型中的表达下调

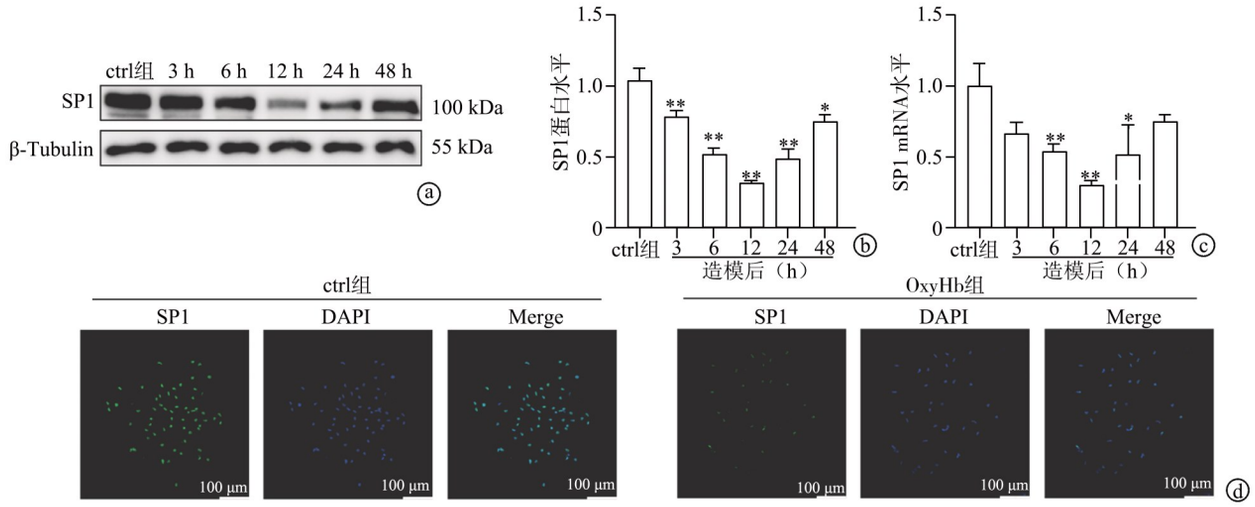
2.2 SP1在OxyHb细胞模型中表达显著下调

在体外细胞模型中,OxyHb刺激后各时间点的SP1蛋白和mRNA水平均较ctrl组下降(P<0.05),其中12 h时下降最明显(图2a~c),故选择该时间作为后续体外实验的建模时间。细胞免疫荧光染色结果显示,在OxyHb刺激12 h后,SP1的表达被抑制(图2d)。

