DOI:10.16016/j.2097-0927.202302069

Rasd1 促进少突胶质细胞铁死亡加重大鼠蛛网膜下腔出血后白质损伤

傅汶桥,车旭东,谭嘉禾,崔仕振,马寅瑞,徐代棋,龙海波,杨小林,文唐敏,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** 探索 Rasd1(ras related dexamethasone induced 1)在 SD 大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后通过神经元-少突胶质细胞间通讯参与白质损伤(white matter injury,WMI)的机制。**方法** 将 90 只雄性 SD 大鼠(体质量 180~250 g)采用随机抽签的方法分为假手术组、SAH 组、SAH+LV-NC 组、SAH+LV-Rasd1 组和 SAH+sh-Rasd1 组,最终每组 12 只。利用血管内穿刺法构建大鼠在体 SAH 模型,侧脑室注射 Rasd1 基因过表达/敲低慢病毒,神经行为学评分检测神经功能变化,透射电镜检测胼胝体区域髓鞘脱失情况和少突胶质细胞铁死亡的发生情况,普鲁士蓝染色检测铁沉积,试剂盒检测丙二醛(malonic dialdehyde,MDA)和谷胱甘肽(glutathione,GSH),PCR 检测 Rasd1 mRNA 的表达情况,Western blot 检测核受体辅激活蛋白 4(nuclear receptor coactivator 4,NCOA4)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)、2',3'-环腺苷酸-3'-磷酸二酯酶(2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase,CNPase)和铁蛋白(Ferritin)的表达。**结果** SAH 后,Rasd1 升高($P<0.01$)并主要表达于皮层神经元中,出现髓鞘脱失,少突胶质细胞铁死亡;过表达 Rasd1 后,大鼠神经行为学评分显著降低,髓鞘脱失、少突胶质细胞铁死亡和铁沉积明显加重,MDA 升高($P<0.01$)、GSH 下降($P<0.01$)、NCOA4 升高($P<0.01$)、Ferritin 和 GPX4 下降($P<0.01$);敲低 Rasd1 后,大鼠神经行为学评分明显升高,髓鞘脱失、少突胶质细胞铁死亡和铁沉积显著减轻,MDA 下降($P<0.01$)、GSH 升高($P<0.01$)、NCOA4 下降($P<0.01$)、Ferritin 和 GPX4 升高($P<0.01$)。**结论** Rasd1 在蛛网膜下腔出血后通过铁自噬促进少突胶质细胞铁死亡,从而参与蛛网膜下腔出血后白质损伤。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;Rasd1;铁死亡;白质损伤

[中图法分类号] R341; R363.21; R743.35 [文献标志码] A

Rasd1 aggravates white matter injury after subarachnoid hemorrhage in rats by promoting ferroptosis in oligodendrocytes

FU Wenqiao, CHE Xudong, TAN Jiahe, CUI Shizhen, MA Yinrui, XU Daiqi, LONG Haibo, YANG Xiaolin, WEN Tangmin, HE Zhaohui Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the underlying mechanism in which Ras related dexamethasone induced 1 (Rasd1) is involved in white matter injury through neuron-oligodendrocyte communication after subarachnoid hemorrhage (SAH) in SD rats. **Methods** Ninety male SD rats (180~250 g) were randomly divided into sham operation group, SAH group, SAH+LV-NC group, SAH+LV-Rasd1 group and SAH+sh-Rasd1 group, with 12 rats in each group. Intravascular puncture was used to construct the rat model of SAH. Rasd1 overexpression/knockdown lentivirus was injected into the lateral ventricle. Neurobehavioral rating scale was used to observe the changes in neural function, transmission electron microscopy was employed to detect

[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:hezhaohui@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the myelin detachment in callosum region and the occurrence of ferroptosis in oligodendrocytes, and Prussian blue staining was applied to measure iron deposition. Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) contents were detected with corresponding reagent kits, Rasd1 mRNA level was detected by PCR, and protein levels of nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4), 2′,3′-cyclic-nucleotide 3′-phosphodiesterase (CNPase), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin were measured with Western blotting. **Results** SAH resulted in significantly highly expressed Rasd1, which was mainly distributed in the cortical neurons ($P<0.01$), myelin loss, and ferroptosis in oligodendrocytes. Rasd1 overexpression significantly reduced the neurobehavioral scores, but increased myelin loss, ferroptosis and iron deposition in oligodendrocytes, elevated MDA content ($P<0.01$) but decreased GSH content ($P<0.01$), and up-regulation of NCOA4 expression ($P<0.01$) and down-regulation of ferritin and GPX4 ($P<0.01$). However, Rasd1 knockdown reversed all above changes with statistical significances (all $P<0.01$). **Conclusion** Rasd1 promotes ferroptosis in oligodendrocytes through ferritinophagy, and then is involved in white matter injury after SAH.

[**Key words**] subarachnoid hemorrhage; Rasd1; ferroptosis; white matter injury

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81870927). Corresponding author: HE Zhaohui, E-mail: hezhaohui@hospital.cqmu.edu.cn

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage,aSAH)短时间内死亡率高,存活者长期致残,并伴有身心健康障碍。以往的研究主要集中在血管痉挛、迟发性脑缺血、脑积水等方面,而白质损伤(white matter injury,WMI)往往得不到足够的重视[1]。近年来,有研究报道蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)患者存在广泛的白质异常,与认知障碍相关。在SAH的啮齿动物模型中,早期就观察到WMI,其特征为髓鞘损失和白质水肿。因此,制定一系列针对WMI的治疗策略可能有助于改善SAH后不良预后[2]。

