DOI:10.16016/j.1000-5404.201902124

自噬通过降解铁蛋白促进神经元铁死亡参与蛛网膜下腔出血后早期脑损伤

梁译丹,覃 王,黄 豪,辛元君,赵 俊,向 祥,吴欣桐,何朝晖 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科

[**摘要**] **目的** 观察大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后抑制自噬对早期脑损伤(early brain injury,EBI)恢复的作用,揭示自噬促进神经元铁死亡从而影响EBI的具体机制。**方法** 将SD大鼠随机分为对照组、SAH组、SAH+LV-ATG5组和SAH+LV-Scramble组,每组12只。采用血管内穿刺法构建SAH模型,自噬相关基因5(autophagy-related gene 5,ATG5)慢病毒(LV-ATG5)抑制自噬,免疫荧光检测SAH后24h ATG5、铁蛋白重链1(ferritin heavy polypeptide 1,FTH1)和谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)在皮质神经元的表达和定位情况。PCR检测ATG5 mRNA的表达情况,Western blot检测ATG5、LC3Ⅱ/Ⅰ、FTH1和GPX4的表达变化,尼氏染色(Nissl staining)和神经行为学评分、脑水含量等检测抑制自噬后神经元形态和功能的变化情况,并检测细胞内铁沉积、游离铁含量、脂质过氧化物产物丙二醛(malonaldehyde,MDA)、GPX4活性等铁死亡指标。**结果** 免疫荧光显示ATG5、FTH1和GPX4广泛表达于SAH后皮质神经元胞质中。PCR和Western blot检测结果显示ATG5 mRNA、ATG5和LC3Ⅱ/I蛋白表达量显著降低($P<0.05$),自噬被成功抑制。抑制自噬后,Nissl染色提示神经元数量和形态得到一定程度的改善,神经行为学评分升高($P<0.05$),脑水含量减少($P<0.05$)。对其可能的具体通路进行探索,Western blot检测结果显示SAH后FTH1和GPX4表达量下降($P<0.05$),LV-ATG5抑制自噬后FTH1和GPX4表达量升高($P<0.05$),与SAH组、空载病毒组相比,慢病毒干预组中细胞内铁沉积减少,铁含量、MDA减少($P<0.05$);GSH含量提高、GPX4活性增强($P<0.05$)。**结论** 自噬可能通过降解神经元内铁蛋白,导致神经元内游离铁含量增加,促进神经元铁死亡,加重EBI。

[**关键词**] 蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;自噬;铁死亡;铁蛋白
[**中图法分类号**] R363.21;R742;R743.35 [**文献标志码**] A

Autophagy promotes neuronal ferroptosis by degrading ferritin and induces early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats

LIANG Yidan, QIN Wang, HUANG Hao, XIN Yuanjun, ZHAO Jun, XIANG Xiang, WU Xintong, HE Zhaohui
Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of suppressing autophagy on the recovery of early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats, and to reveal the mechanism in which autophagy promotes neuronal ferroptosis and then affects EBI. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, SAH group, SAH+LV-ATG5 group and SAH+LV-Scramble group, with 12 animals in each group. Rat model of SAH were established by intravascular puncture. Lentiviral vector LV-ATG5 targeting autophagy-related gene 5 (ATG5) was constructed to inhibit autophagy. Immunofluorescence assay was used to detect the expression and location of ATG5, ferritin heavy polypeptide 1 (FTH1) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in neurons in 24 h after SAH establishment. The mRNA expression of ATG5 was detected by PCR, and the protein expression of ATG5, LC3Ⅱ/Ⅰ, FTH1 and GPX4 were detected by

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81870927)
[**通信作者**] 何朝晖,E-mail:geno_he@163.com
[**网络首发**] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.r.20190411.1707.003.html

Western blotting. The changes of neuronal morphology and function were detected by Nissl staining, and neurological score and brain water content were also detected. Intracellular iron deposition, iron content, malonaldehyde (MDA) content and GPX4 activity were measured to evaluate the ferroptosis. **Results** Immunofluorescence assay showed that ATG5, FTH1 and GPX4 were widely expressed in the cytoplasm of cortical neurons after SAH. The results of PCR and Western blotting indicated that the expression of ATG5 at mRNA and protein levels, and LC3II/I at protein level was significantly decreased ($P<0.05$), and autophagy was successfully inhibited. When autophagy was inhibited, Nissl staining showed improvements on neuronal morphology and function, neurological function score was improved ($P<0.05$), and brain water content was decreased ($P<0.05$). Western blot assay indicated that the expression levels of FTH1 and GPX4 were decreased after SAH ($P<0.05$), however, the levels were increased when autophagy was inhibited ($P<0.05$). Furthermore, autophagy inhibition also reduced iron deposition, and cellular labile iron and MDA contents ($P<0.05$), and also elevated GSH content and GPX4 activity ($P<0.05$). **Conclusion** Autophagy may promote neuronal ferroptosis by degrading ferritin, result in cellular labile iron increase, and finally early brain injury.