2.3 SP1下调促进神经元铁死亡

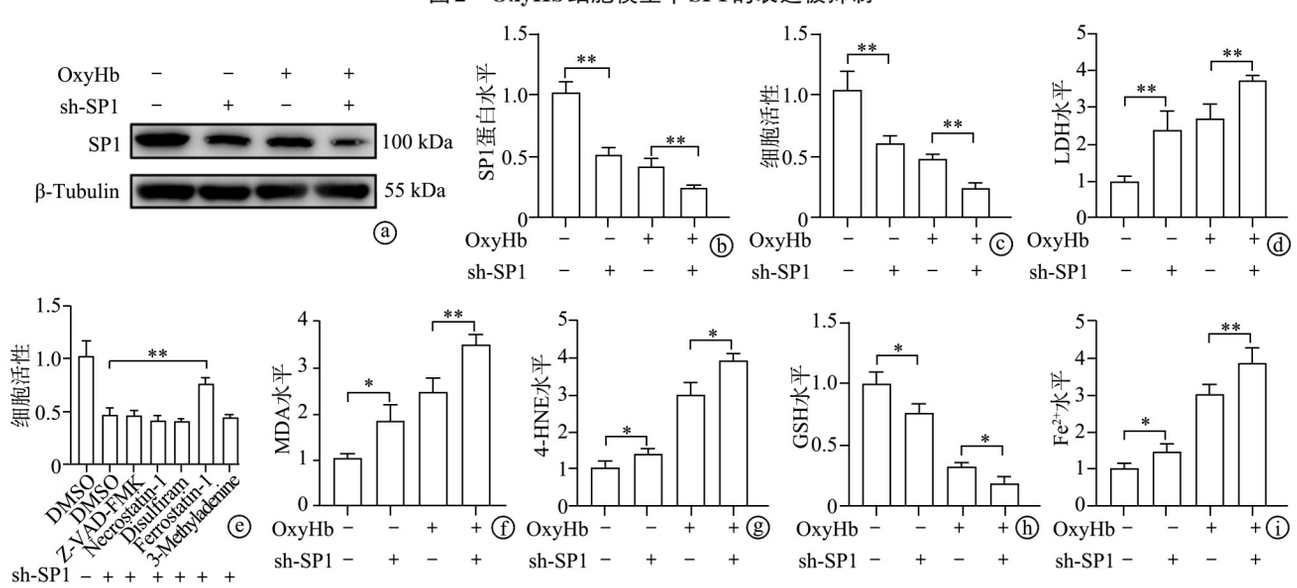
为进一步明确SP1在SAH后脑损伤中的作用,Western blot检测发现,与ctrl组相比,sh-SP1组细胞中SP1蛋白水平降低(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+sh-SP1组细胞中SP1蛋白水平降低(P<0.05),见图3a、b。与ctrl组相比,sh-SP1组细胞活性降低(P<0.05),LDH水平升高(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+sh-SP1组细胞活性降低(P<0.05),LDH水平升高(P<0.05),见图3c、d。在敲低SP1后,与溶剂DMSO相比,在凋亡抑制剂Z-VAD-FMK、程序性坏死抑制剂Necrostatin-1、焦亡抑制剂Disulfiram、自噬抑制剂3-Methyladenine等干预后,细胞活性无显著变化(P>0.05),而铁死亡抑制剂Ferrostatin-1干预能够提高敲低SP1后的细胞活性(P<0.05),见图3e,提示

SAH后SP1缺失可引发铁死亡。进一步检测铁死亡相关指标发现,与ctrl组相比,sh-SP1组细胞中MDA、4-HNE及Fe^{2+}水平升高,GSH水平下降,差异均有统计学意义(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+sh-SP1组细胞中MDA、4-HNE及Fe^{2+}水平升高,GSH水平下降,差异均有统计学意义(P<0.05),见图3f~i。



a:SP1蛋白表达灰度图;b:SP1蛋白定量分析;c:SP1 mRNA水平;d:原代神经元免疫荧光染色 *:与ctrl组比较,P<0.05;**:与ctrl组比较,P<0.01

图2 OxyHb细胞模型中SP1的表达被抑制



a、b:敲低SP1后SP1蛋白表达检测;c:CCK-8检测细胞活性;d:LDH水平;e:不同细胞死亡抑制剂处理后细胞活性变化;f~i:铁死亡关键分子水平 *:P<0.05;**:P<0.01

