

分类号：
学号：20222014042

密级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



SP1 介导 ACSL4 转录调控影响铁死亡在新生内 膜形成中的机制初探

| | |
|----------|-----------|
| 学位申请人 | 张梅霞 |
| 指导教师 | 陶林副教授 |
| | 庞丽娟教授 |
| 申请学位门类级别 | 医学硕士 |
| 学科、专业名称 | 基础医学 |
| 研究方向 | 病理学与病理生理学 |
| 所在学院 | 医学院 |

中国·新疆·石河子
2025年06月

分类号：
学号：20222014042

密级：
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



SP1 介导 ACSL4 转录调控影响铁死亡在新生内 膜形成中的机制初探

| | |
|----------|----------------|
| 学位申请人 | 张梅霞 |
| 指导教师 | 陶林副教授 庞丽娟教授 |
| 申请学位门类级别 | 医学硕士 |
| 学科、专业名称 | 基础医学 |
| 研究方向 | 病理学与病理生理学 |
| 所在学院 | 医学院 |

中国·新疆·石河子
2025年06月

**Preliminary investigation on SP1-Mediated Transcriptional
Regulation of ACSL4 in Ferroptosis During Neointima Formation**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Zhang mei-xia

(Pathology and Pathophysiology)

Dissertation Supervisor: Prof. Lin Tao /Prof. Lijuan Pang

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名: 张相霞

时间: 2018年 5月 26日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名: 张相霞

时间: 2018年 5月 26日

导师签名:

张相霞

时间: 2018年 5月 26日

摘要

目的：本研究基于 SD 大鼠颈动脉球囊损伤模型，结合 scRNA-seq 技术、生物信息学分析和体内外相关实验，深入探讨了血管损伤后新生内膜增生的细胞类型、VSMCs 表型转化及其与铁死亡的关系，进一步探究关键调控因子 SP1 影响铁死亡参与新生内膜形成的作用机制。

方法：（1）构建大鼠颈动脉球囊损伤模型，HE 染色观察血管狭窄程度；使用总铁离子比色法、丙二醛（MDA）比色法以及谷胱甘肽（GSH）比色法检测了损伤血管组织中铁离子、MDA 以及 GSH 的水平。（2）基于 GEO 数据库和 Ferr db V2 数据库分析再狭窄与铁死亡的关键基因 SP1；免疫组化验证 SP1 在新生内膜中的表达。（3）通过单细胞 RNA 测序技术（scRNA-seq）识别血管损伤后存在的不同细胞类型，揭示损伤后 VSMCs 的细胞异质性及其细胞发育或分化的轨迹。使用 scRNA-seq 探究损伤组织中 VSMCs 的铁死亡评分。（4）使用 Erastin 诱导 VSMCs 发生铁死亡后，检测 VSMCs 表型转化相关标记物和增殖迁移能力。（5）体外实验干预 SP1 的表达后，使用 DCFH-DA 荧光探针、铁含量测试、GSH 含量测试、MDA 含量测试检测了 VSMCs 中铁死亡的水平，Western Blot 和 qRT-PCR 检测了 VSMCs 中的表型转化相关标记物。（6）基于 4 个基因调控数据库和 Ferr db V2 数据库筛选了 SP1 下游的铁死亡相关靶结合基因，scRNA-seq 检测在血管损伤中的相关性，通过 JASPAR 数据库和 HADDOCK 网站预测 SP1 与 ACSL4 启动子间的结合情况，使用双荧光素酶实验验证。

