



电子、语音版

·论著·

## 维生素D<sub>3</sub>对抗蛛网膜下腔出血后铁死亡减轻早期脑损伤的机制探索

刘尚硕<sup>1</sup>, 蒲亚陆<sup>2</sup>, 周文科<sup>1</sup>, 刁玉领<sup>1</sup>, 常海刚<sup>1</sup>, 张志永<sup>1</sup>, 王树仁<sup>1</sup>

1. 新乡医学院第一附属医院神经外科, 河南 卫辉 453100

2. 新乡医学院第一附属医院生命科学研究中心, 河南 卫辉 453100

**摘要:**目的 研究维生素D<sub>3</sub>(VitD<sub>3</sub>)对抗蛛网膜下腔出血(SAH)后铁死亡减轻早期脑损伤(EBI)的效果。方法 实验分为体内和体外两部分,分别使用54只健康雄性SD大鼠和高分化PC12细胞。大鼠随机分为空白组、Vehicle组、VitD<sub>3</sub>组,每组18只。采用血管内刺破法建立SAH模型。大鼠在造模前24 h接受VitD<sub>3</sub>(100 ng/kg)或Vehicle腹腔注射,造模成功后2 h再次注射,空白组仅予麻醉处理。PC12细胞随机分为空白组、Hemin组、DMSO组、VitD<sub>3</sub>组,使用氯化血红素(Hemin)模拟血红蛋白对神经元细胞的影响,DMSO组及VitD<sub>3</sub>组在造模前24 h,使用含有DMSO(含量为0.01%)或VitD<sub>3</sub>(100 nmol/L)的完全培养基孵育,空白组及Hemin组仅做换液处理。24 h后去除原有培养基溶液,使用Hemin刺激PC12细胞2 h,DMSO组及VitD<sub>3</sub>组,相应再次加入含原浓度DMSO或VitD<sub>3</sub>的培养基液。在造模完成后24 h,酶联免疫吸附分析检测脑组织和PC12细胞中丙二醛(MDA)和活性氧(ROS)含量,Western blotting检测过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、核因子红细胞2相关因子2(Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白的表达情况,并通过透射电镜观察线粒体形态学改变,Liperfluor检测PC12细胞脂质过氧化物(LPO)的量,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果 与Vehicle组相比,VitD<sub>3</sub>组大鼠MDA、ROS水平降低( $P<0.05$ ),PPAR $\gamma$ 、Nrf2、GPX4蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与Hemin组相比,VitD<sub>3</sub>组PC12细胞MDA、ROS水平降低,PPAR $\gamma$ 、Nrf2、GPX4蛋白表达升高,LPO表达量降低,凋亡细胞数量减少(均 $P<0.05$ )。结论 VitD<sub>3</sub>能够在SAH后抑制铁死亡,是一种可靠的早期神经细胞保护剂。

**关键词:**蛛网膜下腔出血;铁死亡;早期脑损伤;维生素D<sub>3</sub>;PC12细胞

中图分类号:R743

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2025.05.001

### Vitamin D<sub>3</sub> alleviates early brain injury by combating ferroptosis after subarachnoid hemorrhage

LIU Shangshuo<sup>1</sup>, PU Yalu<sup>2</sup>, ZHOU Wenke<sup>1</sup>, DIAO Yuling<sup>1</sup>, CHANG Haigang<sup>1</sup>, ZHANG Zhiyong<sup>1</sup>, WANG Shuren<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China

2. School of Life Sciences, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China

Corresponding author: ZHOU Wenke, Email: zhouwenke1999@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of vitamin D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>) in alleviating early brain injury (EBI) by combating ferroptosis after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Both *in vivo* and *in vitro* experiments were conducted using 54 healthy male Sprague-Dawley rats and highly differentiated PC12 cells, respectively. The rats were randomly divided into blank group, Vehicle group, and VitD<sub>3</sub> group, with 18 rats in each group. The method of endovascular perforation was used to establish a model of SAH, and the rats were given intraperitoneal injection of VitD<sub>3</sub> (100 ng/kg) or Vehicle at 24 hours before modeling and at 2 hours after modeling, while the rats in the blank group were given anesthesia treatment