图3 下调SP1促进神经元铁死亡

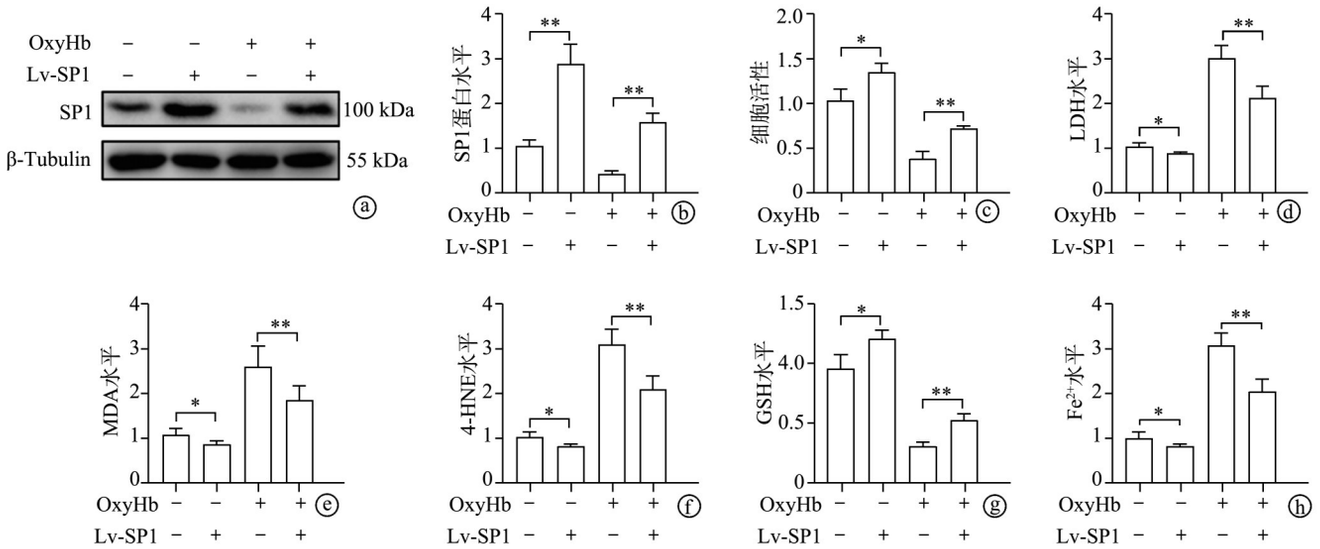
2.4 体外过表达SP1抑制OxyHb诱导的神经元铁死亡

Western blot检测发现,与ctrl组相比,Lv-SP1组细胞中SP1蛋白水平升高(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+Lv-SP1组细胞中SP1蛋白水平升高(P<0.05),见图4a、b。与ctrl组相比,Lv-SP1组细胞活性增强(P<0.05),LDH水平下降(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+Lv-SP1组细胞活性增强(P<0.05),LDH水平下降(P<0.05),见图4c、d。与ctrl组相比,Lv-SP1组细胞中MDA、4-HNE及Fe^{2+}水平降低,GSH水平升高,差异均有统计学意义(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+Lv-SP1组细胞中MDA、4-HNE及Fe^{2+}水平降低,GSH水平升高,差异均有统计学意义(P<0.05),见图4e~h。

