

GSK-3 β 在斑马鱼脑缺氧/复氧损伤中的作用及其对微管相关蛋白 2 的影响

杨梦思^{1,2} 张 丽^{1,2} 胡宪文^{1,2}

摘要 目的 探究斑马鱼脑缺氧/复氧(H/R)过程中糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β)的作用及其对微管相关蛋白 2(MAP2)的影响。方法 建立斑马鱼 H/R 模型,选用健康同等体形成鱼,分为对照(Control)组、缺氧/复氧(H/R)组、缺氧/复氧+GSK-3 β 抑制剂(H/R+TDZD-8)组进行实验。选取各组斑马鱼脑组织,通过 qRT-PCR 测定缺氧诱导因子 Hif-1 α 、Hif-1 α b 在不同复氧时间点 mRNA 表达情况,TTC 染色与 TUNEL 染色检测脑梗死面积及细胞凋亡,Western blot 检测 Hif-1 α 、GSK-3 β 、p-GSK-3 β (Ser 9)、MAP2 的蛋白表达水平,免疫荧光染色检测 MAP2 在脑中的分布和表达情况。结果

与 Control 组相比,H/R 组 Hif-1 α 、Hif-1 α b 的 mRNA 及 Hif-1 α 蛋白表达水平升高($P < 0.01$),脑梗死面积及凋亡细胞增多($P < 0.01$),p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β 比值、MAP2 蛋白表达降低($P < 0.05$),MAP2 免疫荧光表达下降($P < 0.01$);与 H/R 组比较,TDZD-8 预处理能够减少斑马鱼脑梗死面积及细胞凋亡($P < 0.01$),增加 p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β 比值、MAP2 蛋白表达($P < 0.01$),增加 MAP2 免疫荧光表达($P < 0.01$)。结论 缺氧/复氧可造成斑马鱼脑神经元损伤,其机制可能与抑制 GSK-3 β 磷酸化和 MAP2 的表达有关。GSK-3 β 特异性抑制剂 TDZD-8 可通过促进 p-GSK-3 β (Ser 9)的表达,减少 MAP2 的降解,从而逆转缺氧/复氧对斑马鱼脑神经元的损伤。

关键词 斑马鱼;脑缺氧/复氧损伤;糖原合酶激酶 3 β ;微管相关蛋白 2;TDZD-8

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0202-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.005

脑卒中或心脏骤停常导致缺氧缺血性神经损伤。脑缺氧/复氧(cerebral hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤的病理生理机制十分复杂,包括 ATP 丧失、自由基产生和细胞死亡等^[1]。因此,探讨 H/R 损伤的作用机制至关重要。

磷酸酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β , PI3K/Akt/GSK-3 β)通路是参与调节神经元凋亡^[2]的重要信号机制。GSK-3 β 特异性抑制剂 4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑啉-3,5-二酮(4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione, TDZD-8)预处理可显著改善缺氧脑损伤^[3]。细胞骨架是维持神经细胞形态结构的重要基础,当受到应激等相关刺激时随之改变^[4]。微管是其组成基础,微管相关蛋白 2(microtubule associated protein 2, MAP2)能够调控神经元微管结构的稳定性。研究^[5]表明,GSK-3 β 的失活会导致 MAP2 磷酸化减少,并增加微管的结合和稳定性。然而 GSK-3 β 对下游微管蛋白 MAP2 的调节是否参与了 H/R 损伤机制尚未见报道。该研究利用 TDZD-8 研究斑马鱼 H/R 模型中 GSK-3 β 的作用及其对 MAP2 蛋白的影响,以探究 H/R 损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 斑马鱼由中国科技大学实验室提供,安徽医科大学第二附属医院麻醉科实验室饲养。控制温度为 28.5 °C,光照/黑暗为 12 h : 12 h 交替循环。许可证号:USTCACUC1103013。

1.1.2 主要试剂 氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-tetrazoliumchloride, TTC) 购自美国 Sigma 公司;TUNEL 凋亡试剂盒、提取 RNA 试剂盒、逆转录试剂盒、高特异性染料法定量 PCR 检测试剂盒购自南京 Vazyme 公司;引物和蛋白提取试剂盒购自上海 Sangon Biotech 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海 Beyotime 公司;GAPDH、GSK-3 β 、MAP2 Western blot 抗体购自武汉 proteintech 公司;Hif-1 α 抗体购