结果：（1）HE 染色显示大鼠颈动脉球囊损伤模型成功构建，在损伤后中晚期（14d、21d、28d）新生内膜增生明显；靶血管组织中的铁离子、MDA 以及 GSH 的水平显示在血管损伤后，组织中的铁死亡水平可能增强。（2）运用 GEO 数据库和 Ferr db V2 数据库筛选出 10 个差异基因，CytoHubba 识别出 SP1 是血管再狭窄和铁死亡的关键调控因子，且在 VSMCs 中上调，免疫组化发现 SP1 组主要在损伤后中晚期（14d、21d 和 28d）的新生内膜中表达，位于胞核中。（3）scRNA-seq 发现血管损伤后主要的细胞群体包括 VSMCs、成纤维细胞和内皮细胞等，VSMCs 主要以收缩表型和合成表型存在，收缩表型主要在损伤早期出现，合成表型主要在损伤后期存在；拟时序分析显示 VSMCs 最初都来自收缩型 VSMCs。在后期时间线中，收缩型 VSMCs 逐渐分化为合成 VSMCs；VSMCs 的细胞间通讯与基因表达差异分析显示，血管损伤后血管平滑肌细胞发挥时序性调控核心作用协调血管稳态重建；铁死亡主要发生在收缩型 VSMCs 和损伤早期的合成型 VSMCs。（4）诱导 VSMCs 发生铁死亡后，SP1 蛋白和 mRNA 表达升高，Western Blot 和 qRT-PCR 结果显示 OPN 和 Vimentin 的表达升高， α -SMA 表达下降，提示 VSMCs 表达下降，提示 VSMCs 发生铁死亡后向合成表型转化。平板克隆、细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验显示促进细胞的增殖迁移能力。（5）敲低 SP1 后，VSMCs 中的 ROS、 Fe^{2+} 和 MDA 水平下降，GSH 水平升高；过表达 SP1 后，VSMCs 中的 ROS、 Fe^{2+} 和 MDA 水平升高，GSH 水平下降，提示 SP1 促进 VSMCs 中的铁死亡；敲低 SP1 后 OPN 表达下降， α -SMA 表达升高，过表达 SP1 后出现相反的结果，提示 SP1 能促进 VSMCs 向合成表型转化；Erastin

逆转了敲低 SP1 的作用，提高了 ROS、Fe²⁺和 MDA 的水平，促进了 OPN 的表达，表明 SP1 可能通过影响铁死亡影响 VSMCs 的表型转化。（6）基于公共数据库筛选到 86 个与铁死亡相关的靶结合基因；scRNA-seq 发现在血管损伤后 SP1 和 ACSL4 具有显著的正相关性；JASPAR 数据库筛选出 SP1 作用于 ACSL4 的 14 个潜在结合位点，HADDOCK 网站发现 SP1 蛋白和 ACSL4 基因结合能为-250.20 kcal/mol，SP1 的 ASN-109 可以与 ACSL4 上的 DC-2096 形成氢键，双荧光素酶实验显示 SP1 可以结合 ACSL4 基因启动子。

结论：（1）血管损伤后铁死亡水平升高，并促使血管平滑肌细胞向合成表型转化；（2）血管损伤后 SP1 介导的铁死亡参与调控血管平滑肌细胞（VSMCs）的表型转化；（3）SP1 能够结合 ACSL4 基因启动子区域，可能与血管损伤后新生内膜形成相关。

关键词：血管损伤；血管平滑肌细胞；铁死亡；特异性蛋白 1；长链脂酰辅酶 A 合成酶 4

论文类型：（基础研究）

本项目由国家自然科学基金项目（82060054）、新疆生产建设兵团科技合作计划项目（2020BC003）、院级高层次人才科研启动经费项目（2022A15）资助。

Abstract

Objective: Based on a balloon-induced carotid artery injury model in SD rats, this study comprehensively investigated cellular heterogeneity during neointimal hyperplasia post vascular injury, phenotypic switching of vascular smooth muscle cells (VSMCs), and its association with ferroptosis, through an integrated approach combining single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), bioinformatics analysis, and relevant in vivo and in vitro experiments. Furthermore, we systematically elucidated the mechanistic role of the key transcriptional regulator SP1 in mediating ferroptosis during neointima formation..