铁死亡是一种由铁超载引起的脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡,近年来已被广泛研究[3]。与疾病相关的多种细胞事件,如氧化应激和细胞代谢异常,铁死亡的调控在治疗耐药性肿瘤、创伤性损伤、炎症和神经退行性疾病方面具有很大的潜力[4]。尽管已经证明铁死亡参与SAH后早期脑损伤,但SAH后少突胶质细胞铁死亡的发生机制仍然未知。

Rasd1是Ras家族小G蛋白的一员,主要定位于大脑[5]。Rasd1在脂肪代谢、生物节律、焦虑障碍和神经毒性中起着重要作用[6-7]。已有研究报道,下调Rasd1与大鼠缺血性卒中后损伤的缓解密切相关[8],同时,Rasd1参与抑制脑cAMP-PKA-CREB通路,此外,少突胶质细胞被认为主要通过细胞内铁蛋白获取铁,而不是通过Tf/TfR1/DMT1通路摄取铁[9]。

本研究探索Rasd1通过铁自噬促进少突胶质细胞铁死亡进而参与白质损伤的机制,为进一步探讨蛛网膜下腔出血后的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

90只成年健康雄性SD大鼠,体质量180~250 g,购于重庆医科大学动物实验中心。将SD大鼠进行随机编号抽签,分为假手术(sham)组、蛛网膜下腔出血(SAH)组、SAH时间点组(6、12、24、48、72 h)、蛛网膜下腔出血+空载病毒(SAH+LV-NC)组、蛛网膜下腔出血+Rasd1过表达慢病毒(SAH+LV-Rasd1)组、蛛网膜下腔出血+Rasd1敲低慢病毒(SAH+sh-Rasd1)组,每组12只。在获取SD大鼠脑组织标本时参照MO等[10]的方法进行蛛网膜下腔出血严重程度评分,评分低于8分及在术中或术后非预期死亡的15只大鼠(SAH组3只、SAH+LV-NC组3只、SAH+LV-Rasd1组7只、SAH+sh-Rasd1组2只)不纳入实验分组。

1.2 药品与试剂

Rasd1过表达/敲低慢病毒和对照慢病毒购于上海吉玛制药有限公司。主要试剂:Rasd1抗体(Santa Cruz公司,sc-398988,美国),NeuN抗体(Abcam公司,ab177487,英国),Iba-1抗体(Abcam公司,ab178846,英国),GFAP抗体(Abcam公司,ab7260,英国),CNPase抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,13427-1-AP,中国),CC1抗体(Millipore公司,OP80,美国),NCOA4抗体(Affinity公司,DF4255,美国),ARA70抗体(Santa Cruz公司,sc-373739,美国),Ferritin抗体(Abcam公司,ab75973,英国),GPX4抗体(Abcam公司,ab125066,英国),β-actin抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,66009-1-1g,中国),Cy3荧光二抗(武汉三鹰生

物技术有限公司,SA00009-2,中国),Alexa Fluor488 荧光二抗(Abcam 公司,ab150113,英国),HRP-二抗(Cell Signaling Technology 公司,#7074/#7076,美国),荧光定量 PCR 相关试剂(MCE 公司,中国),MDA 和 GSH 试剂盒(南京建成生物试剂公司,中国),普鲁士蓝染色试剂盒(雷根生物技术有限公司,中国)。

1.3 SD 大鼠 SAH 模型构建

根据 XU 等[11]的方法构建在体 SAH 模型,经腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,取仰卧位固定,于颈部正中切口,分离并暴露颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,夹闭颈内动脉和颈总动脉,结扎颈外动脉并切断,用 4-0 尼龙线插入颈外动脉残端,同时将颈外动脉残端拉下使得尼龙线顺利进入颈内动脉至颅内,有阻力感后继续插入 2 mm,穿刺成功有落空感,10 s 后将尼龙线拔出,结扎颈外动脉残端并恢复颈总动脉、颈内动脉血流,缝合颈部正中接口并消毒,将大鼠置于电热毯上复苏苏醒。假手术组操作方法相同但不刺破血管。

1.4 慢病毒侧脑室注射

本实验选用 Rasd1 过表达/敲低慢病毒,根据 GERAERTS 的方法,在术前 7 d 通过大鼠侧脑室注射慢病毒 LV-Rasd1、sh-Rasd1 或 LV-NC。大鼠经腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉后固定在脑立体定位装置(Stoelting,美国),于前囟左侧旁开 1.3 mm,向后 1.5 mm 处予以微型电钻钻一小骨孔,将 10 μL 微量注射器(Hamilton,美国)插入到硬脑膜下 3.8 mm 至侧脑室,将 8 μL Rasd1 过表达病毒 LV-Rasd1(10^9 TU/mL)、8 μL Rasd1 敲低病毒 sh-Rasd1(10^9 TU/mL)或 8 μL 空载病毒 LV-NC(10^9 TU/mL)以 0.5 μL/min 的速度缓慢注入侧脑室,注射完毕后停留 3 min 以防止病毒回流,然后缓慢退出微量注射器并予以骨蜡封闭骨孔,最后缝合头皮并消毒。

1.5 神经行为学评分

根据 XIA 等[12]的方法,在 SAH 后 24 h 使用 Modified Garcia Scale 评估神经功能缺损情况,测试指标包括自主活动、四肢自主运动、前肢伸展性、攀爬运动、触须反应和肢体本体感觉,每项 0~3 分,总分 18 分,得分越低提示神经功能缺损情况越严重。

1.6 脑组织含水量测定

根据 XIA 等[12]的方法,在 SAH 后 24 h 处死大鼠并取出完整大脑组织,去除脑表面血块后称量,得到湿质量,放进烤箱(105 ℃)24 h 后取出称量得到干质量,脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.7 透射电镜观察