2022-12-30 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085QH358);安徽省卫生健康委科研项目(编号:AHWJ2021a017);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵育计划(编号:2020GQFY01)

作者单位:¹ 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室,合肥 230601

² 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥 230601

作者简介:杨梦思,女,硕士研究生;

胡宪文,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: huxianwen001@126.com

自美国 Novus Biologicals 公司; p-GSK-3 β 、MAP2 免疫荧光染色抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司。

1.1.3 主要仪器 溶氧仪(上海仪电科学仪器股份有限公司),倒置荧光显微镜(Carl Zeiss 公司),PCR 仪(伯乐 BIO-RAD 生命医学产品有限公司),细胞破碎仪(上海净信实业发展有限公司),多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司),凝胶成像系统(上海天能科技有限公司),冰冻切片(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼急性缺氧模型 通过注入高纯氮气(纯度为 99.99%)去除养鱼水中的溶解氧,用溶氧仪测量水中溶氧量水平至 0.3 g/L 以下^[6],迅速将斑马鱼放入水中,持续监测养鱼水中溶氧水平,创造一个封闭的缺氧环境进行急性缺氧。鱼的缺氧状态分为第一阶段(在水面游动)、第二阶段(不能采取正常姿势)、第三阶段(鳃盖短暂不规律的搏动)和第四阶段(身体扭曲死亡)^[1]。当缺氧斑马鱼达到第三阶段 1 min 时,迅速将斑马鱼从缺氧环境中取出,置于常氧环境中复氧 6 h 后进行下一步实验操作。

1.2.2 实验分组 随机取健康同等体型成鱼每组各 6 条,分为对照(Control)组、缺氧/复氧(H/R)组、缺氧/复氧+GSK-3 β 抑制剂(H/R+TDZD-8)组进行实验。其中 Control 组不做任何处理,H/R 组在急性缺氧后转移至正常养鱼水中进行 6 h 的复氧,H/R+TDZD-8 组斑马鱼则预先放入含有浓度为 1 μ mol/L TDZD-8 的养鱼水中 4 h,再用养鱼水或 PBS 清洗 5 min 后,进行缺氧/复氧造模,而后在复氧时间终点进行取材。

1.2.3 TTC 染色检测脑梗死面积 将斑马鱼用 MS-222 进行麻醉,在显微镜下用眼科镊取出脑组织,进行新鲜脑组织切片,将其切为 1 mm 厚度的薄片,避光置于 2% 的 TTC 溶液之中室温染色 40 min,染色后将脑片取出置于 4% 的多聚甲醛溶液中终止染色并固定,用显微镜进行拍照。

1.2.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡 麻醉后取成鱼脑组织于 4% 多聚甲醛固定过夜,使用 20%~30% 的蔗糖溶液脱水 48 h 后进行冰冻切片,厚度为 10 μ m。取各组切片用 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。加入含 0.5% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 5 min, PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。参照 TUNEL 试剂盒使用说明,每个样本上滴加 50 μ l TUNEL 检测液,湿盒内 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次。待玻片干

后,在每个样品中加入含抗荧光淬灭 DAPI 各 50 μ l,封片后荧光显微镜观察。各组切片取中脑视顶盖,在荧光显微镜下放大 200 倍观察,统计视野内绿色荧光点和蓝色荧光点的数目,计算细胞凋亡率 = (绿色荧光细胞/蓝色荧光细胞) \times 100%。

1.2.5 qRT-PCR 各组斑马鱼到达时间点后,用 MS-222 麻醉,按照 RNA 提取试剂盒步骤提取脑组织 RNA,应用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。将 cDNA 按照 SYBR qPCR SuperMix 试剂盒步骤进行荧光定量 PCR,每组设置 3 个复孔,采用相对定量法进行分析,计算出 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行数据统计。 β -actin 上游引物为: 5'-CCCTGTTCAGCCATCCTT-3',下游引物为: 5'-TTGAAAGTGGTCTCGTGGAT-ACC-3'; Hif-1 α 上游引物为: 5'-CCAGTGAAC-CAGACATCAG-3',下游引物为: 5'-AGGAGGGTA-AGGGTTGGAAT-3'; Hif-1 α b 上游引物为: 5'-AT-GAGAGGGAGTTGCTAGATTC-3',下游引物为: 5'-AGGAGGGTAAGGGTTGGAAT-3'。