[**Key words**] subarachnoid hemorrhage; early brain injury; autophagy; ferroptosis; ferritin

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of China (81870927). Corresponding author: HE Zhaohui, E-mail: geno_he@163.com

早期脑损伤(early brain injury, EBI)是指蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后 72 h 内发生的一系列病理生理变化,也是其高致死率和致残率的重要原因[1],文献报道[2-3]SAH 后早期脑皮质中的自噬随即显著加强,并在 EBI 的整个阶段持续存在。铁死亡是一种新型程序性细胞死亡方式,主要特征是细胞内过量的铁沉积诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积、细胞内抗氧化剂谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭以及清除脂质 ROS 所需的谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)表达减少、活性降低[4]。课题组前期研究发现[5],SAH 后神经元内游离铁含量增加,进而导致了铁死亡,它可能是导致 SAH 后 EBI 的又一重要病理机制。

自噬和铁死亡均被证实参与 SAH 后 EBI 的病理过程,然而,此过程中二者的关系以及其相互作用机制尚不清楚。铁稳态对维持细胞的正常结构和功能起关键作用,细胞中的游离铁储存在铁蛋白(ferritin)中,铁蛋白重链 1(ferritin heavy polypeptide 1, FTH1)是铁蛋白的重要组成部分[6]。HOU 等[6]和 GAO 等[7]通过离体细胞实验报道了自噬和铁死亡在基因层面的关系——自噬通过降解铁蛋白导致细胞内游离铁含量增加,从而激活铁死亡。这种以铁蛋白为降解底物的特殊的自噬途径被称为铁自噬(ferrotinophagy),是一种自噬性细胞死亡方式(autophagic cell death)。SAH 后早期自噬即被激活,但它是否通过降解神经元内铁蛋白,进而诱导神经元铁死亡,仍需进一步探明。本实验拟探究 SAH 后自噬和铁死亡的关系,揭示自噬影响神经元铁稳态并最终导致神经元死亡的具体机制,旨在对 SAH 后自噬的作用进行更为客观的分析,为临床治疗提供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

实验动物为健康成年 SD 大鼠,体质量 280~320 g,购于重庆医科大学动物实验中心。大鼠随机抽签法分为假手术组(Sham 组)、蛛网膜下腔出血组(SAH 组)、蛛网膜下腔出血+空载病毒组(SAH+LV-Scramble 组)、蛛网膜下腔出血+慢病毒抑制自噬组(SAH+LV-ATG5 组),每组 12 只。

1.2 药品与试剂

用于沉默自噬相关基因 5(autophagy-related gene 5, ATG5)的慢病毒(LV-ATG5)和对照慢病毒(LV-Scramble)由上海吉玛制药有限公司合成,其序列为:5′-GAAGGTTATGAGACAAGAAGA-3′。试剂:ATG5 抗体(Cell Singnaling Technology 公司,美国)、LC3Ⅱ/Ⅰ抗体(Cell Singnaling Technology 公司,美国)、FTH1 抗体(Cell Singnaling Technology 公司,美国)、GPX4 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、β-actin 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、神经元核抗原 NEUN 抗体(Monoclonal 公司,美国)、荧光二抗(山羊抗兔抗体,山羊抗小鼠抗体,武汉三鹰生物技术有限公司)、荧光定量 PCR 相关试剂(Takara 公司,日本)、尼氏(Nissl)染色液(碧云天生物技术有限公司),组织铁含量测定试剂盒、GSH 试剂盒、脂质过氧化物产物丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒、GPX4 活性试剂盒均购于南京建成生物试剂公司。

1.3 SD 大鼠 SAH 模型构建

采用 SURUKI 等[8]报道的血管内穿刺法构建 SAH 模型,选用戊巴比妥(50 mg/kg)通过腹腔注射麻醉大鼠,使其仰卧位固定,取正中切口暴露和分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。于颈外动脉远端结扎并切断颈外动脉,上静脉夹于颈内动脉及颈总动脉以阻断血流,并于颈外动脉残端作一“V”形切口,再将 4-0 尼龙线沿切口导入,经颈总动脉至颈内动脉颅内段,自觉有阻力感后继续进线 0.2 cm,有落空感即为穿刺成功。10 s 后抽出尼龙线,结扎颈外动脉残端并缓慢松开静脉夹,缝合伤口。假手术组操作方法同模型组,但尼龙线穿入后不刺破血管。

1.4 慢病毒侧脑室注射

自噬相关(Atg)基因在自噬的介导中起着重要作用。其中,Atg5 对自噬体的形成至关重要[7],因此选择用 LV-ATG5 沉默 ATG5 mRNA 的表达,从而抑制自噬。在 SAH 手术前 7 d,于 SD 大鼠侧脑室内注射 LV-ATG5 或 LV-Scramble。简言之,腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)使大鼠麻醉并置于立体定位装置(Stoelting,美国)中。于右半球前囟旁 1.3 mm,后 1.5 mm 处钻 1 个孔,将 10 μL Hamilton 注射器(Hamilton Co.,美国)通过立体定位插入到为侧脑室注射准备的孔中(硬脑膜表面下 3.8 mm)。将 5 μL LV-ATG5(1×10^9 TU/mL)或 LV-Scramble(1×10^9 TU/mL)以 0.5 μL/min 的速度注入右半球。将针保持在适当位置 5 min 以防止回流,然后缓慢取出。