根据 PENG 等[13]的方法,在 SAH 后 24 h 将大鼠深麻醉并用 0.9%生理盐水经心脏进行灌注至肝脏变白,然后用 2.5%戊二醛继续灌注至大鼠四肢僵硬,取出脑组织,将胼胝体切成 1~2 mm^3 大小并固定于 2.5%戊二醛,室温避光 2 h 后移至 4 ℃保存。将组织置于 PBS 清洗 15 min 后经 1%锇酸固定 2~3 h,随后经 50%、70%、90%乙醇,90%乙醇:90%丙酮(1∶1),90%、100%丙酮梯度脱水,包埋切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅染色,最后,通过透射电子显微镜(Hitachi,日本)观察胼胝体区域髓鞘和少突胶质细胞。

1.8 普鲁士蓝染色

根据 LIANG 等[14]的方法,在 SAH 后 24 h 将大鼠深麻醉并先后用 0.9%生理盐水和 4%多聚甲醛灌注,取出脑组织固定于 4%多聚甲醛 48 h,然后经梯度脱水、透明、透蜡、包埋,最后制作成厚度为 4 μm 的石蜡切片。参照说明书,石蜡切片经脱蜡、水化,泡入 Perl's 染色液 30 min,蒸馏水漂洗 3 次后置入伊红染液 30 s,然后常规脱水透明并用中性树脂封片,最后用显微镜(Zeiss,德国)观察胼胝体区域铁离子沉积。

1.9 MDA、GSH 含量测定

参照南京建成试剂盒说明书,提取 SAH 后 24 h 大鼠脑皮层和胼胝体,制备 10%组织匀浆,通过比色法测定 MDA、GSH 含量。

1.10 免疫荧光检测

参照 TAO 等[15]的方法,在 SAH 后 24 h 将大鼠深麻醉并先后用 0.9%生理盐水和 4%多聚甲醛灌注,取出脑组织固定于 4%多聚甲醛 48 h,然后经蔗糖脱水、OCT 包埋、液氮速冻,最后用冷冻切片机制作成 8 μm 厚的切片。冰冻切片室温放置 30 min 后经 PBS 漂洗,泡入 37 ℃、0.5% Triton 破膜 30 min,经 10%山羊血清 37 ℃封闭 1 h,最后置于 4 ℃孵育一抗。12 h 后,将切片置于 37 ℃复温 30 min,经 PBS 漂洗 15 min,37 ℃孵育荧光二抗 1 h,最后用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片。通过激光共聚焦显微镜(Zeiss,德国)获得荧光图像。

1.11 Real-time PCR 检测

根据 CAO 等[16]的方法,提取大鼠大脑皮层和胼胝体的 RNA,引物购于 TaKaRa 公司,大鼠 Rasd1 引物正义链:5′-CATCTGGCAATCATCCGTTTC-3′,反义链:5′- TGTTCTTGAGACAGGACTTGGTG-3′,扩增长度为 156 bp,管家基因 β-actin 引物正义链:5′-ACGGTC-AGGTCATCACTATCG-3′,反义链:5′-GGCATAGAGG-TCTTTACGGATG-3′,扩增长度为 155 bp。逆转录程序按照 RT Master Mix for qPCR Ⅱ(MCE),DNA 扩增程序按照 SYBR Green qPCR Master Mix(MCE),预变性 95 ℃ 5 min,PCR 反应 95 ℃ 15 s、60 ℃ 60 s,共 40 个

循环。最后使用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行结果分析。

1.12 Western blot 检测

SAH 后 24 h 取出大鼠脑皮层和胼胝体,称取 100 mg 组织,加入 200 μL RIPA 和 2 μL PMSF,匀浆后置于冰上裂解 30 min,然后 4 ℃、12 000 r/min 离心 12 min,取蛋白上清液,BCA 法测浓度并调整为统一标准。将蛋白加至凝胶加样孔内,电泳后将凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上,然后 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,最后置于 4 ℃孵育一抗。12 h 后,PVDF 膜经 TBST 漂洗 30 min,置于室温孵育二抗 1 h,然后经 TBST 漂洗 30 min,最后滴加 ECL 化学发光液显影。条带灰度值用 Fusion 软件分析得到。

1.13 统计学分析

运用 GraphPad 9.3 进行统计分析,计数资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验,方差齐性检验采用 Brown-Forsythe 检验,两组间的差异比较采用 t 检验,多组间的差异比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