基金项目:国家自然科学基金(81541030)。

收稿日期:2024-12-31;修回日期:2025-08-26

作者简介:刘尚硕(1996—),男,硕士在读;研究方向为脑血管病的综合治疗。

通信作者:周文科(1964—),男,主任医师,博士研究生;研究方向为脑血管病的综合治疗;Email:zhouwenke1999@163.com。

alone. PC12 cells were randomly divided into blank group, Hemin group, DMSO group, and VitD<sub>3</sub> group, and Hemin was used to mimic the effect of hemoglobin on neuronal cells. 24 hours before modeling in the DMSO and VitD<sub>3</sub> groups, cells were incubated with complete medium containing DMSO (0.01%) or VitD<sub>3</sub> (100 nmol/L). After 24 hours, the original medium was removed, and PC12 cells were stimulated with Hemin for 2 hours. Subsequently, the DMSO group and the VitD<sub>3</sub> group were supplemented with culture medium containing the original concentrations of DMSO or VitD<sub>3</sub>, respectively. At 24 hours after modeling, ELISA was used to measure the levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in brain tissue and PC12 cells; Western blotting was used to measure the protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and glutathione peroxidase 4 (GPX4); transmission electron microscopy was used to observe mitochondrial morphological changes; Liperfluo was used to measure the level of lipid peroxide (LPO) in PC12 cells; flow cytometry was used to observe cell apoptosis.

**Results** Compared with the Vehicle group, the VitD<sub>3</sub> group showed a decrease in MDA and ROS expression levels ( $P < 0.05$ ), while the expression levels of PPAR $\gamma$ , Nrf2, and GPX4 proteins increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the Hemin group, the VitD<sub>3</sub> group showed a decrease in MDA and ROS expression levels in PC12 cells, an increase in PPAR $\gamma$ , Nrf2, and GPX4 protein expression, a decrease in LPO expression, and a reduction in the number of apoptotic cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** VitD<sub>3</sub> can inhibit ferroptosis after SAH, and it can be used as a reliable neuroprotective agent in early brain injury.

**Keywords:** subarachnoid hemorrhage; ferroptosis; early brain injury; vitamin D<sub>3</sub>; PC12 cells

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)作为致死致残率较高的脑血管急症,中国年发病率为(1~27)/10万,呈现地域和性别差异,其中女性的发病率高于男性且随年龄增长风险递增。我国流行病学调查显示SAH发病率存在明显地域聚集性,南方及北方地区尤为突出<sup>[1-2]</sup>。

SAH后72 h内发生的早期脑损伤(early brain injury, EBI)是影响预后的关键病理阶段<sup>[3-4]</sup>。研究证实铁死亡——一种铁依赖性程序性细胞死亡方式——通过铁离子蓄积、谷胱甘肽代谢异常及溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)(一种胱氨酸-谷氨酸反转运蛋白)失活等机制介导EBI进程<sup>[5-8]</sup>。核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)作为核心抗氧化调节因子,可通过调控含抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)的基因转录,上调谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)表达,有效拮抗铁死亡诱导剂Erastin引发的脂质过氧化<sup>[9-10]</sup>。Dixon等<sup>[11]</sup>指出,Fe<sup>2+</sup>和活性氧(reactive oxygen species, ROS)是许多生物和疾病中细胞死亡的重要启动剂和促进剂。值得注意的是,过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )可激活Nrf2来对抗氧化应激<sup>[12]</sup>。这表明,Nrf2/Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)-GPX4-ROS通路在SAH后铁死亡调控中具有关键作用。

维生素D<sub>3</sub>(vitamin D<sub>3</sub>, VitD<sub>3</sub>)作为多效性脂溶性维生素,具备多重生理功能。研究显示,VitD<sub>3</sub>能通过多种机制保护脑细胞,包括调控巨噬细胞极化、增强PPAR $\gamma$ 表达、

抑制脑血管痉挛和重塑、减少炎症介质表达<sup>[13-15]</sup>。最新研究揭示VitD<sub>3</sub>可通过Nrf2-KEAP1-GPX4轴调控铁死亡进程<sup>[16]</sup>。但其在SAH后EBI中的作用机制尚未阐明。本研究旨在讨论VitD<sub>3</sub>治疗对SAH后EBI的保护效应及其潜在的神经保护机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

VitD<sub>3</sub>、氯化血红素(Hemin)、铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1, Fer-1)、聚乙二醇300(polyethylene glycol 300, PEG300)、吐温80(Tween 80)、双蒸水(distillation-distillation H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)及铁死亡诱导剂(Erastin)(均购自山东思科捷生物技术有限公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(北京索莱宝);PPAR $\gamma$ 抗体、Nrf2抗体、GPX4抗体(中国Affinity公司);Liperfluo着色剂(日本Dojindo公司);丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、ROS含量检测酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司)。

### 1.2 实验分组

#### 1.2.1 动物与分组

实验获得新乡医学院第一附属医院医学伦理委员会的批准(NO.EC-023-237)。成年雄性SD大鼠54只,体重260~280 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[SCK(豫)2020-0005]。饲养条件:光照及黑暗环境各12 h,摄食饮水自由,温度、湿度适宜。大鼠随机编码,然后随机数字表法分为:空白组、Vehicle组、VitD<sub>3</sub>组,每组18只。