1.5 指标检测及方法

1.5.1 免疫荧光检测 大鼠于 SAH 后 24 h 用生理盐水、4%多聚甲醛灌注后取出脑组织,经后固定、脱水后冻存于-80 ℃,而后制作成 10 μm 厚的冰冻切片备用。取出晾干 10 min,PBS 洗片 3 次,每次 10 min;0.5%Triton 破膜 2 h 后洗片 3 次,每次 10 min;枸橼酸盐溶液修复后自然冷却,洗片 3 次,每次 10 min;山羊血清 37℃孵育 2 h 后,擦干周围多余血清,滴加目的蛋白一抗和 NEUN 一抗 4 ℃过夜。次日 37 ℃复温 1 h 后洗片 3 次,每次 10 min,滴加绿色与红色荧光二抗于 37 ℃孵育 2 h 后洗片 3 次,每次 10 min;DAPI 染核 10 min 后洗片 5 次,每次 10 min,甘油封片后观察 ATG5、FTH1 和 GPX4 在 SAH 24 h 后脑皮质的表达定位情况。

1.5.2 Real-time PCR 检测 按 Takara 公司说明书提取各组大鼠大脑皮质总 RNA,用于 PCR 检测。引物购于上海生工,根据 GenBank 提供的基因序列,扩增大鼠 ATG5 mRNA 引物为 Forward:5′- TGAACGAGA-AGCAGAGCCATAC-3′,Reverse:5′-TGTGATGTTCCAA-GGCAGAGC-3′,扩增长度 220 bp,参考基因 β-actin 引物序列为 Forward:5′-TGTCACCAACTGGGACGATA-3′,Reverse:5′-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3′。扩增条件为预变性 95 ℃ 30 s,PCR 反应 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,40 个循环。

1.5.3 Western blot 检测 既往研究报道,SAH 后 24 h 自噬出现高峰,其标志蛋白 LC3 Ⅱ 表达量达到最高[3]。因此选择 24 h 作为干预时间点,以判断 LV-ATG5 对沉默 ATG5 和抑制自噬的效果。细胞内富余的游离铁以铁蛋白形式储存,而 FTH1 是细胞内铁蛋白的重要组成部分,也是反映细胞内铁稳态的关键指标。GPX4 是调控铁死亡的重要蛋白,铁死亡发生时 GPX4 的表达减少、活性降低。于 SAH 后 24 h 将脑组织取出,置于 EP 管中冻存于-80 ℃。分别称取各组皮质 0.2 g 于 EP 管中,每管加入组织裂解液和蛋白酶抑制剂混合液 600 μL,超声打碎组织后于冰上静置 20 min。4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 BCA 试剂盒侧浓度后稀释为同一浓度标准,煮沸 5~8 min,3 000 r/min 离心 1 min 后加样。凝胶电泳后将蛋白转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h 后置于一抗中 4 ℃过夜。次日洗膜 3 次,每次 10 min,然后滴加二炕孵育 1 h,再洗膜 3 次,每次 10 min。滴加 ECL 发光液后即可显影,用 Fusion 软件分析条带灰度值。

1.5.4 早期脑损伤指标及检测方法 ①神经行为学评分:参照 SUGAWARA 等[9]的方法,在 SAH 后 24 h(动物被处死前)使用 Modified Garcia Scale 以盲法评估神经功能缺损情况。通过这个总分为 18 分的评分系统,测试了以下 6 个项目:自主活动,四肢自主运动,前肢伸展性,攀爬运动,肢体的本体感觉以及触须反应。得分越低提示神经功能缺损情况越严重;②干湿法测定脑水含量:脑水含量通过 HE 等[10]报道的标准干/湿法测量。

在 SAH 后 24 h 麻醉并处死大鼠,立即取出大脑并分离出左、右半球,小脑和脑干。去除表面血块、脑膜后,立即称量各脑区脑组织质量,即为湿质量,然后在烘箱中干燥 24 h 后再次称取,获得干质量。脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100% 。

1.5.5 尼氏染色 将脑组织冰冻切片取出后放入双蒸水中洗 2 次,每次 2 min。然后将切片放入尼氏染色液中染色 10 min,蒸馏水洗涤 2 次,每次 5 s。之后在 95%的乙醇中脱水 5 s,70%的乙醇中脱水 2 次,每次 5 s,最后蒸馏水洗涤 1 次,中性树脂封片后在光镜下观察。

1.5.6 铁死亡检测及方法 铁死亡检测指标包括:细胞内铁沉积、组织铁含量、脂质过氧化物产物 MDA 含量、GSH 含量、GPX4 活性等[4,11-12]。①普鲁士蓝染

色(Koeppen's Perls' Prussian blue staining)检测细胞内铁沉积情况:SAH 后 24 h 大鼠脑组织用于普鲁士蓝染色。将脑组织制作成厚度为 10 μm 的石蜡切片,然后放入二甲苯Ⅰ和二甲苯Ⅱ中各 15 min;用 100%、95%、85%、80%、75%和 70%的乙醇溶液梯度水合各 1 min,放入 Perls′染色液(80 mL 20% HCl 和 80 mL 10%亚铁氰化钾)中浸泡 20~30 min 并用蒸馏水洗涤 3 次;HE 染色 1 min 后,置于 80%、85%、90%和 100%的乙醇溶液中快速梯度脱水,每次 5 s。最后用二甲苯固定切片,并用中性树脂封片;②用组织铁含量试剂盒、脂质过氧化物产物 MDA 试剂盒、GSH 试剂盒及 GPX4 试剂盒分别检测抑制自噬前后脑组织铁含量、脂质过氧化物含量、GSH 表达量以及 GPX4 活性的变化。以上检测具体步骤均参照厂家说明书。

1.6　统计学分析

所有数据运用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素分析,事后检验采用 Dunnett's 检验比较两组之间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　ATG5、FTH1 和 GPX4 在大鼠皮质神经元的定位