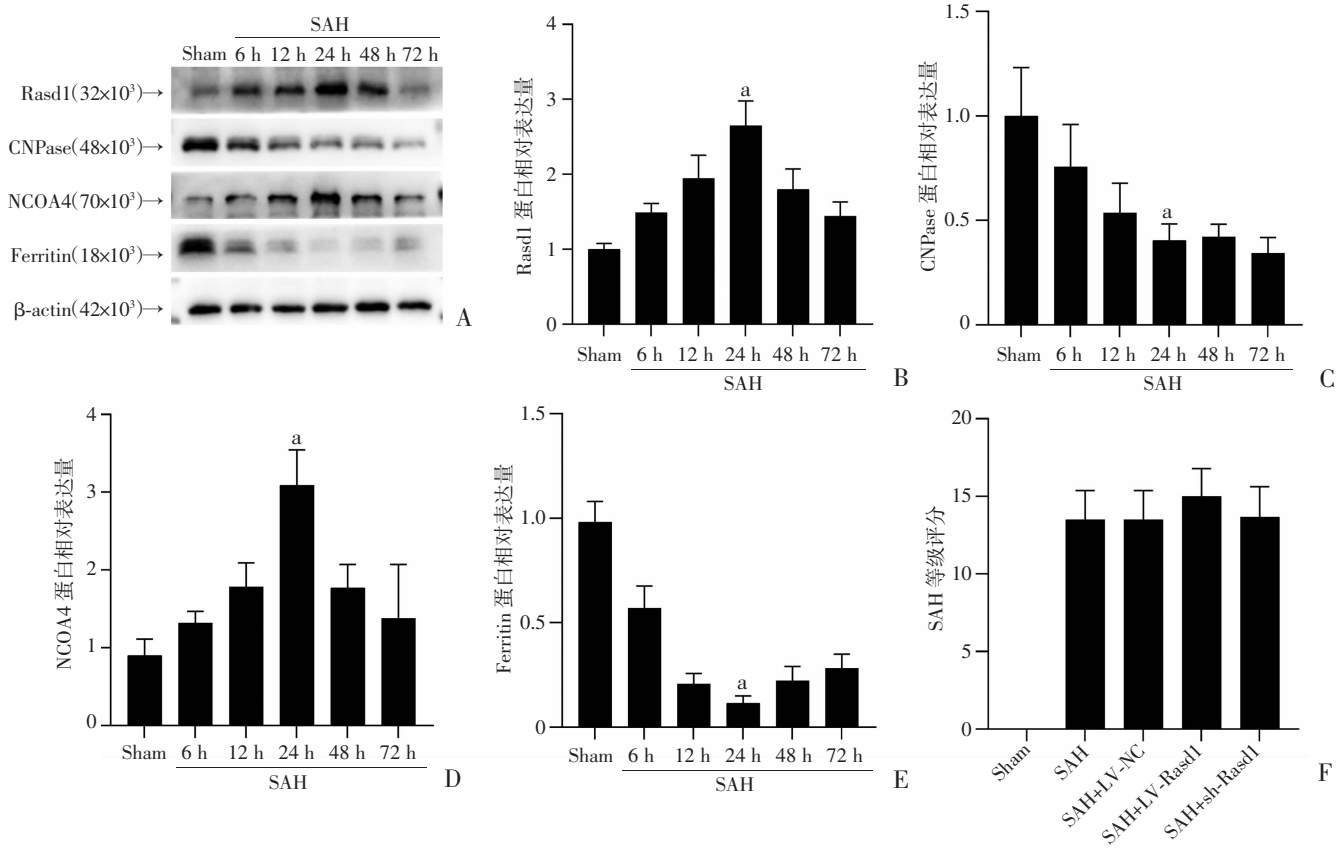
2 结果

2.1 蛛网膜下腔出血后 Rasd1、NCOA4 显著升高,Ferritin、CNPase 显著降低

与 sham 组相比,SAH 后 6、12、24、48、72 h Rasd1、NCOA4 的表达量先升高后下降($P<0.01$,图 1),于 SAH 后 24 h 达到峰值;而 Ferritin、CNPase 的表达量逐渐下降($P<0.01$,图 1)。

2.2 蛛网膜下腔出血后,Rasd1 主要定位于皮层神经元

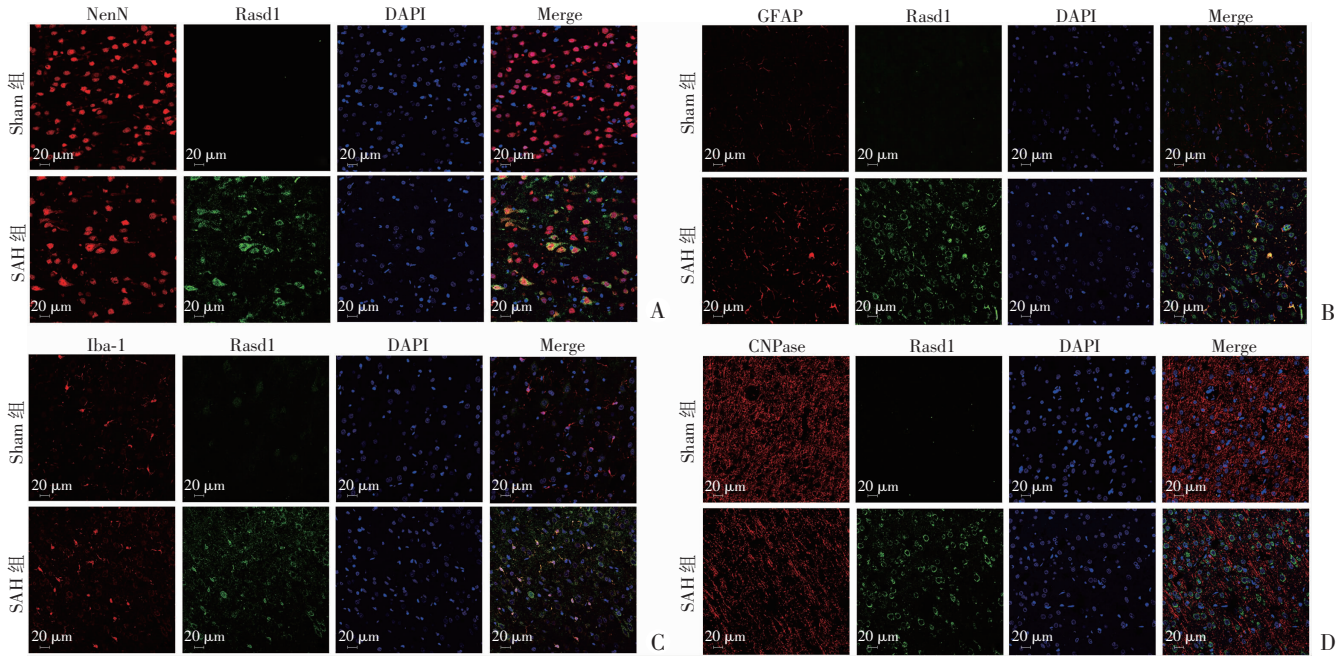
通过免疫荧光对 Rasd1 与神经元(NenN)、星型胶质细胞(GFAP)、小胶质细胞(Iba-1)、少突胶质细胞(CNPase)进行共定位分析,结果显示,Rasd1 在 SAH 后表达增加且主要定位于皮层神经元(图 2)。