1.2.6 Western blot 取脑组织放入研磨管中,预冷 PBS 冲洗,加入蛋白提取试剂盒内配制好的裂解液,在全自动样品快速研磨仪中 60 Hz 研磨 60 s。将匀浆液置于冰上放置 40 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为全蛋白,置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。使用 BCA 蛋白定量试剂盒在酶标仪内测定 562 nm 处各组蛋白光密度(optical density, OD)值,绘制标准蛋白曲线,进行蛋白定量。上样缓冲液:全蛋白提取液按体积比 1:4 混匀,100 $^{\circ}$ C 煮 10 min。室温冷却后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。取 20 μ g 蛋白样品,8% SDS-PAGE 凝胶电泳,浓缩胶为 70 V、30 min,分离胶为 100 V、90 min。转移至 PVDF 膜,200 mA 恒流 300 min。置于快速封闭液中室温下封闭 15 min。一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,分别为 GAPDH(1:80 000)、Hif-1 α (1:1 000)、GSK-3 β (1:4 000)、p-GSK-3 β (Ser9)(1:1 000)、MAP2(1:1 000)。TBST 清洗 10 min,共 3 次,将条带置于室温下孵育相对应的二抗,山羊抗兔 IgG(1:10 000)或山羊抗鼠 IgG(1:10 000)室温孵育 60 min。凝胶成像系统显影,Image J 软件计算蛋白条带灰度值。

1.2.7 免疫荧光染色 取冰冻脑组织切片 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液通透 60 min。5% BSA 溶液封闭 30 min。免疫荧光染色一抗 MAP2(1:500) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。绿色荧光二抗(1:500)室温避光孵育 1 h。样本上滴加适量 DAPI 与抗荧光淬灭封片液封片。各组切片取中脑

视顶盖区域 荧光显微镜下放大 200 倍观察后拍照 , 使用 Image J 软件测定荧光强度。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析 , 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 两组间比较采用 *t* 检验 , 多组间比较采用单因素方差分析 , *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 斑马鱼急性缺氧模型的构建及鉴定 与 Control 组相比 缺氧 2 h/复氧 3 h、6 h、24 h 后缺氧诱导因子 Hif-1 α a 和 Hif-1 α b 的 mRNA 均升高 其中复氧 6 h 后 mRNA 升高最为显著 (*F* = 10.78 , *P* < 0.01) , 本研究选择复氧 6 h 组进行 Hif-1 α 蛋白的检测 , 结果显示 Hif-1 α 蛋白表达量增加 (*t* = 4.780 , *P* < 0.01) , 因此 后续实验复氧时间均选择 6 h 作为复氧终点。见图 1。

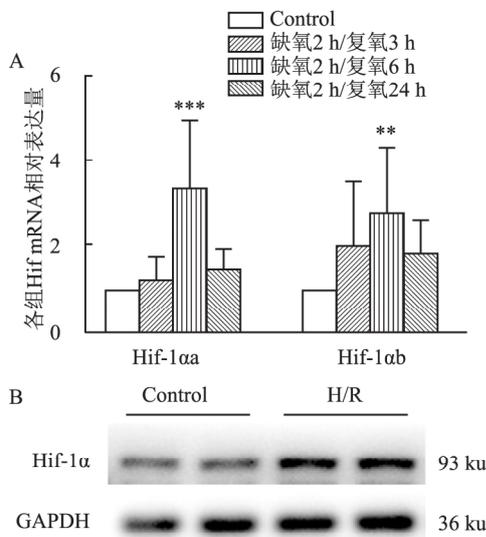


图1 斑马鱼急性缺氧模型建立

A: 缺氧诱导因子 Hif-1 α a、Hif-1 α b 在不同复氧时间点(3、6、24 h)的 mRNA 相对表达量(*n* = 7); B: 缺氧 2 h/复氧 6 h 时 Hif-1 α 蛋白相对表达量(*n* = 6); 与 Control 组比较: ***P* < 0.01 , ****P* < 0.001