取大鼠 SAH 后 24 h 脑组织切片进行免疫荧光染色,结果显示:ATG5、FTH1 和 GPX4 在脑组织中广泛表达。采用神经元标记物 NEUN 分别与 ATG5、FTH1 和 GPX4 进行荧光双染,发现三者均主要表达于神经元胞质中(图 1)。

2.2　自噬抑制及抑制自噬后神经元损伤、早期脑损伤的变化

2.2.1　LV-ATG5 干预后 ATG5 mRNA 和 ATG5、LC3Ⅱ蛋白表达情况

SAH 后 24 h 后,假手术组未见明显出血,SAH 组脑组织表面可见不同程度的明显出血(图 2A)。慢病毒干预后,与 SAH 组和 SAH+LV-Scramble 组比较,SAH+LV-ATG5 组 ATG5 mRNA 的表达显著降低($P<0.05$),SAH+LV-ATG5 组 ATG5 和 LC3Ⅱ/Ⅰ蛋白水平也明显降低($P<0.05$,图 2B~D),说明 LV-ATG5 有效地沉默了 ATG5 mRNA,从而达到了抑制自噬的目的。

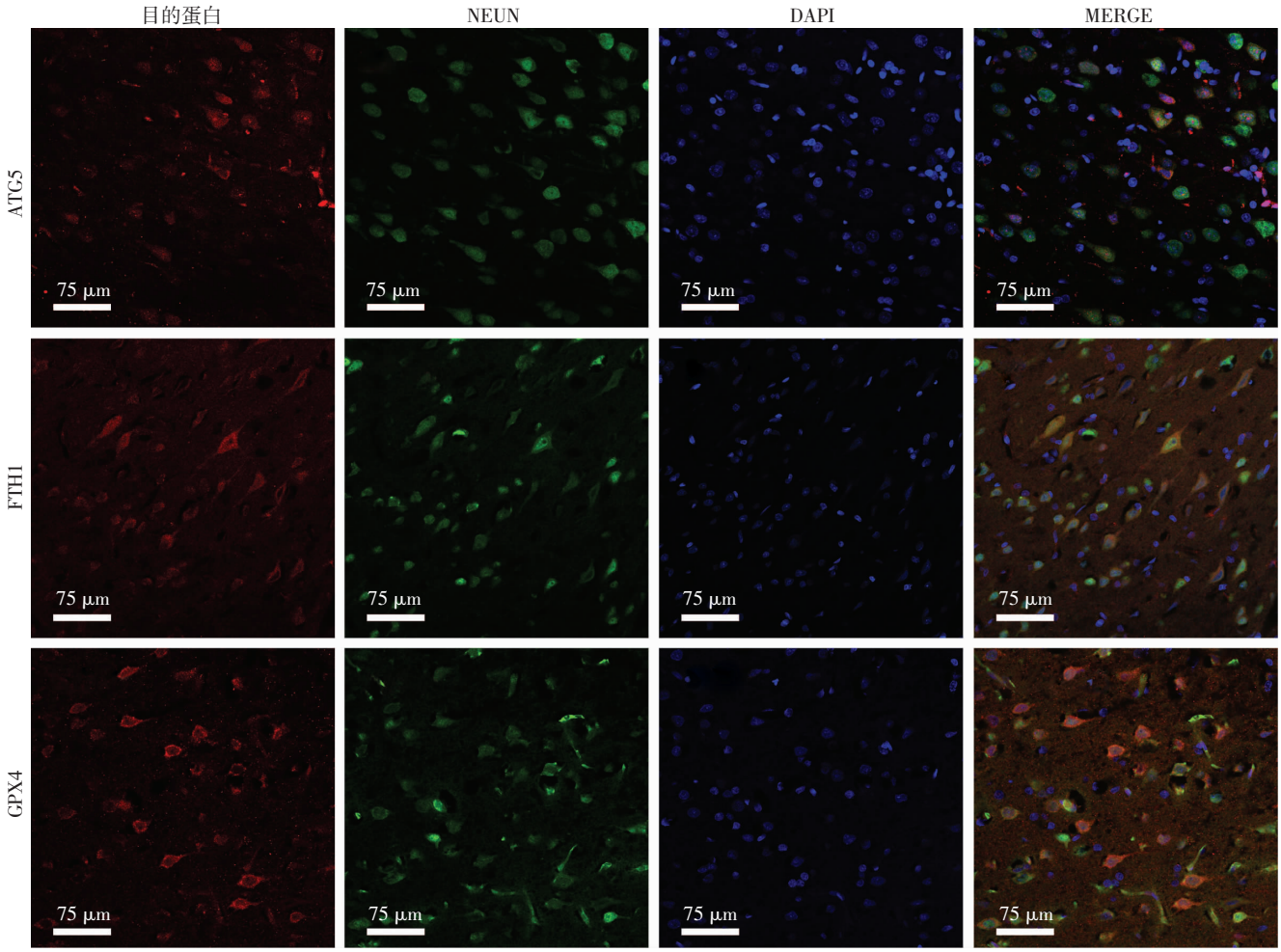