#### 1.2.2 细胞与分组

使用高分化的PC12细胞,购于武汉普诺赛生命科技有限公司。孵育条件:高分化PC12细胞在含10%胎牛血

清(fetal bovine serum, FBS)的RPIM-1640培养基培养,置于培养箱中,定期换液。将培养皿随机编码,然后随机数字表法分为:空白组、Hemin组、DMSO组、VitD<sub>3</sub>组。

### 1.3 模型制作

#### 1.3.1 大鼠SAH模型

采用血管内刺破法建立大鼠SAH模型。动物经腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉。Vehicle组及VitD<sub>3</sub>组均采用颈正中切口,游离左侧颈内、颈外动脉,使用线绳结扎颈外动脉,在颈外动脉近颈总动脉分叉处3 mm,使用显微剪剪破颈外动脉,将MACO线栓[构建大脑中动脉闭塞模型(MCAO模型)的工具]插入并将颈外动脉进行反转,推进线栓,当有阻力时用力刺破血管并推进2 mm,停留10 s,制造SAH大鼠模型。空白组大鼠仅予麻醉处理。所有SD大鼠均置于(37.0±0.5)°C恒温垫上进行复苏。采用Takashi Sugawara的评分方法对SAH大鼠模型出血严重程度进行评估<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.2 PC12细胞SAH模型

首先检测Hemin的合适浓度。Hemin溶液配制,采用0.1 mol/L NaOH溶解Hemin,0.22 μm滤器除菌后,用完全培养基梯度稀释(Hemin剂量范围为20~140 μmol/L),最终确定Hemin的最适诱导浓度为100 μmol/L。然后通过Hemin进行诱导建立SAH模型,将PC12细胞系培养在含有10%FBS的RPIM-1640中,当细胞密度达50%~70%时,更换为含有100 μmol/L Hemin的完全培养基继续繁育,以模拟SAH后的神经病理改变。

#### 1.4 VitD<sub>3</sub>药物使用

在大鼠实验中,空白组大鼠仅行麻醉。Vehicle组使用3 mL/kg的溶剂(由2 mL DMSO、6 mL PEG300、2 mL Tween 80、10 mL ddH<sub>2</sub>O混合组成),VitD<sub>3</sub>组使用100 ng/kg的VitD<sub>3</sub>溶剂。Vehicle组和VitD<sub>3</sub>组大鼠在造模前24 h和造模成功后2 h分别用Vehicle和VitD<sub>3</sub>溶剂进行腹腔注射。

细胞实验中,通过CCK-8检测法确定VitD<sub>3</sub>最适浓度为100 μmol/L。空白组常规培养,不接受任何药物处理,Hemin组在含有100 μmol/L Hemin的完全培养基中培养,DMSO组及VitD<sub>3</sub>组造模前24 h,使用含有DMSO(0.01%)或VitD<sub>3</sub>(100 nmol/L)的完全培养基繁育,空白组及Hemin组仅做换液处理。随后,当细胞密度达50%~70%时,空白组仅行换液处理,其余三组均更换为含100 μmol/L Hemin的培养基建立SAH模型。造模后2 h,DMSO组及VitD<sub>3</sub>组,再次加入DMSO(0.01%)或VitD<sub>3</sub>(100 nmol/L)。

#### 1.5 流式细胞仪检测脂质过氧化物及细胞凋亡情况

将PC12细胞种植在培养皿内,采用1.3.2及1.4中的细胞处理方式处理。24 h后,加入Liperflu(10 μmol/L)的稀释液,在培养箱内对细胞染色30 min,然后在流式细胞仪检测脂质过氧化物(lipid peroxides, LPO)。将PC12

细胞种植在培养皿内,采用同样的细胞处理方式处理。24 h后,加入Annexin V-FITC/PI后反应10 min,并于1 h内进行流式检测。

#### 1.6 CCK-8计数试剂盒测PC12细胞存活率

将PC12细胞种入96孔板内,每组设置5个复孔,采用1.3.2及1.4中的细胞处理方式处理,培养箱孵育24 h后,每孔加入CCK-8试剂,继续培养4 h,然后使用酶标仪测定450 nm下吸光度。

#### 1.7 ELISA法检测MDA和ROS含量

按照试剂盒说明书对脑组织和PC12细胞中MDA和ROS含量进行检测。

#### 1.8 透射电镜观察线粒体超微结构变化

动物实验中,取大鼠脑组织,经4%戊二醛和1%四氧化钨酸固定,脱水后包埋并切片,染色后用透射电子显微镜分析。细胞实验中,细胞在培养皿中培养并处理后,用2.5%戊二醛固定,刮取并离心得到细胞团,再固定后进行相同后续处理。