Methods: (1) A rat carotid artery balloon injury model was established, and evaluation of vascular stenosis severity using HE staining. The levels of iron ions (Fe^{2+}), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in the injured vascular tissues were measured using total iron ion colorimetry, MDA colorimetry, and GSH colorimetry, respectively. (2) The GEO database and FerrDb V2 database were used to analyze key genes associated with restenosis and ferroptosis, identifying SP1 as a critical regulator. Immunohistochemistry was performed to validate SP1 expression in the neointima. (3) scRNA-seq was employed to identify different cell types present after vascular injury and to reveal the heterogeneity and developmental or differentiation trajectories of VSMCs. scRNA-seq was also used to evaluate ferroptosis scores in VSMCs within the injured tissues. (4) VSMCs were induced to undergo ferroptosis using Erastin, followed by detection of phenotypic switching markers and assessment of proliferation and migration capabilities. (5) In vitro experiments involved manipulating SP1 expression, after which ferroptosis levels in VSMCs were measured using the DCFH-DA fluorescent probe, iron content assay, GSH content assay, and MDA content assay. Western blot and quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) were performed to detect phenotypic switching markers in VSMCs. (6) Four gene regulatory databases and FerrDb V2 were used to screen SP1 downstream target genes related to ferroptosis. scRNA-seq was used to assess the correlation of these genes in vascular injury. The JASPAR database and HADDOCK website were employed to predict binding sites between SP1 and the ACSL4 promoter, and dual-luciferase assays were conducted to validate the binding.

Results: (1) HE staining confirmed the successful establishment of vascular injury model, with significant neointimal hyperplasia observed in the mid-to-late stages post-injury (14d, 21d, and 28d). The levels of Fe^{2+} , MDA, and GSH in the target vascular tissues indicated that ferroptosis levels were likely enhanced after vascular injury. (2) Analysis using the GEO database and FerrDb V2 identified 10 differentially expressed genes, and CytoHubba identified SP1 as a key regulator of vascular restenosis and ferroptosis, with upregulated expression in VSMCs. Immunohistochemistry revealed that SP1 was predominantly expressed in the neointima during the mid-to-late stages post-injury (14d, 21d, and 28d), localized in the

nucleus. (3) scRNA-seq identified major cell populations after vascular injury, including VSMCs, fibroblasts, and endothelial cells. VSMCs primarily existed in contractile and synthetic phenotypes, with the contractile phenotype predominant in the early stages and the synthetic phenotype predominant in the later stages. Pseudotime analysis showed that all VSMCs initially originated from the contractile phenotype, which gradually differentiated into the synthetic phenotype in later stages. Analysis of cell-cell communication and differential gene expression in VSMCs demonstrated that VSMCs played a temporally regulated central role in coordinating vascular homeostasis restoration after injury. Ferroptosis primarily occurred in contractile VSMCs and early-stage synthetic VSMCs. (4) Induction of ferroptosis in VSMCs led to increased SP1 protein and mRNA expression. Western blot and qRT-PCR results showed elevated expression of OPN and Vimentin and decreased expression of α -SMA, suggesting that VSMCs underwent phenotypic switching after ferroptosis. Plate cloning, cell scratch assay, and Transwell migration assay indicated enhanced cell proliferation and migration capabilities. (5) Knockdown of SP1 resulted in decreased levels of ROS, Fe^{2+} , and MDA, and increased GSH levels in VSMCs; overexpression of SP1 led to increased ROS, Fe^{2+} , and MDA levels and decreased GSH levels, indicating that SP1 promotes ferroptosis in VSMCs. Knockdown of SP1 decreased OPN expression and increased α -SMA expression, while overexpression of SP1 had the opposite effect, suggesting that SP1 promotes the transition of VSMCs to the synthetic phenotype. Erastin reversed the effects of SP1 knockdown, increasing ROS, Fe^{2+} , and MDA levels and promoting OPN expression, indicating that SP1 may influence VSMCs phenotypic transformation by regulating ferroptosis. (6) Screening of public databases identified 86 target genes associated with ferroptosis. scRNA-seq revealed a significant positive correlation between SP1 and ACSL4 after vascular injury. The JASPAR database identified 14 potential binding sites for SP1 on the ACSL4 promoter, and HADDOCK analysis showed a binding energy of -250.20 kcal/mol between SP1 and ACSL4, with SP1's ASN-109 forming hydrogen bonds with DC-2096 on ACSL4. Dual-luciferase assays confirmed that SP1 binds to the ACSL4 gene promoter.

Conclusions: (1) Ferroptosis levels increased following vascular injury, promoting the phenotypic transformation of VSMCs toward the synthetic type. (2) SP1-dependent ferroptosis contributes to the phenotypic switching of VSMCs after vascular injury. (3) SP1 binds to the ACSL4 gene promoter region, potentially mediating neointima formation following vascular injury.