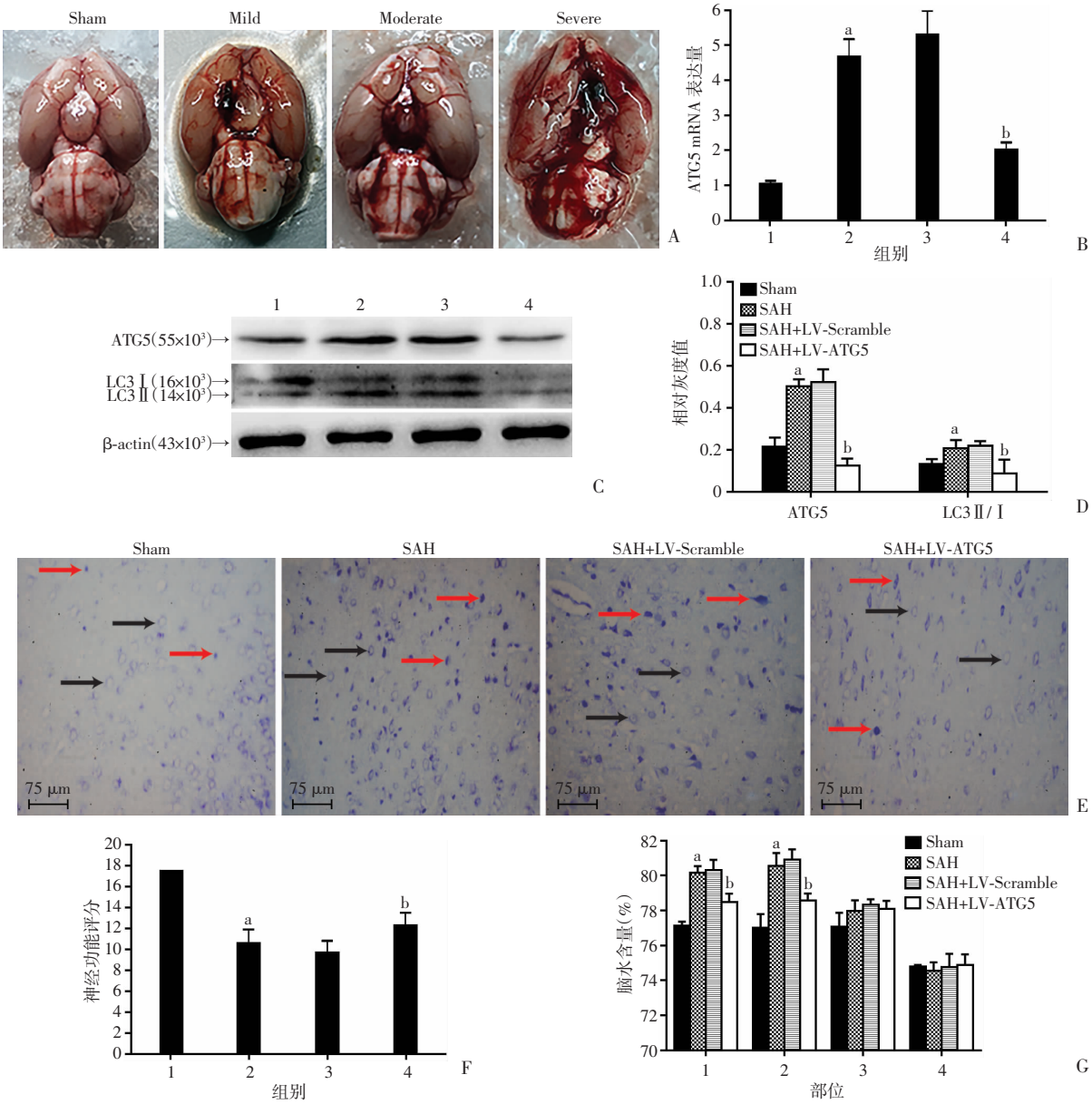
图 1　免疫荧光检测 ATG5、FTH1 和 GPX4 在大鼠皮质神经元中的表达定位情况

2.2.2　LV-ATG5 抑制自噬后神经元损伤的变化情况

尼氏体是神经元内合成蛋白质的重要部位,当神经元受到刺激后,胞质内的尼氏体数量、形态发生变化。在 Sham 组中,Nissl 染色显示神经元轮廓清晰,结构紧凑,富含胞质和尼氏体。然而,在 SAH 组和 SAH+LV-Scramble 组中观察到明显的神经元丢失和变性,神经元排列稀疏,轮廓模糊。抑制自噬显著增加了存活神经元的数量,改善了神经元的形态(图 2E)。

2.2.3　LV-ATG5 抑制自噬后 EBI 变化情况的检测

神经行为学评分和脑水肿是反映 SAH 后 EBI 的重要指标。与 Sham 组相比,SAH 后 24 h 神经行为学评分显著降低,左右脑半球脑水含量明显增加($P<0.05$);而用 LV-ATG5 抑制自噬后,与 SAH 和 SAH+LV-Scramble 两组相比,神经行为学评分和脑水肿显著改善($P<0.05$,图 2F、G)。