#### 1.9 Western blotting测蛋白含量

动物实验:使用戊巴比妥钠麻醉SD大鼠,取脑组织,剪碎后加入裂解液,用BCA法测定蛋白浓度。细胞实验:去除培养液,加入裂解液,刮取细胞至EP管内吹打确保裂解,同样用BCA法测定蛋白浓度。通过Western blotting法测定PPARγ、Nrf2、GPX4蛋白表达情况,以GAPDH为内参,用ImageJ分析灰度值,计算相对表达量。

#### 1.10 统计学方法

数据采用SPSS 27.0软件分析,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两之间进一步比较采用*t*检验。以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SAH模型制作结果

SAH造模成功后可见蛛网膜下腔有出血及血凝块,并以Takashi Sugawara的评分方法,排除得分小于7分的大鼠(图1 A~D)。

### 2.2 Hemin诱导PC12细胞的损伤情况

动物实验及细胞实验均采用该流程(图2 A)。使用CCK-8法检测Hemin对PC12细胞的细胞毒性(图2 B)。使用半数致死量(LD50)处的Hemin浓度确定为VitD<sub>3</sub>最适使用浓度(图2 C)。LPO流式检测Erastin可诱导LPO含量增加,而使用Fer-1后被抑制(*t*=3.515, *P*=0.025)。Hemin诱导的PC12细胞损伤同样被Fer-1所抑制(*t*=6.603, *P*=0.003)(图2 D~E)。

### 2.3 3组大鼠脑组织中铁死亡特异性指标表达情况

3组间PPARγ(*F*=48.871, *P*=0.000)、Nrf2(*F*=96.372, *P*=0.000)、GPX4(*F*=21.958, *P*=0.000)比较,差异有统计学意义。与Vehicle组相比,VitD<sub>3</sub>组PPARγ、Nrf2、GPX4蛋白表达升高(*P*<0.05)(图3 A~D)。3组间MDA(*F*=25.836,

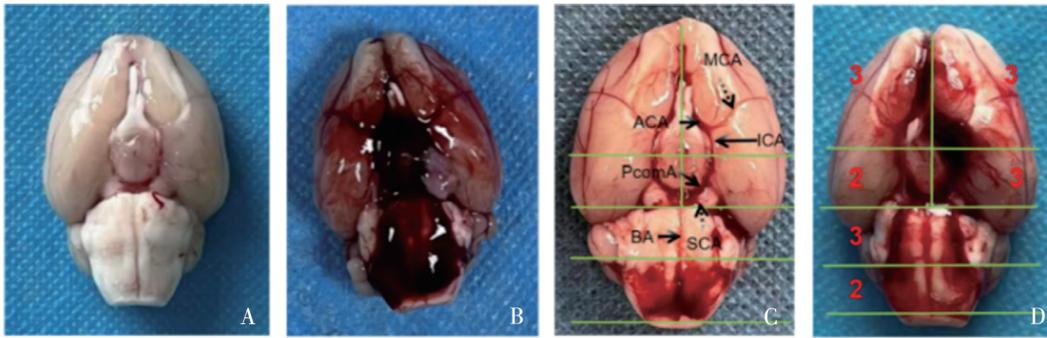


图1 SAH造模后的大体标本及Takashi Sugawara法评分

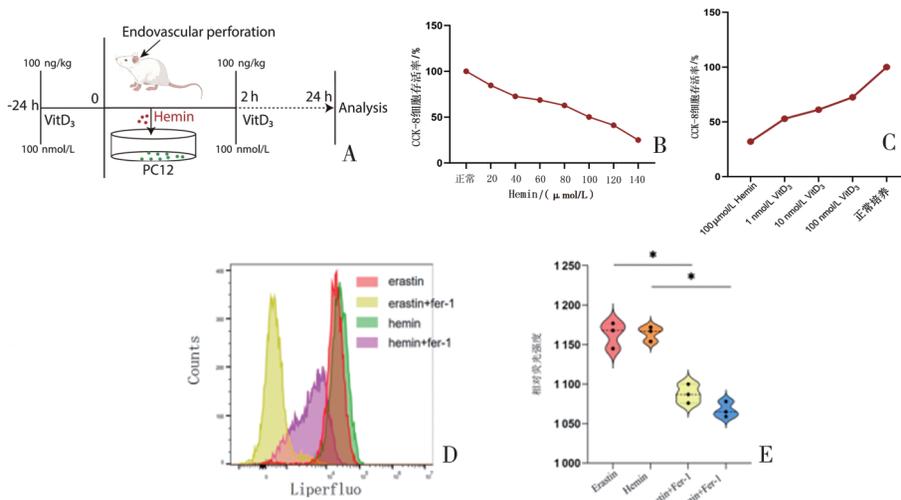


图2 铁死亡在体外Hemin诱导的神经元损伤

$P=0.000$ )、ROS( $F=17.933, P=0.000$ )表达存在统计学差异。与Vehicle组相比, VitD<sub>3</sub>组MDA、ROS的含量减少( $P<0.05$ ) (图3 E~F)。