a:$P<0.01$ 与 sham 组比较

A:Western blot 检测 SAH 后不同时间点各蛋白的表达变化;B~E:半定量分析;F:各组 SD 大鼠 SAH 评分

图 1 SAH 后 Rasd1、NCOA4、Ferritin、CNPase 蛋白在不同时间点的表达情况以及 SAH 等级评分



A:Rasd1 与神经元共定位;B:Rasd1 与星型胶质细胞共定位;C:Rasd1 与小胶质细胞共定位;D:Rasd1 与少突胶质细胞共定位

图 2 Rasd1 与神经元、星型胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞共定位分析

2.3 侧脑室注射慢病毒后,Rasd1 基因的变化

通过侧脑室注射慢病毒对 Rasd1 基因进行调节,Western blot、RT-PCR 结果显示,与 SAH+LV-NC 组相比,SAH+LV-Rasd1 组大鼠 Rasd1 mRNA 和蛋白水平显著上调;SAH+sh-Rasd1 组大鼠 Rasd1 mRNA 和蛋白水平显著下调($P<0.01$,图 3A~C)。说明慢病毒有效地对 SAH 后 Rasd1 基因进行了过表达/敲低。

2.4 抑制 Rasd1 表达可改善 SAH 后神经功能障碍

SAH 后,大鼠出现神经功能障碍和脑水肿。通过对 Rasd1 进行过表达/敲低,评估 SAH 后大鼠神经功能和检测脑组织含水量。结果表明,与 SAH+LV-NC 组相比,SAH+LV-Rasd1 组大鼠神经功能评分明显降低,脑水肿显著加重;SAH+sh-Rasd1 组大鼠神经功能明显好转,脑水肿显著减轻($P<0.01$,图 3D~F)。

2.5 抑制 Rasd1 表达可减轻 SAH 后白质损伤

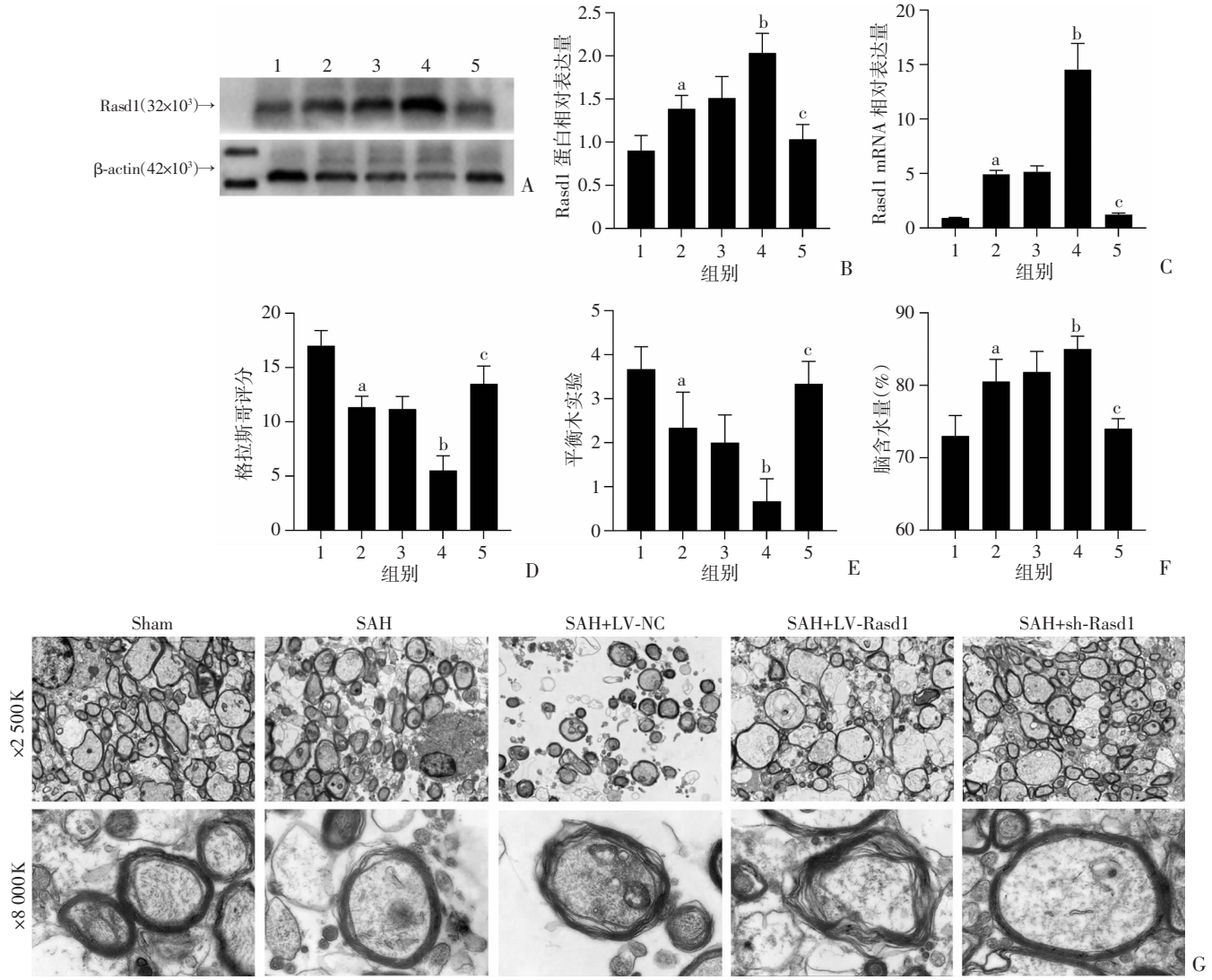
SAH 后,大鼠出现髓鞘肿胀、破裂等髓鞘脱失现象。通过对 Rasd1 进行过表达/敲低,评估 SAH 后大鼠髓鞘变化。Western blot 和透射电镜结果显示,与 SAH+LV-NC 组相比,SAH+LV-Rasd1 组大鼠 CNPase 蛋白水平明显下降,髓鞘密度更加稀疏,髓鞘微观结构损伤程度加重;SAH+sh-Rasd1 组大鼠 CNPase 蛋白水平显著上调,髓鞘密度增加,髓鞘微观结构损伤程度明显减轻($P<0.01$,图 3G)。