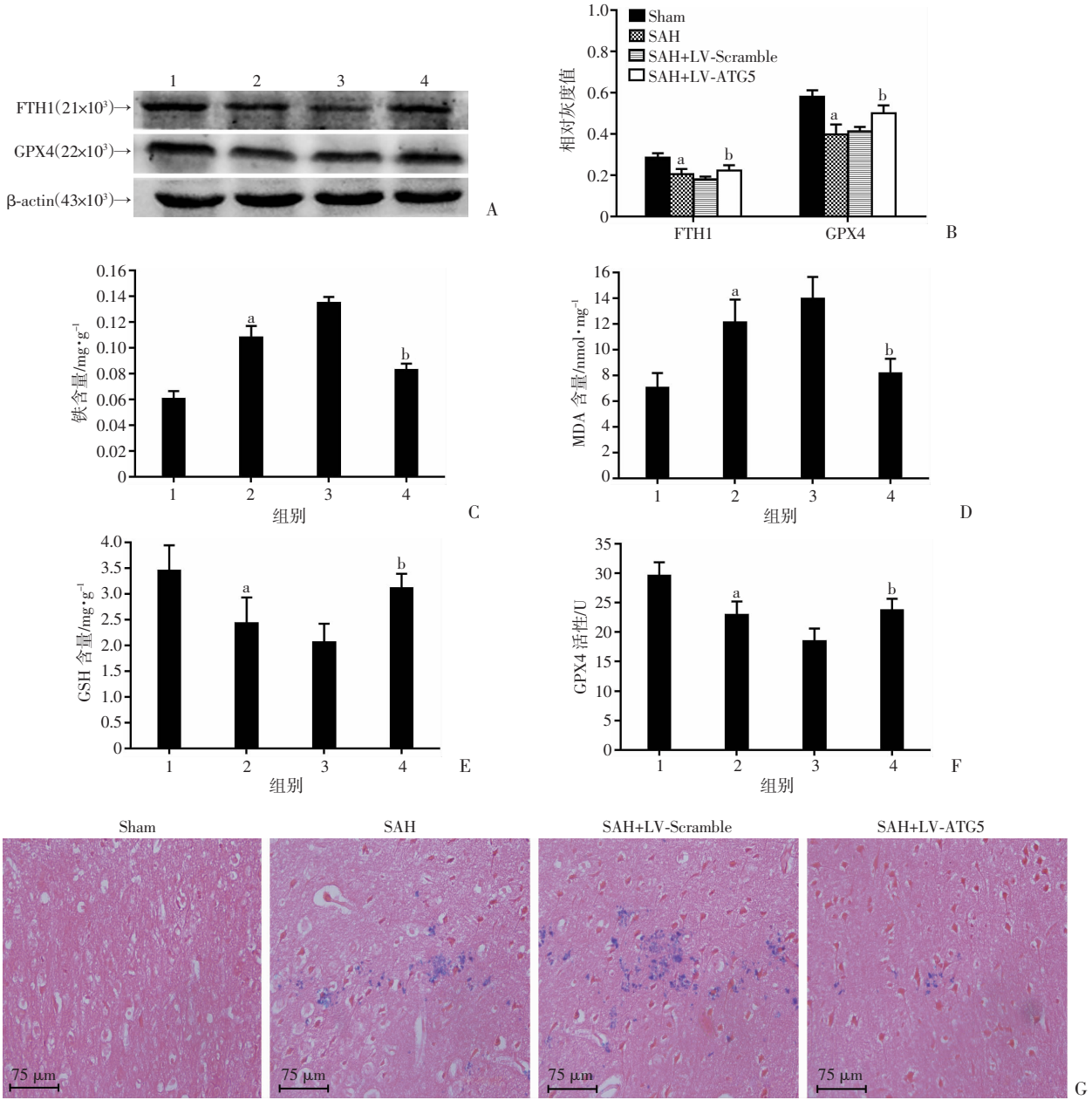
A:造模后,脑底部蛛网膜下腔出血程度的观察;B:PCR 检测 LV-ATG5 干预后,ATG5 mRNA 表达　1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH+LV-Scramble 组;4:SAH+LV-ATG5 组;C:Western blot 检测 LV-ATG5 干预后 ATG5 和 LC3 Ⅱ/Ⅰ蛋白表达　1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH+LV-Scramble 组;4:SAH+LV-ATG5 组;D:Western blot 半定量分析;E:Nissl 染色检测自噬抑制前后神经元的形态结构和存活情况　黑色箭头示正常神经元,红色箭头示受损神经元;F:自噬抑制前后神经行为学评分　1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH+LV-Scramble 组;4:SAH+LV-ATG5 组;G:自噬抑制前后脑水肿变化情况　1:左脑半球;2:右脑半球;3:小脑;4:脑干　a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH+LV-Scramble 组比较

图 2　自噬抑制及抑制自噬后神经元损伤、早期脑损伤的变化

2.3　抑制自噬前后通路相关蛋白及下游指标的变化

2.3.1　LV-ATG5 抑制自噬后铁代谢及铁死亡相关蛋白 FTH1 和 GPX4 的表达 SAH 后,FTH1 和 GPX4 的表达量明显下降($P<0.05$)。用 LV-ATG5 抑制自噬后发现,与 SAH 组和 SAH+LV-Scramble 组相比,SAH+LV-ATG5 组内 FTH1 和 GPX4 的表达量显著增加($P<0.05$,图 3A,B),铁蛋白的降解和铁死亡减轻。以上结果提示自噬参与调控细胞内铁代谢,通过降解细胞内铁蛋白从而诱导细胞铁死亡。

2.3.2　LV-ATG5 抑制自噬后铁死亡相关指标的变化 SAH 后,普鲁士蓝染色显示细胞内游离铁沉积明显增加,脑组织内游离铁含量、脂质过氧化物(MDA)含量明显增加,而 GSH 含量显著减少,GPX4 酶活性降低。与 SAH 组、SAH+LV-Scramble 组相比,SAH+LV-ATG5 组中普鲁士蓝染色提示细胞内铁沉积减少,脑组织内铁含量、脂质过氧化物(MDA)含量减少($P<0.05$),而 GSH 含量和 GPX4 酶活性增加($P<0.05$,图 3C~G)。提示抑制自噬后,神经元内游离铁含量减少,铁死亡减轻。