2.4 各组大鼠脑组织线粒体电镜下表现

与空白组相比, Vehicle组大鼠脑组织线粒体肿胀呈空泡状、嵴结构减少、基质电子密度降低等病理改变; 与Vehicle组相比, VitD<sub>3</sub>组大鼠脑组织线粒体未见明显肿胀、嵴结构恢复、基质电子密度升高(图4)。

2.5 各组PC12细胞中铁死亡特异性指标表达情况

4组间PPAR $\gamma$ ( $F=52.058, P=0.000$ )、Nrf2( $F=92.496, P=0.000$ )、GPX4( $F=77.342, P=0.000$ )表达水平比较, 差异有统计学意义。与Hemin组相比, VitD<sub>3</sub>组PPAR $\gamma$ 、Nrf2、GPX4蛋白表达水平较Hemin组升高( $P<0.05$ )(图5 A~D)。4组间MDA( $F=32.796, P=0.000$ )和ROS( $F=23.492, P=0.000$ )表

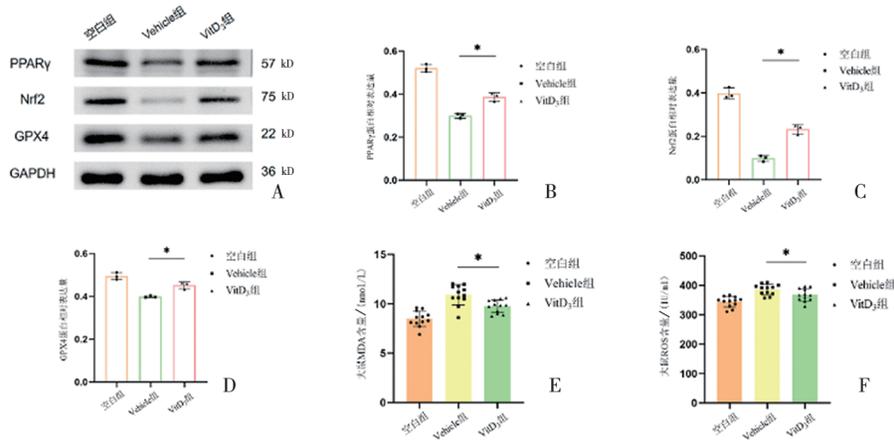
达水平比较, 差异有统计学意义。与Hemin组相比, VitD<sub>3</sub>组MDA、ROS含量, 相较于Hemin组含量减少( $P<0.05$ ) (图5 E~F)。

2.6 各组PC12细胞线粒体电镜下表现

与空白组相比。Hemin组线粒体膜密度增加, 线粒体体积变小, 并有线粒体嵴的断裂、缺失。DMSO组线粒体形态与Hemin组无异常。与Hemin组相比, VitD<sub>3</sub>组线粒体形态得到改善(图6)。

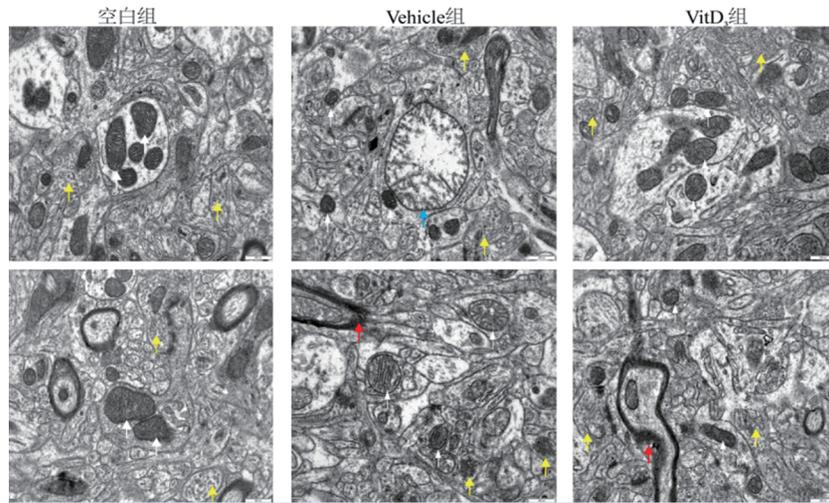
2.7 各组PC12细胞凋亡情况

4组间细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义( $F=71.075, P=0.000$ )。与Hemin组相比, VitD<sub>3</sub>组细胞凋亡率减少( $P<0.05$ ) (图7 A~B)。4组之间相对荧光强度比较, 差异有统计学意义( $F=62.900, P=0.000$ )。与Hemin组相比, VitD<sub>3</sub>组相对荧光强度减低( $P<0.05$ )(图7 C~D)。