2.2 TDZD-8 对 H/R 斑马鱼脑组织梗死面积的影响 TTC 染色结果显示 , 与 Control 组相比 , H/R 组的白色梗死区域增多 (*F* = 28.77 , *P* < 0.01); 与 H/R 组相比 , H/R + TDZD-8 组梗死区域减少 (*F* = 26.91 , *P* < 0.01)。见图 2。

2.3 TDZD-8 对 H/R 斑马鱼神经细胞凋亡的影响

TUNEL 染色检测结果显示 , 斑马鱼中脑视顶盖小球周灰质带 (periglomerular gray zone , PGZ) 区域有多层紧密的神经细胞核排列 , 选择此区域进行

TUNEL 染色观察。与 Control 组相比 , H/R 组细胞凋亡率升高 (*F* = 25.14 , *P* < 0.01); 与 H/R 组相比 , H/R + TDZD-8 组细胞凋亡率下降 (*F* = 22.79 , *P* < 0.01)。见图 3。

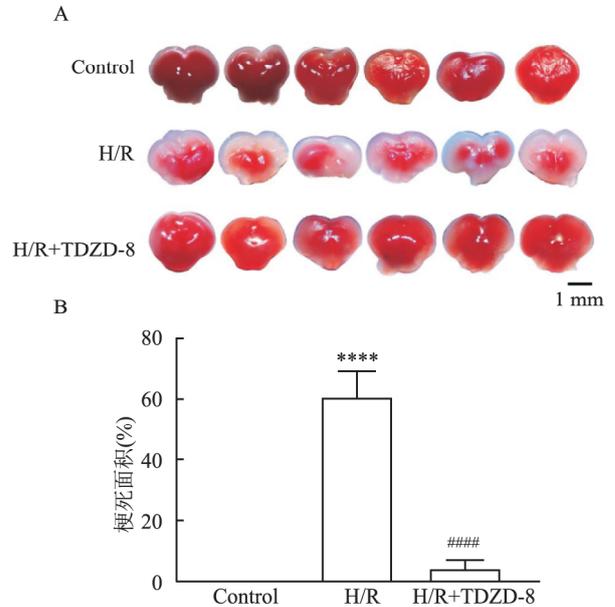


图2 斑马鱼脑梗死面积($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

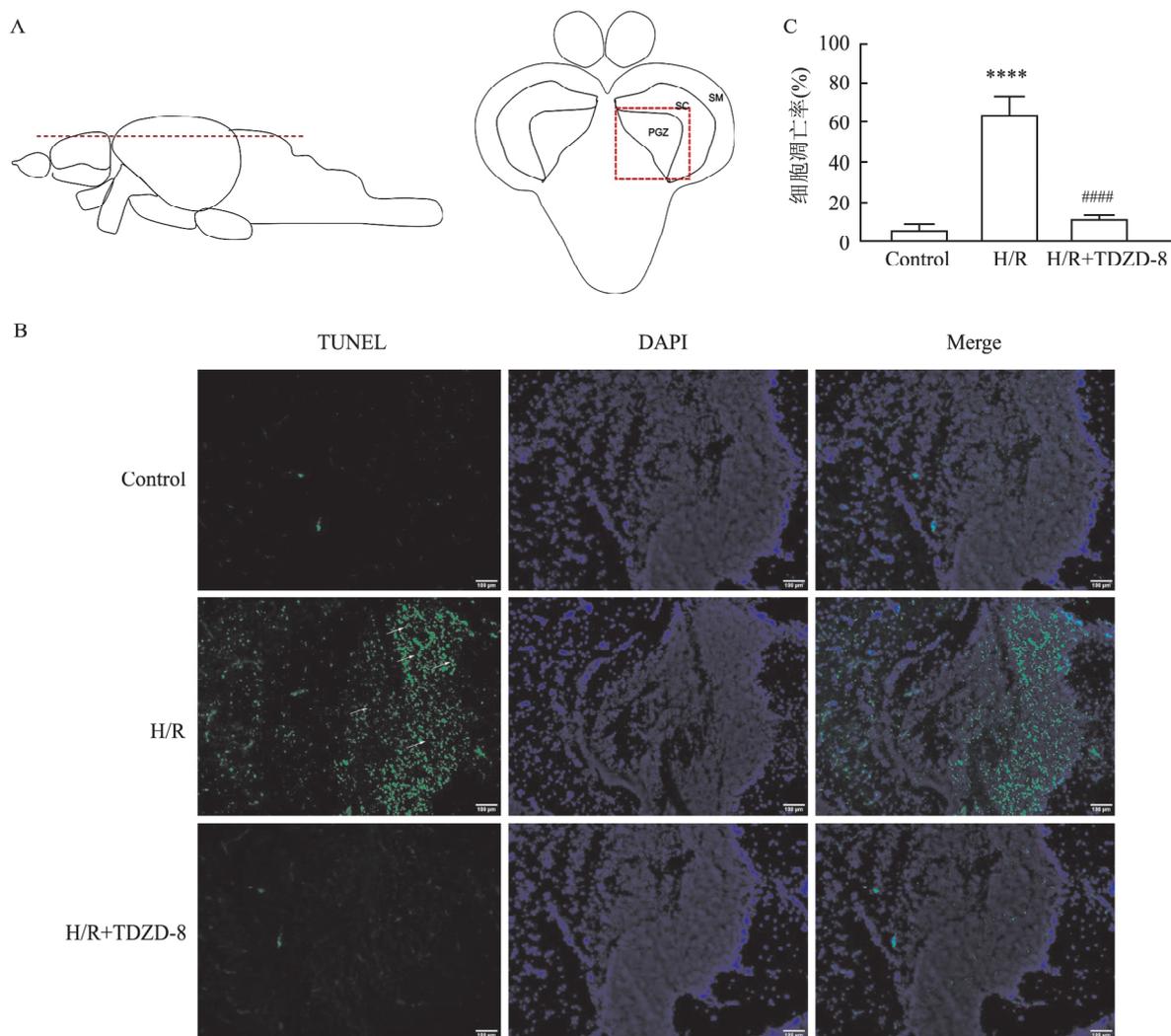
A: 斑马鱼脑组织 TTC 染色图片; 红色: 非缺血区; 白色: 梗死区; B: 脑组织梗死面积 / 脑组织总面积的统计分析图; 与 Control 组比较: *****P* < 0.0001; 与 H/R 组比较: #####*P* < 0.0001