Key words: Vascular injury; Vascular smooth muscle cells; Ferroptosis; Specificity Protein 1; Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4.

目录

| | |
|--|------|
| 摘要 | I |
| Abstract | III |
| 中英文缩略词表 | VIII |
| 第 1 章 前言 | 1 |
| 第 2 章 材料方法 | 4 |
| 2.1 实验材料 | 4 |
| 2.1.1 研究对象 | 4 |
| 2.1.2 主要试剂、耗材和仪器 | 4 |
| 2.2 实验方法 | 7 |
| 2.2.1 SD 大鼠损伤颈动脉血管组织单细胞测序 | 7 |
| 2.2.2 HE 染色 | 9 |
| 2.2.3 BCA 法测定蛋白浓度 | 11 |
| 2.2.4 总铁离子比色法 | 11 |
| 2.2.5 MDA 比色法 | 12 |
| 2.2.6 GSH 比色法 | 12 |
| 2.2.7 VSMCs 的培养 | 13 |
| 2.2.8 蛋白质印迹法 (WB) | 14 |
| 2.2.9 qRT-PCR 检测相关分子 mRNA 的表达 | 15 |
| 2.2.10 平板克隆实验 | 17 |
| 2.2.11 细胞划痕实验 | 18 |
| 2.2.12 Transwell 迁移实验 | 18 |
| 2.2.13 SP1 过表达质粒、siRNA 转染实验 | 19 |
| 2.2.14 再狭窄和铁死亡生物信息学数据分析 | 19 |
| 2.2.15 免疫组化实验 | 20 |
| 2.2.16 分子对接预测蛋白相互作用 | 21 |
| 2.2.17 双荧光素酶报告基因检测系统 | 22 |
| 2.3 统计学方法 | 22 |
| 第 3 章 结果 | 23 |
| 3.1 血管损伤后动脉组织中铁死亡水平增强 | 23 |
| 3.1.1 SD 大鼠颈动脉球囊损伤模型的成功构建 | 23 |
| 3.1.2 SD 大鼠颈动脉球囊损伤靶血管组织中铁死亡相关产物的表达变化 | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.2 SP1 是再狭窄和铁死亡的关键调控因子 | 26 |
| 3.2.1 识别再狭窄和非再狭窄的差异基因 | 26 |
| 3.2.2 GEO 数据库联合铁死亡数据库筛选再狭窄和铁死亡的共同差异基因 | 26 |
| 3.2.3 识别调控再狭窄的核心基因 SP1 | 27 |
| 3.2.4 体内实验验证 SP1 在新生内膜中的表达情况 | 27 |
| 3.3 单细胞测序 (ScRNA-seq) 分析大鼠颈动脉球囊损伤后的血管平滑肌细胞 | 28 |
| 3.3.1 ScRNA-seq 揭示血管损伤后的不同细胞亚群 | 28 |
| 3.3.2 血管平滑肌细胞的发育轨迹分析 | 30 |
| 3.3.3 ScRNA-seq 分析显示血管损伤后血管平滑肌细胞发挥时序性调控核心作用协调血管稳态重建 | 32 |
| 3.3.4 ScRNA-seq 探究大鼠颈动脉球囊损伤后的铁死亡评分 | 33 |
| 3.4 铁死亡促进 VSMCs 的表型转化 | 34 |
| 3.4.1 诱导 VSMCs 发生铁死亡后促进其向合成表型转化 | 34 |
| 3.4.2 诱导血管平滑肌细胞发生铁死亡后促进其增殖迁移能力 | 35 |
| 3.5 SP1 通过促进 VSMCs 发生铁死亡促进合成表型转化 | 37 |
| 3.5.1 敲低 SP1 后抑制血管平滑肌细胞的铁死亡 | 37 |
| 3.5.2 敲低 SP1 后抑制血管平滑肌细胞的表型转化 | 38 |
| 3.5.3 过表达 SP1 后诱导血管平滑肌细胞的铁死亡 | 38 |
| 3.5.4 过表达 SP1 后促进血管平滑肌细胞的表型转化 | 40 |
| 3.5.5 Erastin 诱导敲低 SP1 后被抑制的血管平滑肌细胞的铁死亡 | 41 |
| 3.6 体外实验探究 SP1 通过影响 ACSL4 的转录促进 VSMCs 铁死亡 | 42 |
| 3.6.1 筛选 SP1 下游铁死亡相关的靶结合基因 | 42 |
| 3.6.2 ScRNA-seq 发现在血管损伤后 SP1 和 ACSL4 具有显著的正相关性 | 42 |
| 3.6.3 在大鼠颈动脉球囊损伤模型中 ACSL4 的表达情况 | 43 |
| 3.6.4 SP1 与 ACSL4 的相互作用关系及初步验证 | 44 |
| 第 4 章 讨论 | 46 |
| 4.1 ScRNA-seq 揭示血管损伤后的不同细胞亚群及其异质性 | 46 |
| 4.2 铁死亡影响血管损伤后新生内膜的发生发展 | 47 |
| 4.2.1 铁死亡在 SD 大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜形成中发挥重要作用 | 47 |
| 4.2.2 铁死亡对血管平滑肌细胞表型转化及增殖迁移的调控作用 | 48 |
| 4.3 SP1 在调控 VSMCs 表型转化及铁死亡中的关键作用 | 49 |
| 4.3.1 SP1 调控血管平滑肌细胞表型转化 | 49 |
| 4.3.2 SP1 参与调控铁死亡 | 49 |
| 4.4 ACSL4 在铁死亡中的作用及 SP1 对其转录调控的机制 | 50 |