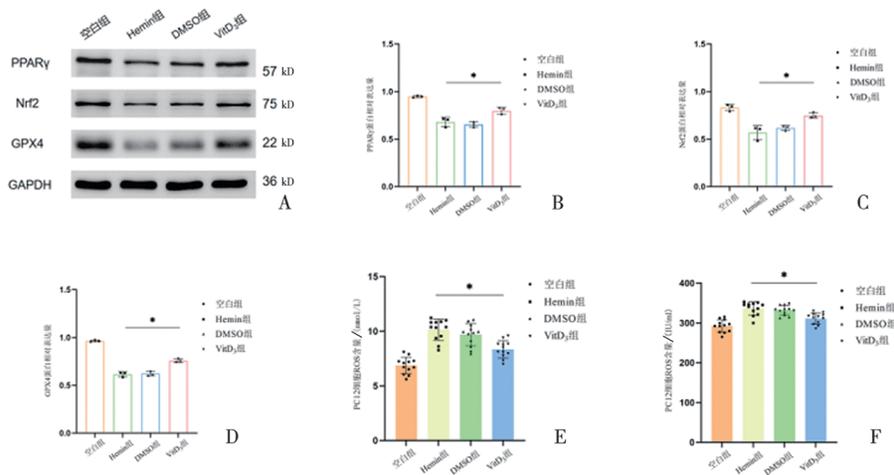
A~D: 各组大鼠脑组织中PPAR $\gamma$ 、Nrf2、GPX4蛋白表达量;E、F: 各组大鼠脑组织中MDA、ROS的含量。\*表示组间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图3 3组大鼠脑组织中铁死亡特异性指标表达情况



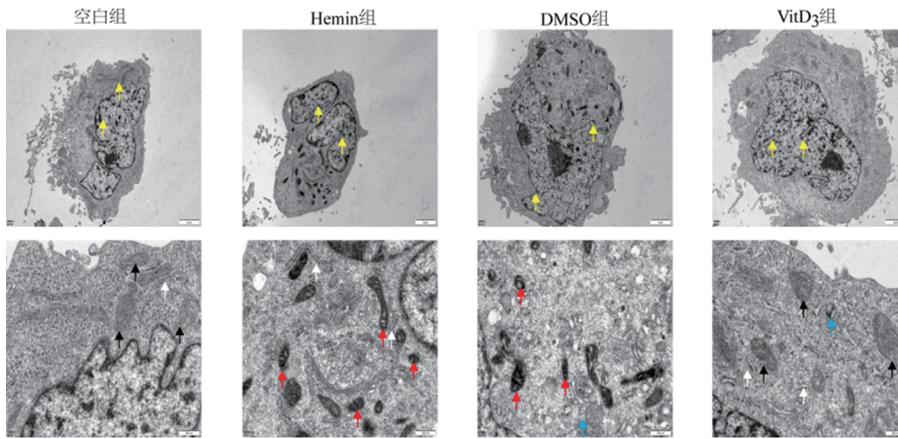
白色箭头所指为线粒体,黄色箭头所指为突触小泡,蓝色箭头所指为肿胀的线粒体;红色箭头所指为神经纤维髓鞘。