2.4 TDZD-8 对 H/R 斑马鱼脑组织中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 、MAP2 蛋白表达量的影响

Western blot 检测结果显示 , 各组 GSK-3 β 蛋白水平无显著差异; 与 Control 组相比 , H/R 组 p-GSK-3 β (Ser 9) /GSK-3 β 比值降低 (*F* = 9.103 , *P* < 0.01) , MAP2 蛋白水平降低 (*F* = 3.709 , *P* < 0.05); 与 H/R 组相比 , H/R + TDZD-8 组的 p-GSK-3 β (Ser 9) / GSK-3 β 比值升高 (*F* = 6.562 , *P* < 0.01) , MAP2 表达量增加 (*F* = 4.934 , *P* < 0.01) , 表明 TDZD-8 预处理能够改善斑马鱼脑缺氧/复氧导致的 p-GSK-3 β (Ser 9) 以及 MAP2 蛋白的表达减少。见图 4。

2.5 TDZD-8 对 H/R 斑马鱼脑组织 MAP2 的分布与表达的影响

免疫荧光染色结果显示 , 斑马鱼中脑视顶盖边缘层 (stratum marginale , SM) 及中央层 (stratum centrale , SC) 神经细胞分布较少 , 其内有许多神经纤维穿过 , 故在此区域观察 MAP2 的荧光表达与分布。与 Control 组和 H/R + TDZD-8 组相比 , H/R 组 MAP2 荧光分布和表达减少 (*F* = 10.70 , *P* < 0.01; *F* = 6.788 , *P* < 0.01)。见图 5。