| | |
|---------------------------------|------------|
| 4.5 总结与展望 | 51 |
| 第 5 章 结论 | 52 |
| 第 6 章 综述 | 53 |
| 铁死亡在心血管疾病中的研究进展 | 53 |
| 6.1 铁死亡的分子机制 | 53 |
| 6.1.1 铁代谢 | 53 |
| 6.1.2 谷胱甘肽代谢 | 54 |
| 6.1.3 脂质代谢 | 55 |
| 6.2 铁死亡和心血管疾病 | 56 |
| 6.2.1 动脉粥样硬化进程中的铁死亡调控 | 56 |
| 6.2.2 心肌梗死中的铁死亡 | 56 |
| 6.2.3 心肌缺血-再灌注损伤过程中的铁死亡机制 | 57 |
| 6.2.4 铁死亡和心力衰竭 | 58 |
| 6.2.5 铁死亡和其它心血管疾病 | 58 |
| 6.3 结论与展望 | 59 |
| 参考文献 | 60 |
| 致谢 | 70 |
| 作者简介 | 71 |
| 导师评阅表 | 错误! 未定义书签。 |

中英文缩略词表

| 英文缩写 | 英文全名 | 中文译名 |
|---------------|--|--------------------|
| PCI | Percutaneous coronary intervention | 冠状动脉介入治疗术 |
| CHD | Coronary atherosclerotic heart disease | 冠心病 |
| ISR | In-stent restenosis | 支架内再狭窄 |
| VSMCs | Vascular smooth muscle cells | 血管平滑肌细胞 |
| ScRNA-seq | Single-cell RNA sequencing | 单细胞 RNA 测序 |
| MDA | Malondialdehyde | 丙二醛 |
| GSH | Glutathione | 谷胱甘肽 |
| SP1 | Specificity Protein 1 | 特异性蛋白 1 |
| ACSL4 | Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4 | 长链脂酰辅酶 A 合成酶家族成员 4 |
| OPN | Osteopontin | 骨桥蛋白 |
| Vimentin | Vimentin | 波形蛋白 |
| α -SMA | Alpha-Smooth Muscle Actin | α -平滑肌肌动蛋白 |
| Tf | Transferrin | 转铁蛋白 |
| Era | Erastin | 爱拉斯汀 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate Buffer Solution | 磷酸盐缓冲液 |