图4 大鼠脑组织线粒体电镜下改变



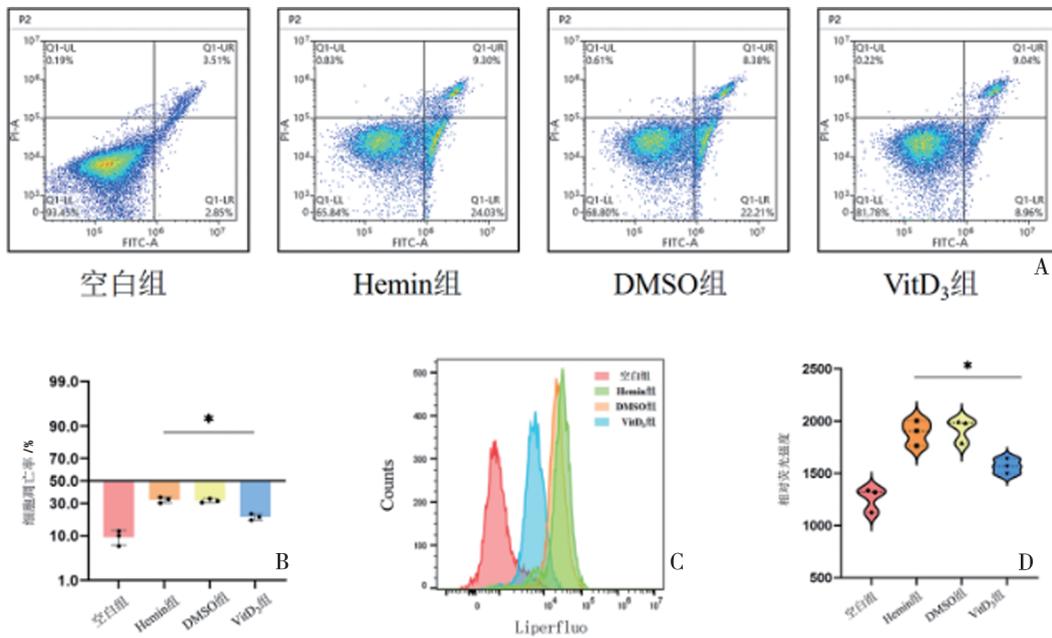
A~D: 各组PC12细胞PPAR $\gamma$ 、Nrf2、GPX4蛋白表达水平及定量分析;E、F: 各组PC12细胞中MDA、ROS的含量。\*表示Hemin组与VitD<sub>3</sub>组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图5 各组PC12细胞中铁死亡特异性指标表达情况



黄色箭头所指为细胞核,黑色箭头所指为线粒体,白色箭头所指为内质网,红色箭头所指为损伤线粒体,蓝色箭头所指为胞质内自噬溶酶体。

图6 各组PC12细胞线粒体电镜下改变



A、B:流式细胞仪检测凋亡细胞图及定量分析;C、D:LPO流式检测图及定量分析。\*表示Hemin组与VitD<sub>3</sub>组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图7 各组PC12细胞凋亡情况

### 3 讨论

SAH是神经外科常见的脑卒中疾病,约80%由颅内动脉瘤破裂引发<sup>[18]</sup>,其病死率高达25%~50%<sup>[19]</sup>。SAH发生时,血液涌入蛛网膜下腔引发颅内压骤升、脑灌注压下降、脑血管调节功能障碍和脑水肿<sup>[4]</sup>。这些变化引发炎症和自由基反应,继而激活损伤相关的分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)介导的级联炎症反应:①损伤细胞释放ROS;②血红蛋白降解产物导致铁超载;③纤维蛋白原激活模式识别受体,共同促进炎症细胞浸润及内皮黏附分子上调<sup>[20-21]</sup>。上述病理改变在SAH后72 h内形成的EBI中尤为显著<sup>[4]</sup>。

EBI的核心机制涉及氧化应激诱导线粒体功能障碍及血红蛋白氧化级联,导致ROS、Fe<sup>2+</sup>和LPO蓄积,最终通过铁死亡途径加剧神经元损伤<sup>[22-23]</sup>。值得注意的是,SAH模型在24 h内即可检测到GPX4表达下调及脂质过氧化标志物升高,印证铁死亡在EBI中的关键作用。该死亡模式多种疾病相关,如肿瘤抑制、脑缺血再灌注损伤<sup>[24-26]</sup>和出血模型中的继发性脑损伤<sup>[27-29]</sup>。

VitD<sub>3</sub>在20世纪30年代初被发现可用于治疗佝偻病,其脂溶性特性使其能够穿越血脑屏障,作用于神经细胞起到神经保护作用。其中作用机制包括:①调控巨噬细胞表型促进水肿吸收<sup>[14]</sup>;②抑制脑血管痉挛及病理性重

塑<sup>[30-31]</sup>;③在斑马鱼模型中拮抗肝细胞铁死亡<sup>[16]</sup>。本研究通过体内外实验证实, VitD<sub>3</sub>预处理可抑制SAH后MDA、ROS等铁死亡标志物表达,同时上调PPAR $\gamma$ /Nrf2/GPX4通路相关蛋白表达水平,提示:①铁死亡在神经元损伤中扮演关键角色;②抑制铁死亡可减轻SAH后的EBI;③VitD<sub>3</sub>能有效对抗铁死亡,减轻SAH后的EBI。但信号通路上下游调控时序仍需进一步验证。