2.5 体内过表达SP1改善SAH后神经功能

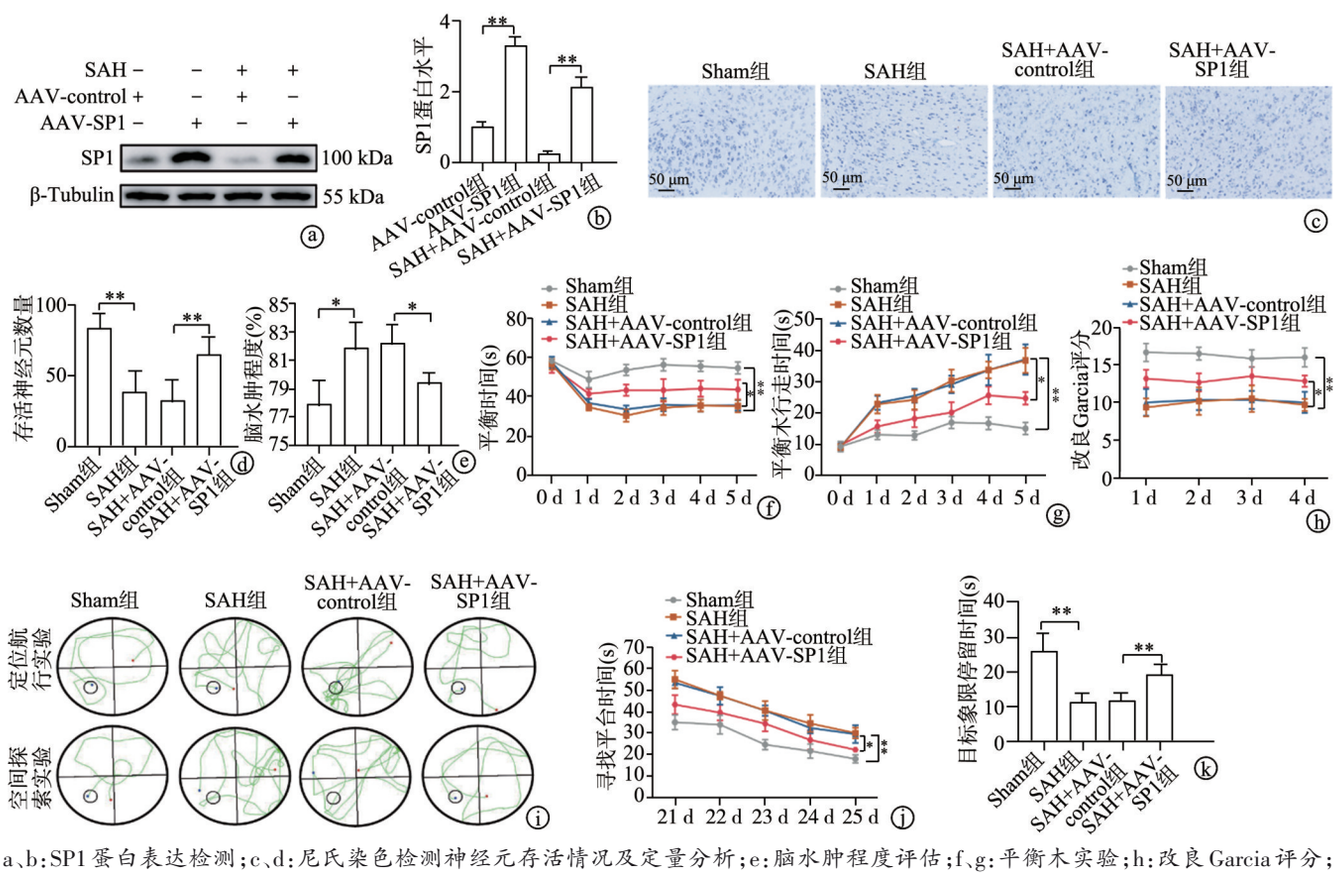
Western blot检测结果显示,与AAV-control组相比,AAV-SP1组细胞中SP1蛋白水平增加(P<0.05);与SAH+AAV-control组相比,SAH+AAV-SP1组细胞中SP1蛋白水平升高(P<0.05),见图5a、b。与SAH+

AAV-control组相比，SAH+AAV-SP1组小鼠存活神经元数量增加（$P<0.05$），存活率升高（$P<0.05$），脑水肿程度显著降低（$P<0.05$），见图5c~e。平衡木实验显示，与SAH+AAV-control组相比，SAH+AAV-SP1组小鼠在造模后第2~5天时平衡时间增加（$P<0.05$），行走时间加快（$P<0.05$），改良Garcia评分则在造模后第2~4天提高（$P<0.05$），见图5f~h。水迷宫实验显示，与SAH+AAV-control组比较，SAH+AAV-SP1组小鼠寻找平台时间缩短（$P<0.05$），目标象限停留时间延长（$P<0.05$），见图5i~k。



a、b：Western blot检测SP1蛋白表达；c：CCK-8检测细胞活性；d：LDH水平；e~h：铁死亡关键分子水平 *：$P<0.05$；**：$P<0.01$