第 1 章 前言

根据《中国心血管健康与疾病报告 2023》统计学数据显示，我国冠心病（Coronary Heart Disease, CHD）的发病率正逐步上升，对居民健康构成严重威胁^[1]。经皮冠状动脉介入治疗（Percutaneous Coronary Intervention, PCI）作为血运重建的主要手段，其治疗效果与支架选择密切相关，据报道，接受裸金属支架（Bare Metal Stent, BMS）植入的患者中，支架内再狭窄（in-stent restenosis, ISR）的发生概率大约在 5%到 30%之间^[2]。相比之下，采用药物涂层支架（Drug-Eluting Stent, DES）进行治疗后，临床数据显示该并发症的发生率明显下降，降至 2%至 10%的范围内^[3]。尽管如此，考虑到接受 DES 治疗心血管问题的人口基数大，PCI 术后再狭窄问题在临床上依然具有较大的挑战性。

PCI 术后再狭窄是一种血管局部损伤后发生的修复反应，主要的病理特征是血管内膜的增生^[4]。新生内膜增生是由多种细胞因子和生物活性物质共同调控的一系列连续过程，主要表现为内皮细胞损伤或功能异常、炎症反应发生、血管平滑肌细胞（Vascular smooth muscle cells, VSMCs）从中膜层逐步迁移至内膜层并增殖、大量细胞外基质合成与沉积及血管持续性重构，最终导致血管管腔狭窄^[5]。在此过程中，VSMCs 由收缩表型转变为合成表型，其特征是收缩型 VSMCs 表型标志物肌动蛋白（Smooth Muscle Actin, SMA）和钙调蛋白 1（Calponin）表达显著降低，而合成表型标志物波形蛋白（Vimentin）表达增加^[6]。随着收缩蛋白表达的降低，合成型 VSMCs 的增殖和迁移能力得到了增强，这在修复血管损伤中起重要作用^[7]。课题组前期研究发现：在血管损伤后不同时间点，VSMCs 收缩表型标志物 Calponin、SMA 在新生内膜中表达，其中在早期表达最高，在后期逐渐下降，而合成表型标志物 Vimentin 主要在损伤后期表达最高，但是目前对于血管损伤后影响 VSMCs 表型的研究并不深入。

近年研究发现，铁死亡（Ferroptosis）在不同类型的心血管疾病中起重要作用，包括心肌病、心肌梗死、心力衰竭、血管损伤等^[8]。铁死亡是一种由铁离子介导的程序性细胞死亡形式，主要表现是细胞内铁离子蓄积和脂质活性氧（lipid-ROS）过度累积所引发的级联反应。铁死亡发生的机制主要包括脂质代谢、铁离子代谢和氨基酸代谢三条途径：（1）脂质代谢途径是由溶酶-磷脂酰胆碱酰基转移酶 3（Lyso-Phosphatidylcholine Acyltransferase-3, LPCAT3）和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4（Acyl-CoA Synthetase Long-chain Family Member 4, ACSL4）催化多不饱和脂肪酸（Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA）的氧化，产生脂质过氧化物，致使脂质过氧化物积累，最终导致铁死亡发生^[9]；（2）铁代谢途径是转铁蛋白受体 1（Transferrin Receptor 1, Tfr1）介导 Fe 摄入，使 Fe³⁺

还原为 Fe^{2+} 导致游离铁的积累，出现铁超载现象，进而芬顿反应生成大量 ROS，最终导致铁死亡发生^[10]；（3）氨基酸代谢途径是 System Xc-系统（SLC7A11、SLC3A2）功能受损时，细胞内半胱氨酸供应不足，抑制 GPX4 活性，最终诱导铁死亡的发生^[9]。

在本研究中基于生信分析筛选出影响铁死亡和再狭窄的关键调节基因特异性蛋白 1（Specificity Protein 1, SP1），是一种结合 DNA 并启动基因的蛋白质。周等人发现 SP1 通过 LINC01088/USP7/HLTF/SLC7A11 信号轴调控胶质母细胞瘤的铁死亡，影响肿瘤的发生发展^[11]。SP1 与 SLC7A11 启动子区的结合，上调 SLC7A11 表达，抑制乳腺癌细胞的铁死亡敏感性，促进肿瘤的增殖和转移^[12]。在硒补充剂作用下，TFAP2C 和 SP1 能直接正向调控 GPX4 的表达，抑制铁死亡，从而有效减轻出血性脑卒中诱导的脑损伤^[13]。Li 等人证明，SP1 通过调节肠缺血再灌注疾病中的 ACSL4 诱导铁死亡，进而诱导组织损伤^[14]。但在心血管领域，还没有关于 SP1 与铁死亡之间关系的明确研究。