2.6 抑制 Rasd1 可减少 SAH 后少突胶质细胞铁死亡

SAH 后,大鼠胼胝体区域少突胶质细胞发生铁死亡。通过对 Rasd1 进行过表达/敲低,评估少突胶质细胞铁死亡发生情况,Western blot、透射电镜、普鲁士蓝染色结果显示,与 SAH+LV-NC 组相比,SAH+LV-Rasd1 组大鼠 NCOA4 蛋白水平明显升高,Ferritin 和 GPX4 蛋白水平明显下降,少突胶质细胞内线粒体嵴减少甚至消失、体积缩小,胼胝体区域铁沉积加重;SAH+sh-Rasd1 组大鼠 NCOA4 蛋白水平显著下降,Ferritin 和 GPX4 蛋白水平显著上升,少突胶质细胞内线粒体铁死亡样的改变明显缓解,胼胝体区域铁沉积缓解($P<0.01$,图 4)。

2.7 抑制 Rasd1 可降低 SAH 后氧化应激水平

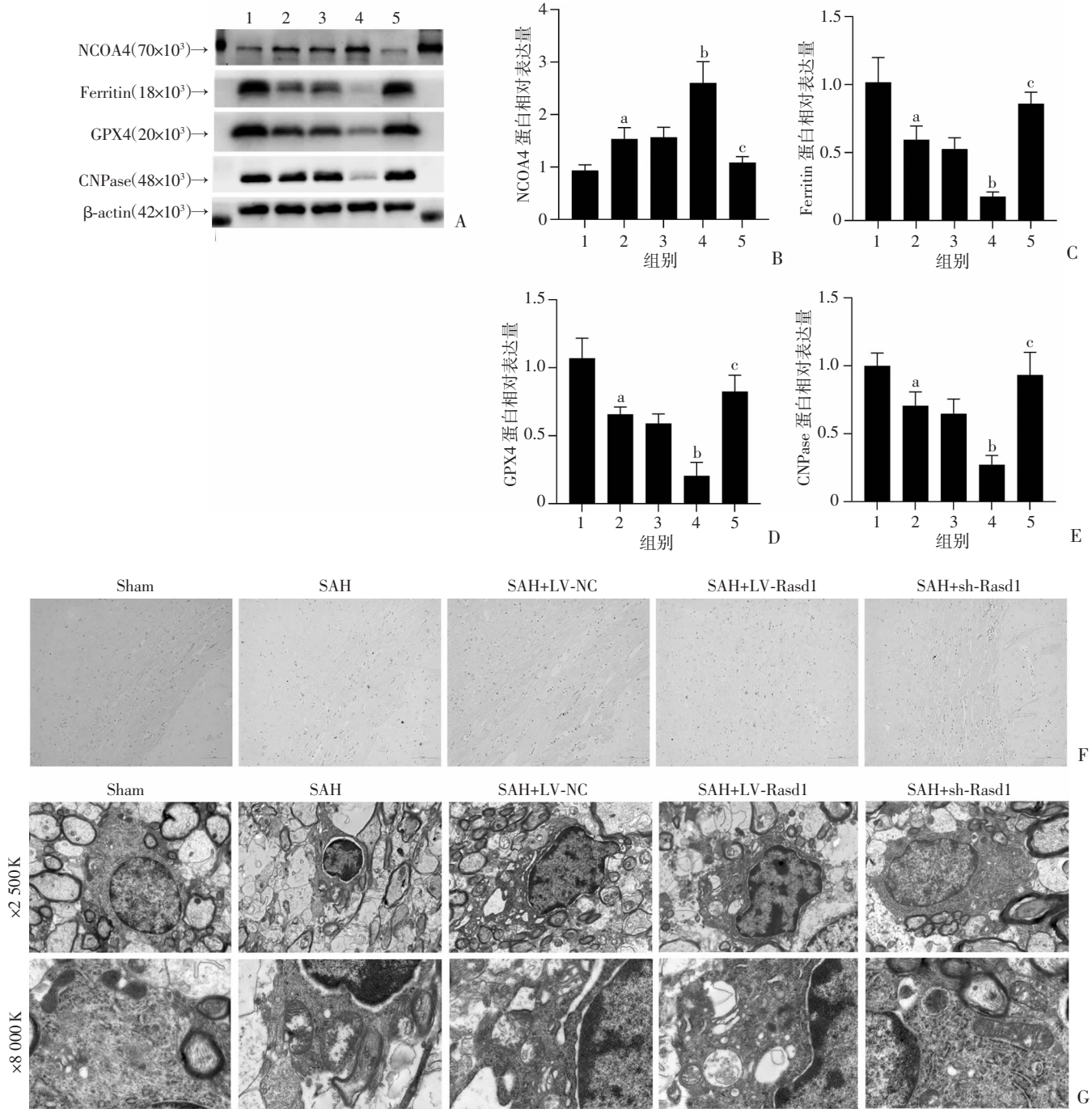
SAH 后,大鼠脑内氧化应激水平升高。通过对 Rasd1 进行过表达/敲低,测量氧化应激生化指标结果显示,与 SAH+LV-NC 组相比,SAH+LV-Rasd1 组大鼠脑组织 MDA 含量增加、GSH 含量减少,SAH+sh-Rasd1 组大鼠脑组织氧化应激水平明显下降($P<0.01$,图 5A、B)。