图4 体外过表达SP1抑制OxyHb诱导的神经元铁死亡

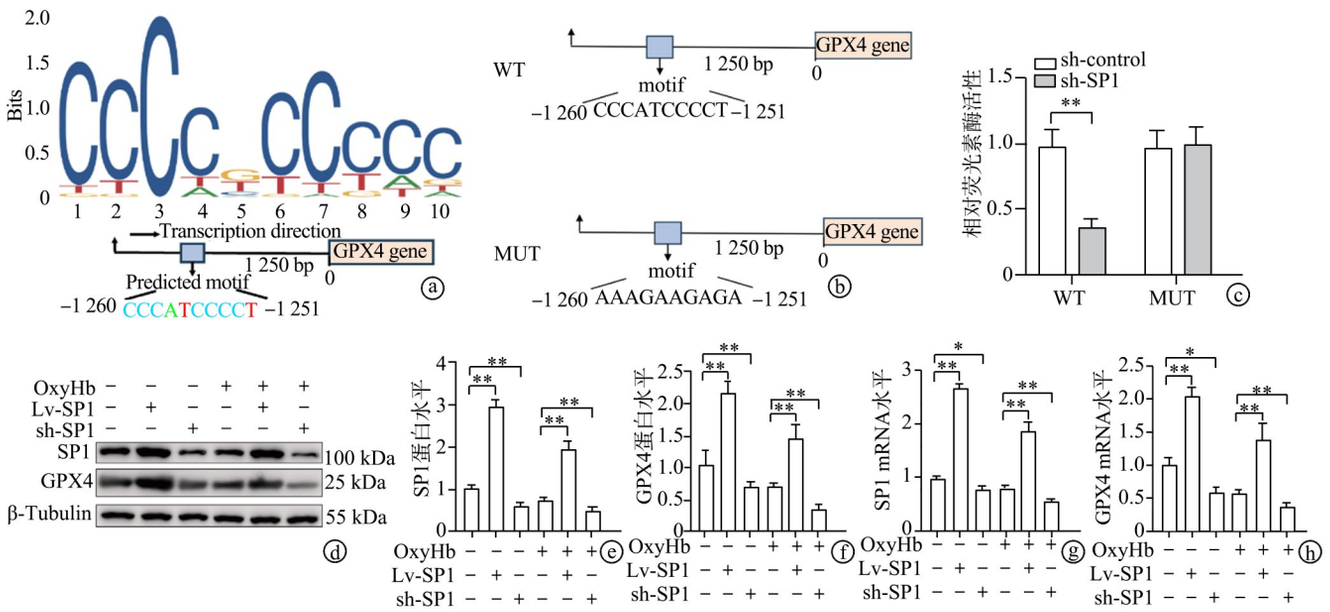


a、b：SP1蛋白表达检测；c、d：尼氏染色检测神经元存活情况及定量分析；e：脑水肿程度评估；f、g：平衡木实验；h：改良Garcia评分；i~k：水迷宫实验 *：$P<0.05$；**：$P<0.01$

图5 体内过表达SP1改善SAH后神经功能

2.6 SP1通过转录调控GPX4表达参与铁死亡调节

为探索SP1抑制铁死亡的分子机制,通过JASPAR数据库分析发现,GPX4启动子区域存在SP1结合位点(图6a)。双荧光素酶报告基因实验显示,该结合序列在SP1敲低时相对荧光素酶活性显著下降(P<0.05),而突变后失去响应性(图6b、c),证实该区域对SP1转录激活GPX4至关重要。进一步在原代神经元中过表达SP1后,与ctrl组相比,Lv-SP1组细胞中SP1、GPX4的蛋白和mRNA水平均升高(P<0.05);而敲低SP1后,与ctrl组相比,sh-SP1组细胞中SP1、GPX4的蛋白和mRNA水平均降低(P<0.05);与OxyHb组相比,OxyHb+Lv-SP1组细胞中SP1、GPX4的蛋白和mRNA水平均升高(P<0.05),OxyHb+sh-SP1组细胞中SP1、GPX4的蛋白和mRNA水平均降低(P<0.05),见图6d~h。



a:JASPAR预测结合序列;b:突变结构示意图;c:双荧光素酶活性检测;d~f:SP1、GPX4蛋白表达灰度图及定量分析;g~h:SP1和GPX4 mRNA水平 *:P<0.05;**:P<0.01