A:Western blot 检测 LV-ATG5 干预前后 FTH1 和 GPX4 蛋白表达　1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH+LV-Scramble 组;4:SAH+LV-ATG5 组;B:Western blot 半定量分析;C~G:抑制自噬前后细胞内铁沉积、游离铁含量、MDA 含量、GSH 含量及 GPX4 活性　1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH+LV-Scramble 组;4:SAH+LV-ATG5 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH+LV-Scramble 组比较

图 3　自噬促进神经元死亡的通路相关蛋白及下游指标变化

3 讨论

自噬是一种进化保守的降解途径,在维持细胞稳态中起关键作用。自噬途径参与神经退行性变、脑缺血和创伤性脑损伤等多种中枢神经系统(CNS)疾病[13]。研究发现,自噬是介导 SAH 后 EBI 的关键病理机制之一。LEE 等[2]和 WU 等[14]报道了 SAH 后急性期神经元中的自噬途径即被激活并参与 SAH 后 EBI 的病理过程。

2012 年,DIXON 等[4]报道了一种新型程序性细胞死亡模式——铁死亡,其特征是谷胱甘肽(GSH)耗竭、GPX4 的失活,最终导致铁依赖的脂质过氧化物(lipid peroxidation,LPO)蓄积。有趣的是,新近研究发现自噬和铁死亡存在着重要联系。HOU 等[6]通过在永生化小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)、人胰腺癌细胞系(PANC1 和 PANC2.03)和人纤维肉瘤细胞系 HT-1080 中敲低 ATG5 和 ATG7,进而抑制自噬后发现,细胞内游离铁水平和脂质过氧化终产物(如 MDA)水平均显著下降,而细胞内稳定铁蛋白标志物 FTH1 的表达显著上升。其研究揭示了自噬和铁死亡在基因层面的关系,自噬通过降解铁蛋白,增加细胞内游离铁含量,从而促进细胞内 LPO 蓄积,随后铁死亡发生。GAO 等[7]在随后的研究里进一步证实了此种关系。这种以铁蛋白为降解底物的特殊自噬途径被称为铁自噬(ferrotinophagy)[6,7,15],是一种自噬性细胞死亡方式(autophagic cell death),它极大地引起了我们的兴趣。铁死亡被证实参与神经退行性变、缺血/再灌注损伤和癌症等疾病的病理过程[16],而自噬可以通过促进铁蛋降解诱发铁死亡,由此大家把目光转向了铁自噬,以期通过调节铁自噬达到治疗上述疾病的目的。近年来铁自噬在神经退行性变、肿瘤和感染性疾病中均有研究[17-19],其相关性也得到了直接或间接的证实。

课题组前期研究发现[5],SAH 后神经元内游离铁含量增加,铁死亡发生并加重 EBI。有研究发现[2,14],SAH 后早期阶段同侧额-基底皮质的自噬活性显著增加,且在 EBI 的过程中发挥深远影响。自噬和铁死亡均参与 SAH 后 EBI 的病理过程,但二者的关系和相互作用机制却鲜有报道。由此我们猜想,自噬可能通过降解神经元内铁蛋白,增加神经元内游离铁和脂质过氧化物含量,从而促进神经元铁死亡,加重 EBI。

本研究中,我们采用免疫荧光双标法发现 SAH 后 24 小时 ATG5、FTH1、GPX4 均在大鼠脑皮质神经元内广泛表达,采用 Lentivirus-ATG5(LV-ATG5)有效抑制自噬后,SAH 模型大鼠脑皮质神经元损伤、神经功能缺损情况明显改善,脑水肿减轻,提示 SAH 后早期抑制自噬达到了减轻脑损伤的作用。为进一步明确 SAH 后自噬引起神经元铁死亡的可能机制,我们分别检测了铁蛋白和铁死亡的相关指标,本研究结果表明抑制自噬后可上调脑内 FTH1 和 GPX4 的表达,降低神经元内游离铁含量和 MDA 含量,增加 GSH 含量,提高 GPX4 活性,表明 SAH 后自噬可能通过降解铁蛋白促进神经元铁死亡。

目前自噬在细胞中的作用仍存在争议。在大多数条件下,自噬作为一种促生存机制,对细胞起正向保护作用[20]。另一方面,新近研究报道,在某些特定背景下,自噬也可能是促进细胞死亡的方式,即自噬性细胞死亡,如前述的自噬通过降解铁蛋白导致细胞铁死亡。对于自噬在中枢神经系统疾病中的作用也是富有争议性的。部分学者[21-23]认为 SAH 后自噬通过抑制神经元凋亡等途径减轻 EBI,但也有学者在脑缺血、脑缺氧、外伤性脑出血模型中报道了抑制自噬后神经元死亡减少,神经功能改善的现象[24-26]。

本研究通过从基因层面抑制自噬,达到了改善神经元死亡,减轻 SAH 后 EBI 的效果。通过对其具体机制的进一步探索发现,自噬可能通过降解神经元内铁蛋白,从而促进神经元铁死亡,加重 EBI。但对于自噬在 SAH 中的作用仍不可一概而论,需根据其作用背景对其作用进行更为客观、全面的分析。本研究旨在探明自噬在 SAH 后促进神经元铁死亡的方式,将对阻断神经元铁死亡从而改善 SAH 患者的预后提供重要依据。实验仍存在一些不足之处,如未对更深入、具体的机制进行探索,EBI 的检测时间点较单一等。在后期的实验中,我们将对自噬促进神经元铁死亡的具体通路进行深入研究。

参考文献:

[1] SEHBA F A, HOU J, PLUTA R M, *et al*. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Prog Neurobiol, 2012, 97(1): 14-37. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.02.003.