1:Sham 组; 2:SAH 组;3:SAH+LV-NC 组;4:SAH+LV-Rasd1 组;5:SAH+sh-Rasd1 组;a:$P<0.01$, 与 sham 组比较;b:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较;c:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较

A、B:Western blot 检测侧脑室注射慢病毒后 Rasd1 的表达变化及半定量分析;C:RT-PCR 检测侧脑室注射慢病毒后 Rasd1 mRNA 的变化;D:格拉斯哥评分;E:平衡木实验评分;F:脑组织含水量检测;G:透射电镜检测脑室注射慢病毒后大鼠脑胼胝体区域髓鞘变化情况

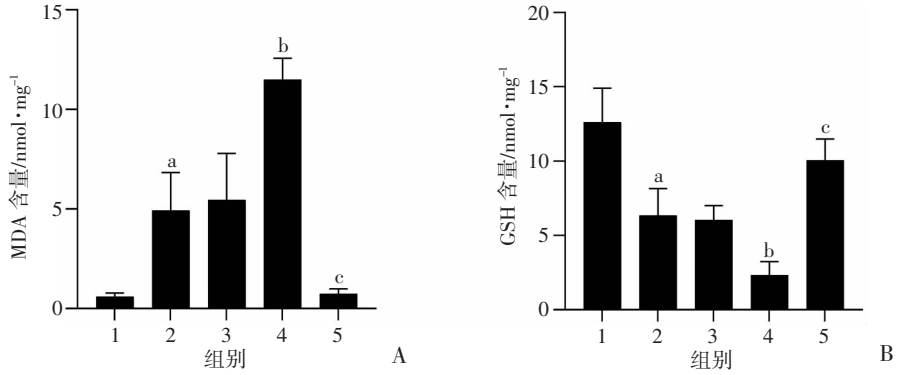
图 3 Rasd1 在 SAH 后神经功能、白质损伤中的作用



1:Sham 组; 2:SAH 组;3:SAH+LV-NC 组;4:SAH+LV-Rasd1 组;5:SAH+sh-Rasd1 组;a:$P<0.01$, 与 sham 组比较;b:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较;c:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较

A:Western blot 检测侧脑室注射慢病毒后 NCOA4、Ferritin、GPX4 和 CNPase 的表达变化;B~E:及半定量分析;F:普鲁士蓝染色检测胼胝体区域铁沉积(Scale bar=5 μm);G:透射电镜检测慢病毒注射后大鼠脑胼胝体区域髓鞘细胞内线粒体变化

图 4 Rasd1 在 SAH 后少突胶质细胞铁死亡中的作用



1:Sham 组; 2:SAH 组;3:SAH+LV-NC 组;4:SAH+LV-Rasd1 组;5:SAH+sh-Rasd1 组;a:$P<0.01$, 与 sham 组比较;b:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较;c:$P<0.01$, 与 SAH+LV-NC 组比较

A:侧脑室注射慢病毒后 MDA 的含量变化;B:侧脑室注射慢病毒后 GSH 的含量变化

图 5 Rasd1 对 SAH 后氧化应激水平的影响

3 讨论

本研究结果显示,SAH 后 24 h, Rasd1 达到峰值且主要位于皮层神经元,少突胶质细胞 NCOA4 增加,GPX4 和 Ferritin 减少。Rasd1 过表达增加了神经功能缺损、神经炎症和氧化应激,最终加重了白质损伤和铁自噬介导的少突胶质细胞铁死亡。但 Rasd1 的敲低逆转了上述效应。总的来说,本研究结果表明,在 SAH 大鼠模型中,Rasd1 通过促进少突胶质细胞铁自噬引发铁死亡,进而参与白质损伤。

据报道,白质损伤包括轴突损伤、髓鞘丢失和少突胶质细胞祖细胞分化障碍,导致认知、精神、知觉和运动缺陷[17-18]。目前的研究多集中在少突胶质细胞前体细胞成熟或死亡,极化的小胶质细胞或星形胶质细胞介导少突胶质细胞丢失,免疫缺陷影响少突胶质细胞发育,创伤直接减少少突胶质细胞数量[19]。尽管在 SCI、TBI 和 ICH 中有一些研究关注了 OLs 的死亡机制,但尚未有研究关注 SAH 后少突胶质细胞的内在死亡机制。

铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡,已被报道在神经疾病中参与多种发病机制。铁的异常积累可通过 Fenton 反应催化氧自由基,引起氧化应激损伤,最终发展为不可逆的神经损伤[20]。铁离子来源于膜受体运输的胞外铁和铁蛋白降解的胞内铁。本课题组发现 DMT1 介导的铁转运和铁自噬介导的 Ferritin 降解可导致神经元铁死亡[21]。

Rasd1 主要存在于大脑中,在昼夜节律控制、代谢性疾病、神经毒性和焦虑症中起着至关重要的作用[22]。研究表明,Rasd1 主要定位于神经元,位于 nNOS-CAPON 的下游,并参与 ERK 通路抑制和铁稳态。Rasd1 分别抑制 ERK-CREB-BDNF 通路和 PAP7-DMT1 通路[23]。所以,我们猜测,Rasd1 通过抑制 PKA-CREB-UCP2 通路使得神经元产生过量的 ROS,ROS 促进少突胶质细胞铁自噬,进而介导铁死亡。

综上所述,基于 SAH 后铁死亡和白质损伤之间的关系,本研究揭示了 Rasd1 可能通过神经元-少突胶质细胞间通讯介导 SAH 后少突胶质细胞铁死亡从而加剧 SAH 后白质损伤的作用机制。但本研究还存在一定的局限性,尚需要通过体外实验验证神经元与少突胶质细胞的相互作用机制和 SAH 后铁死亡的机制,以进一步阐明 SAH 后病理生理机制。

参考文献:

[1] LAWTON M T, VATES G E. Subarachnoid hemorrhage[J]. N Engl J Med, 2017, 377(3): 257-266. DOI: 10.1056/NEJMcp1605827.