近年来研究表明，铁死亡与 VSMCs 的表型转化密切相关，铁死亡能够诱导 VSMCs 表型转化并加速诱导小鼠颈动脉结扎后新内膜增生^[15]。最新研究指出，血管损伤后线粒体动力学紊乱和 ROS 产生通过对 VSMCs 表型调控促进新内膜形成^[16]。香烟烟雾提取物（CSE）通过消耗谷胱甘肽（GSH）和减少谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）表达，引发了 VSMCs 的铁死亡，导致血管损伤^[17]。本课题组通过对单细胞数据库中 ISR 的血管组织进行分析，发现 ISR 血管中的铁死亡相关分子 GPX4 表达减少，SLC7A11 表达增加。细胞亚群显示在 ISR 组中主要细胞成分是 VSMCs 和成纤维细胞。而 VSMCs 亚群中，再狭窄组的 GPX4 的表达减少。表明铁死亡在再狭窄过程中发挥重要作用。

长链脂质辅酶 A 合酶 4 (Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4, ACSL4) 是铁死亡的关键调节因子，可以通过调节细胞脂质代谢调节铁死亡敏感性。作为一种脂肪酰辅酶 A 合成酶，主要负责催化长链脂肪酸与辅酶 A (CoA) 结合生成脂酰辅酶 A (acyl-CoA)。ACSL4 能够通过触发脂质过氧化和磷脂过氧化，加剧细胞铁死亡。Ji 等发现在血管损伤后，靶血管中的促铁死亡分子 ACSL4 蛋白水平升高^[18]。在炎症疾病中，SP1 可以通过与启动子区域结合来提高其水平，促进铁死亡发生^[19]。在缺血后 SP1 可以通过与 ACSL4 启动子区域结合来上调 ACSL4 表达，诱导铁死亡发生参与 ISR 损伤^[14]。但在血管损伤后，SP1 和 ACSL4 的调控关系并不明确。

因此，为了探究 SP1 通过 ACSL4 介导铁死亡在血管损伤后影响 VSMCs 表型转化的潜在机制，本研究通过构建 SD 大鼠颈动脉球囊损伤模型，观察靶血管组织中的铁死亡水平；基于单细胞测序技术阐明 VSMCs 的细胞发育轨迹及其细胞异质性，并在 VSMCs 中干预 SP1 的表达，探究其对铁死亡及其血管平滑肌细胞表型转化的影响，分析血管损伤后 VSMCs 中 SP1 和 ACSL4 的调控关系。通过单细胞测序和公共数据库的联合分析，探索 SP1 通过 ACSL4 调控铁死亡影响 VSMCs 表型转化的分子机制，为防治 PCI 术后再狭窄提供有效的治疗靶点。