[2] LEE J Y, HE Y, SAGHER O, *et al*. Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Brain Res, 2009, 1287: 126-135. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.06.028.

[3] ZHAO H, JI Z, TANG D, *et al*. Role of autophagy in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 819-827. DOI: 10.1007/s11033-012-2120-z.

[4] 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): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

[5] 张红霞, 蒋登志, 车旭东, 等. 依布硒林减轻 DMT1 诱导的铁死亡在实验性大鼠蛛网膜下腔出血中的研究[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(16): 1618-1624. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201701128.
ZHANG H X, JIANG D Z, CHE X D, *et al*. Ebselen relieves ferroptosis induced by divalent mental transporter 1 in rats with subarachnoid hemorrhage[J]. J Third Mil Med Univy, 2017, 39(16): 1618-1624. DOI:10.16016/j.1000-5404.201701128.

[6] HOU W, XIE Y, SONG X, *et al*. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin[J]. Autophagy, 2016, 12(8): 1425-1428. DOI: 10.1080/15548627.2016.1187366.

[7] GAO M, MONIAN P, PAN Q, *et al*. Ferroptosis is an autophagic cell death process[J]. Cell Res, 2016, 26(9): 1021-1032. DOI: 10.1038/cr.2016.95.

[8] SUZUKI H, HASEGAWA Y, KANAMARU K, *et al*. Mechanisms of osteopontin-induced stabilization of blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Stroke, 2010, 41(8): 1783-1790. DOI: 10.1161/strokeaha.110.586537.

[9] SUGAWARA T, AYER R, JADHAV V, *et al*. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model[J]. J Neurosci Methods, 2008, 167(2): 327-334. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.08.004.

[10] HE Z, OSTROWSKI RP, SUN X, *et al*. CHOP silencing reduces acute brain injury in the rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2012, 43(2): 484-490. DOI: 10.1161/strokeaha.111.626432.

[11] 关鹏, 石振华, 李亚青, 等. 铁死亡:一种新的细胞死亡方式[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(02): 137-140.
GUAN P, SHI Z H, LI Y Q, *et al*. Ferroptosis: a new kind of cell death[J]. Prog Biochem and Biophys, 2013, 40(2): 137-140.

[12] XIE Y, HOU W, SONG X, *et al*. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.

[13] SHI L, LIANG F, ZHENG J, *et al*. Melatonin regulates apoptosis and autophagy *via* ROS-MST1 pathway in subarachnoid hemorrhage[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 93. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00093.

[14] WU H, NIU H, WU C, *et al*. The autophagy-lysosomal system in subarachnoid haemorrhage[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(9): 1770-1778. DOI: 10.1111/jcmm.12855.

[15] MANCIAS J D, WANG X, GYGI S P, *et al*. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy[J]. Nature, 2014, 509(7498): 105-109. DOI: 10.1038/nature13148.

[16] SANTANA-CODINA N, MANCIAS J D. The role of NCOA4-mediated ferritinophagy in health and disease[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2018, 11(4). DOI: 10.3390/ph11040114.

[17] DO VAN B, GOUEL F, JONNEAUX A, *et al*. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC[J]. Neurobiol Dis, 2016, 94: 169-178. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.05.011.

[18] BAUCKMAN K A, MYSOREKAR I U. Ferritinophagy drives uropathogenic Escherichia coli persistence in bladder epithelial cells[J]. Autophagy, 2016, 12(5): 850-863. DOI: 10.1080/15548627.2016.1160176.

[19] ROCKFIELD S, FLORES I, NANJUNDAN M. Expression and function of nuclear receptor coactivator 4 isoforms in transformed endometriotic and malignant ovarian cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(4): 5344-5367. DOI: 10.18632/oncotarget.23747.

[20] MASALDAN S, CLATWORTHY SAS, GAMELL C, *et al*. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis[J]. Redox Biol, 2018, 14: 100-115. DOI: 10.1016/j.redox.2017.08.015.

[21] JING C H, WANG L, LIU P P, *et al*. Autophagy activation is associated with neuroprotection against apoptosis via a mitochondrial pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neuroscience, 2012, 213: 144-153. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.055.

[22] FANG Y, CHEN S, REIS C, *et al*. The role of autophagy in subarachnoid hemorrhage: an update[J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(9): 1255-1266. DOI: 10.2174/1570159x15666170406142631.

[23] HO W M, AKYOL O, REIS H, *et al*. Autophagy after subarachnoid hemorrhage: can cell death be good? [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(9): 1314-1319. DOI: 10.2174/1570159x15666171123200646.

[24] WEN Y D, SHENG R, ZHANG L S, *et al*. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 762-769. DOI: .

[25] KOIKE M, SHIBATA M, TADAKOSHI M, *et al*. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2): 454-469. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070876.

[26] XING S, ZHANG Y, LI J, *et al*. Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction[J]. Autophagy, 2012, 8(1): 63-76. DOI: 10.4161/auto.8.1.18217.

(**收稿**:2019-02-25;**修回**:2019-03-21)

(编辑 吴培红)