图6 SP1通过转录调控GPX4表达参与铁死亡调节

3 讨论

SAH是临床常见的急性脑血管事件,其早期脑损伤机制复杂,严重影响患者的神经功能恢复[7-9]。近年来研究表明,铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式,在多种急性脑损伤模型中被证实与神经元损伤密切相关[10-12]。然而,铁死亡在SAH中的作用机制尚不明确,尤其是在转录调控层面的研究仍较为有限。本研究从转录因子SP1出发,揭示其在SAH中通过调控铁死亡相关分子GPX4发挥神经保护作用,以拓展对早期脑损伤分子机制的认识。

本研究结果表明,在体内外模型中,SAH后SP1表达显著下调。SP1是一类广泛表达的锌指转录因子,参与多种细胞生命活动,既往在缺血性脑损伤、阿尔茨海默病等神经系统疾病中被证实具有一定的调控功能[13-15]。本研究发现,SP1表达改变可显著影响神经元的生存状态,敲低SP1会加重神经元损伤,表现为细胞活性下降、LDH水平上升,并伴随铁死亡特征性指标MDA、4-HNE、Fe^{2+}水平升高,GSH水平下降;相反,过表达SP1后神经元活性增强,铁死亡相关分子表达明显改善,说明SP1具有负向调控铁死亡的潜能。这一功能在体内实验中亦得到证实,过表达SP1后,SAH小鼠存活神经元数量增加,脑水肿程度降低,神经功能障碍均有改善。

GPX4是铁死亡中最核心的抗氧化酶之一,其通过清除磷脂过氧化物维持细胞膜稳定性,是防止铁死亡发生的关键屏障[16-17]。GPX4可能是SP1发挥调控作用的关键下游靶基因。本研究通过生物信息学分析、双荧光素酶报告基因实验及蛋白与转录水平的双重验证,证实了SP1能够通过结合GPX4启动子区域,正向调控SP1表达。该机制为SP1介导铁死亡调控提供了直接的分子证据,也提示SP1-GPX4通路可能成为SAH后铁死亡调控的重要轴线。

值得注意的是,铁死亡与氧化应激、线粒体功能紊乱、炎症反应等过程密切相关,而SP1作为多功能转

录因子,其调控网络可能远不止GPX4[18-19]。当前研究虽然聚焦GPX4这一关键分子,但SP1还可能通过调控SLC7A11、FSP1或调节铁稳态的其他相关基因协同参与铁死亡的调控过程[20]。此外,SP1在不同细胞类型中的作用是否一致、是否存在细胞特异性的调控模式,未来也值得进一步探讨。

综上所述,SAH后SP1表达下调会导致GPX4表达受限,抗氧化能力下降,从而引发神经元铁死亡,加重脑损伤;相反,过表达SP1可通过促进GPX4表达抑制铁死亡,保护神经元功能。这一发现不仅深化了对SAH后铁死亡机制的理解,也为靶向SP1的干预策略提供了理论依据。针对SP1表达的调控机制、在其他铁死亡通路中的作用及其在临床转化中的应用潜力,未来仍需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Ding J, Fayyaz AI, Ding Y, et al. Role of specificity protein 1 (SP1) in cardiovascular diseases: pathological mechanisms and therapeutic potentials[J]. Biomolecules, 2024, 14(7): 807. doi: 10.3390/biom14070807.

[2] Pan H, Guo Z, Lv P, et al. Proline/serine-rich coiled-coil protein 1 inhibits macrophage inflammation and delays atherosclerotic progression by binding to Annexin A2[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(3): e1220. doi: 10.1002/ctm2.1220.