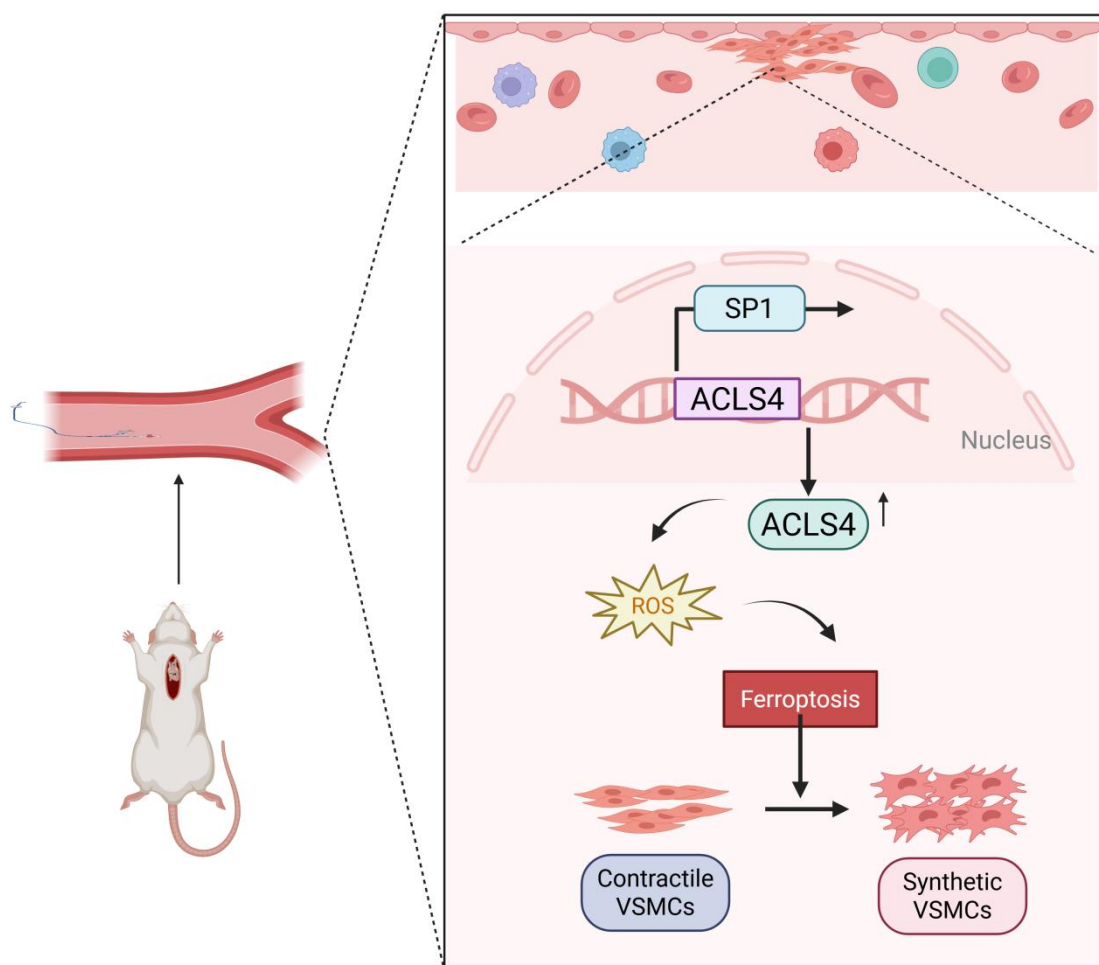


图 1-1 论文假说图（自行绘制）：血管损伤后，SP1 可能通过与铁死亡关键调节因子ACSL4 的启动子结合，上调ACSL4 的转录表达，进而介导VSMCs中的铁死亡发生，促进VSMCs向合成本型转化，参与新生内膜的形成。

第 2 章 材料方法

2.1 实验材料

2.1.1 研究对象

实验动物采用雄性 Sprague-Dawley 品系大鼠，来自新疆医科大学动物实验中心和湛江中心人民医院动物实验中心。

细胞模型采用大鼠主动脉胸平滑肌细胞系（A7R5），来自中国科学院上海细胞库。

2.1.2 主要试剂、耗材和仪器

表 2-1 SD 大鼠颈动脉球囊损伤相关器械及试剂

| 试剂和仪器 | 生产公司 |
|------------|------------------|
| 三溴乙醇 | 南京爱贝生物公司 |
| 1ml 注射器 | 山东朱氏药业集团有限公司 |
| 75%医用酒精 | 山东利尔康医疗科技股份有限公司 |
| 医用碘伏 | 山东利尔康医疗科技股份有限公司 |
| 组织剪 | 新华手术器械 |
| 眼科剪 | 新华手术器械 |
| 血管剪 | 新华手术器械 |
| 直镊 | 新华手术器械 |
| 弯镊 | 新华手术器械 |
| 持针器 | 新华手术器械 |
| 大鼠动脉夹 | 北京合力科创科技发展有限公司 |
| 手术缝合线 | SILK 泰丝 |
| EDTA 真空采血管 | 重庆华雅思创生物医药科技有限公司 |
| 一次性血样采集针 | 重庆华雅思创生物医药科技有限公司 |
| 三溴乙醇 | 南京爱贝生物公司 |