综上所述,预给予VitD<sub>3</sub>可以有效减轻SAH后的铁死亡带来的神经损伤,减轻EBI。

#### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会神经外科学分会, 中国卒中学会脑血管外科分会, 国家神经系统疾病医学中心, 等. 中国未破裂颅内动脉瘤临床管理指南(2024版)[J]. 中华医学杂志, 2024, 104(21): 1918-1939.
- [2] 董漪, 郭珍妮, 李琦, 等. 中国脑血管病临床管理指南(节选版)——蛛网膜下腔出血临床管理[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14(8): 814-818.
- [3] 刘胜, 李明昌. 蛛网膜下腔出血的脑损伤机制及相关生物标志物研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2023, 50(3): 51-59.
- [4] LAUZIER DC, JAYARAMAN K, YUAN JY, et al. Early brain injury after subarachnoid hemorrhage: incidence and mechanisms[J]. Stroke, 2023, 54(5): 1426-1440.
- [5] CHEN JH, LI MC, LIU ZH, et al. Molecular mechanisms of neuronal death in brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1025708.
- [6] CAHILL J, ZHANG JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction?[J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S86-S87.
- [7] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [8] XIE JY, LV HZ, LIU XB, et al. Nox4-and Tf/TfR-mediated peroxidation and iron overload exacerbate neuronal ferroptosis after intracerebral hemorrhage: involvement of EAAT3 dysfunction[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 199: 67-80.
- [9] HAYES JD, DINKOVA-KOSTOVA AT. Epigenetic control of NRF2-directed cellular antioxidant status in dictating Life-Death decisions[J]. Mol Cell, 2017, 68(1): 5-7.
- [10] LI XN, LIN L, LI XW, et al. BSA-stabilized selenium nanoparticles ameliorate intracerebral hemorrhage's-like pathology by inhibiting ferroptosis-mediated neurotoxicology via Nrf2/GPX4 axis activation[J]. Redox Biol, 2024, 75: 103268.
- [11] DIXON SJ, STOCKWELL BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death[J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(1): 9-17.
- [12] CHEN JH, WANG YH, LI MC, et al. Netrin-1 alleviates early brain injury by regulating ferroptosis via the PPAR $\gamma$ /Nrf2/GPX4 signaling pathway following subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2024, 15(1): 219-237.
- [13] EVANS MA, KIM HA, LING YH, et al. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation reduces subsequent brain injury and inflammation associated with ischemic stroke[J]. Neuromolecular Med, 2018, 20(1): 147-159.
- [14] LIU JX, LI N, ZHU ZY, et al. Vitamin D enhances hematoma clearance and neurologic recovery in intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2022, 53(6): 2058-2068.
- [15] WIMALAWANSA SJ. Vitamin D deficiency: effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging[J]. Biology (Basel), 2019, 8(2): 30.
- [16] CHENG K, HUANG YQ, WANG CF. 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibited ferroptosis in zebrafish liver cells (ZFL) by regulating KEAP1-Nrf2-GPx4 and NF- $\kappa$ B-hepcidin axis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11334.
- [17] 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.
- [18] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国蛛网膜下腔出血诊治指南2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(12): 1006-1021.
- [19] ETMINAN N, CHANG HS, HACKENBERG K, et al. Worldwide incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage according to region, time period, blood pressure, and smoking prevalence in the population: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Neurol, 2019, 76(5): 588-597.
- [20] KANAMARU H, SUZUKI H. Potential therapeutic molecular targets for blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(7): 1138-1143.
- [21] KHEY KMW, HUARD A, MAHMOUD SH. Inflammatory pathways following subarachnoid hemorrhage[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(5): 675-693.
- [22] YANG WS, STOCKWELL BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. Chem Biol, 2008, 15(3): 234-245.
- [23] FRIEDMANN ANGELI JP, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12): 1180-1191.
- [24] LI Q, WAN JR, LAN X, et al. Neuroprotection of brain-permeable iron chelator VK-28 against intracerebral hemorrhage in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(9): 3110-3123.
- [25] WAN JR, REN HL, WANG J. Iron toxicity, lipid peroxidation and ferroptosis after intracerebral haemorrhage[J]. Stroke Vasc Neurol, 2019, 4(2): 93-95.
- [26] LI XY, MA N, XU JP, et al. Targeting ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia-reperfusion injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 1587922.
- [27] MASALDAN S, BUSH AI, DEVOS D, et al. Striking while the

- iron is hot: iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 221-233.
- [28] STOCKWELL BR, FRIEDMANN ANGELI JP, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [29] 翁传波, 江涛, 张洋, 等. 脑动脉瘤破裂出血后脑脊液中 miRNA-3177-3p 与脑血管痉挛的发病关系及临床意义[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2023, 50(3): 6-11.
- [30] KASHEFIOLASL S, LEISEGANG MS, HELFINGER V, et al. Vitamin D-a new perspective in treatment of cerebral vasospasm[J]. *Neurosurgery*, 2021, 88(3): 674-685.
- [31] ENKHJARGAL B, MALAGUIT J, HO WM, et al. Vitamin D attenuates cerebral artery remodeling through VDR/AMPK/eNOS dimer phosphorylation pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(2): 272-284.

责任编辑:王荣兵