[2] JIANG Y B, WEI K Y, ZHANG X Y, *et al*. White matter repair and treatment strategy after intracerebral hemorrhage[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(10): 1113-1125. DOI: 10.1111/cns.13226.

[3] TANG D L, KROEMER G. Ferroptosis[J]. Curr Biol, 2020, 30(21): R1292-R1297. DOI: 10.1016/j.cub.2020.09.068.

[4] LI J, CAO F, YIN H L, *et al*. Ferroptosis: past, present and future[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.

[5] FANG M, JAFFREY S R, SAWA A, *et al*. Dexras1: a G

protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase *via* CAPON[J]. Neuron, 2000, 28(1): 183-193. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)00095-7.

[6] CHENG H Y, OBRIETAN K, CAIN S W, *et al*. Dexras1 potentiates photic and suppresses nonphotic responses of the circadian clock[J]. Neuron, 2004, 43(5): 715-728. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.021.

[7] GREENWOOD M P, GREENWOOD M, MECAWI A S, *et al*. Rasd1, a small G protein with a big role in the hypothalamic response to neuronal activation[J]. Mol Brain, 2016, 9: 1. DOI: 10.1186/s13041-015-0182-2.

[8] WANG Y, DONG X H, LI Z Z, *et al*. Downregulated RASD1 and upregulated miR-375 are involved in protective effects of calycosin on cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. J Neurol Sci, 2014, 339(1/2): 144-148. DOI: 10.1016/j.jns.2014.02.002.

[9] QIAN Z M, KE Y. Brain iron transport[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019, 94(5): 1672-1684. DOI: 10.1111/brv.12521.

[10] MO J, ENKHJARGAL B, TRAVIS Z D, *et al*. AVE 0991 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis *via* Mas/PKA/CREB/UCP-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Redox Biol, 2019, 20: 75-86. DOI: 10.1016/j.redox.2018.09.022.

[11] XU P F, TAO C R, ZHU Y Y, *et al*. TAK1 mediates neuronal pyroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. J Neuroinflam, 2021, 18(1): 188. DOI: 10.1186/s12974-021-02226-8.

[12] XIA D Y, YUAN J L, JIANG X C, *et al*. SIRT1 promotes M2 microglia polarization via reducing ROS-mediated NLRP3 inflammasome signaling after subarachnoid hemorrhage[J]. Front Immunol, 2021, 12: 770744. DOI: 10.3389/fimmu.2021.770744.

[13] PENG J H, PANG J W, HUANG L, *et al*. LRP1 activation attenuates white matter injury by modulating microglial polarization through Shc1/PI3K/Akt pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Redox Biol, 2019, 21: 101121. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101121.

[14] LIANG Y D, DENG Y B, ZHAO J, *et al*. Ferritinophagy is involved in experimental subarachnoid hemorrhage-induced neuronal ferroptosis[J]. Neurochem Res, 2022, 47(3): 692-700. DOI: 10.1007/s11064-021-03477-w.

[15] TAO T, LIU G J, SHI X, *et al*. DHEA attenuates microglial activation *via* induction of JMJD3 in experimental subarachnoid haemorrhage[J]. J Neuroinflam, 2019, 16(1): 243. DOI: 10.1186/s12974-019-1641-y.

[16] CAO Y, LI Y, HE C, *et al*. Selective ferroptosis inhibitor liproxstatin-1 attenuates neurological deficits and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosci Bull, 2021, 37(4): 535-549. DOI: 10.1007/s12264-020-00620-5.

[17] 罗鹏, 费舟. 颅脑损伤相关创伤后应激障碍的研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2022(4): 487-490, 494.
PENG L, ZHOU F. Research advances in posttraumatic stress disorder following traumatic brain injury[J]. J Air Force Med Univ, 2022(4): 487-490, 494.

[18] CHAVALI M, ULLOA-NAVAS M J, PÉREZ-BORREDÁ P, *et al*. Wnt-dependent oligodendroglial-endothelial interactions regulate white matter vascularization and attenuate injury[J]. Neuron, 2020, 108(6): 1130-1145.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.09.033.

[19] MOUJALLED D, STRASSER A, LIDDELL J R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(7): 2029-2044. DOI: 10.1038/s41418-021-00814-y.

[20] FENG Z, MIN L X, CHEN H, *et al*. Iron overload in the motor cortex induces neuronal ferroptosis following spinal cord injury[J]. Redox Biol, 2021, 43: 101984. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101984.

[21] ZHANG H X, OSTROWSKI R, JIANG D Z, *et al*. Hepcidin promoted ferroptosis through iron metabolism which is associated with DMT1 signaling activation in early brain injury following subarachnoid hemorrhage[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9800794. DOI: 10.1155/2021/9800794.

[22] ZHANG Y, ZHU Z, LIANG H Y, *et al*. nNOS-CAPON interaction mediates amyloid-β-induced neurotoxicity, especially in the early stages[J]. Aging Cell, 2018, 17(3): e12754. DOI: 10.1111/acel.12754.

[23] SEOK J W, KIM D, YOON B K, *et al*. Dexras1 plays a pivotal role in maintaining the equilibrium between adipogenesis and osteogenesis[J]. Metabolism, 2020, 108: 154250. DOI: 10.1016/j.metabol.2020.154250.

(收稿:2023-02-13;修回:2023-03-17)

(编辑 吴培红)