[3] Yu Q, Liu W, Chen Z, et al. Specificity protein 1: a protein with a two-sided role in ischemic stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 757670. doi: 10.3389/fncel.2021.757670.

[4] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications[J]. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125. doi: 10.1038/s41422-020-00441-1.

[5] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620. doi: 10.1007/s13238-020-00789-5.

[6] Guo J, Tuo QZ, Lei P. Iron, ferroptosis, and ischemic stroke[J]. J Neurochem, 2023, 165(4): 487-520. doi: 10.1111/jnc.15807.

[7] Neifert SN, Chapman EK, Martini ML, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the last decade[J]. Transl Stroke Res, 2021, 12(3): 428-446. doi: 10.1007/s12975-020-00867-0.

[8] Thilak S, Brown P, Whitehouse T, et al. Diagnosis and management of subarachnoid haemorrhage[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 1850. doi: 10.1038/s41467-024-46015-2.

[9] Aydin S, Peker S. Long-term cognitive decline after subarachnoid hemorrhage: pathophysiology, management, and future directions[J]. Stroke, 2025, 56(4): 1106-1111. doi: 10.1161/STROKEAHA.124.049969.

[10] Chen J, Shi Z, Zhang C, et al. Oroxin A alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by regulating ferroptosis and neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 116. doi: 10.1186/s12974-024-03099-3.

[11] Peng Z, Li XJ, Zhou Y, et al. Hydrogen exerts neuroprotective effects after subarachnoid hemorrhage by attenuating neuronal ferroptosis and inhibiting neuroinflammation[J]. Free Radic Biol Med, 2024, 215: 79-93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.02.028.

[12] Hu J, Cheng M, Jiang C, et al. Deferoxamine mitigates ferroptosis and inflammation in hippocampal neurons after subarachnoid hemorrhage by activating the Nrf2/TXNRD1 axis[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(2): 1044-1060. doi: 10.1007/s12035-023-03525-2.

[13] Sanguigno L, Guida N, Anzilotti S, et al. Stroke by inducing HDAC9-dependent deacetylation of HIF-1 and Sp1, promotes TfR1 transcription and GPX4 reduction, thus determining ferroptotic neuronal death[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(9): 2695-2710. doi: 10.7150/ijbs.80735.

[14] Cai F, Xue S, Zhou Z, et al. Exposure to coal dust exacerbates cognitive impairment by activating the IL6/ERK1/2/SP1 signaling pathway[J]. Sci Total Environ, 2024, 946: 174202. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.174202.

[15] Zhang F, Zhou H, Xue J, et al. Deficiency of transcription factor SP1 contributes to hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2024, 134(3): 290-306. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323272.

[16] Liang D, Feng Y, Zandkarimi F, et al. Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. Cell, 2023, 186(13): 2748-2764. e22. doi: 10.1016/j.cell.2023.05.003.

[17] Xue Q, Yan D, Chen X, et al. Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis[J]. Autophagy, 2023, 19(7): 1982-1996. doi: 10.1080/15548627.2023.2165323.

[18] Liu ZM, Wang X, Li CX, et al. SP1 promotes HDAC4 expression and inhibits HMGB1 expression to reduce intestinal barrier dysfunction, oxidative stress, and inflammatory response after sepsis[J]. J Innate Immun, 2022, 14(4): 366-379. doi: 10.1159/000518277.

[19] Liu X, Xu C, Xu L, et al. Empagliflozin improves diabetic renal tubular injury by alleviating mitochondrial fission via AMPK/SP1/PGAM5 pathway[J]. Metabolism, 2020, 111: 154334. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154334.

[20] Gawargi FI, Mishra PK. MMP9 drives ferroptosis by regulating GPX4 and iron signaling[J]. iScience, 2024, 27(9): 110622. doi: 10.1016/j.isci.2024.110622.

(编辑:龙小芬)