图3 斑马鱼神经元凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A: 斑马鱼中脑水平切面示意图; 红色虚线框选区域为视顶盖小球周灰质带 (PGZ); SM: 边缘层; SC: 中央层; PGZ: 小球周灰质带; B: TUNEL 法检测神经元凋亡 $\times 200$; 箭头所标为凋亡阳性细胞; C: 凋亡细胞的统计分析; 与 Control 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 H/R 组比较: #### $P < 0.001$

3 讨论

脑缺氧/缺血可引发组织梗死, 因为缺氧和能量剥夺会在数分钟内造成神经元的结构损伤, 导致神经细胞凋亡和坏死^[7]。斑马鱼和人类之间高度的遗传同源性, 及其光学透明度高特性, 使得斑马鱼在研究缺血/再灌注或缺氧/复氧损伤的脑血管病理机制上具备优越性, 这将有助于更好地了解人类脑血管疾病的病因机制, 以取得新的治疗进展^[8]。Sawahata et al^[9]的研究显示, 采用缺氧再氧处理构建的斑马鱼脑缺氧模型已被证实具有诱导脑缺血再灌注的作用, 其机制是由于持续的缺氧加重了心脏负荷, 导致血液循环恶化, 造成中脑中央动脉供血不足而引起血流中断, 而复氧引起的血管收缩则能够

改善脑血管血流中断的情况。缺氧诱导因子 1 是细胞对缺氧应激反应的主要调节因子, Hif-1 α 通过基因复制产生两组同源物分别为 Hif-1 α a 和 Hif-1 α b, 因此本研究选择 Hif-1 α a 和 Hif-1 α b 检测 mRNA 的表达, 然后使用 Western blot 检测 Hif-1 α 进行进一步验证。本研究中, H/R 斑马鱼脑组织 TTC 染色中的白色梗死面积的增加证明 H/R 造模成功中断了脑血流灌注, TUNEL 染色中 H/R 组斑马鱼脑组织中的凋亡细胞增多也表明 H/R 诱导了斑马鱼神经元凋亡, 说明斑马鱼脑缺氧/复氧损伤模型构建成功。

PI3K/Akt 途径是 H/R 损伤后的神经细胞存活主要通路之一^[10]。GSK-3 β 是 Akt 的下游靶点, 通过磷酸化 Akt 的激活而受到抑制^[11]。本研究结果

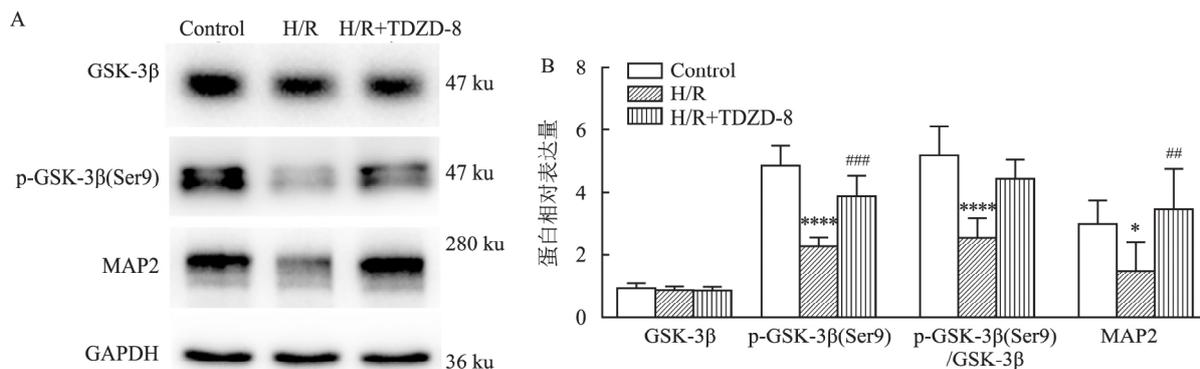


图4 p-GSK-3β / GSK-3β 和 MAP2 蛋白相对表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: 斑马鱼脑组织中的 GSK-3β、p-GSK-3β 和 MAP2 蛋白印迹; B: 蛋白结果量化统计图; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$; 与 H/R 组比较: ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

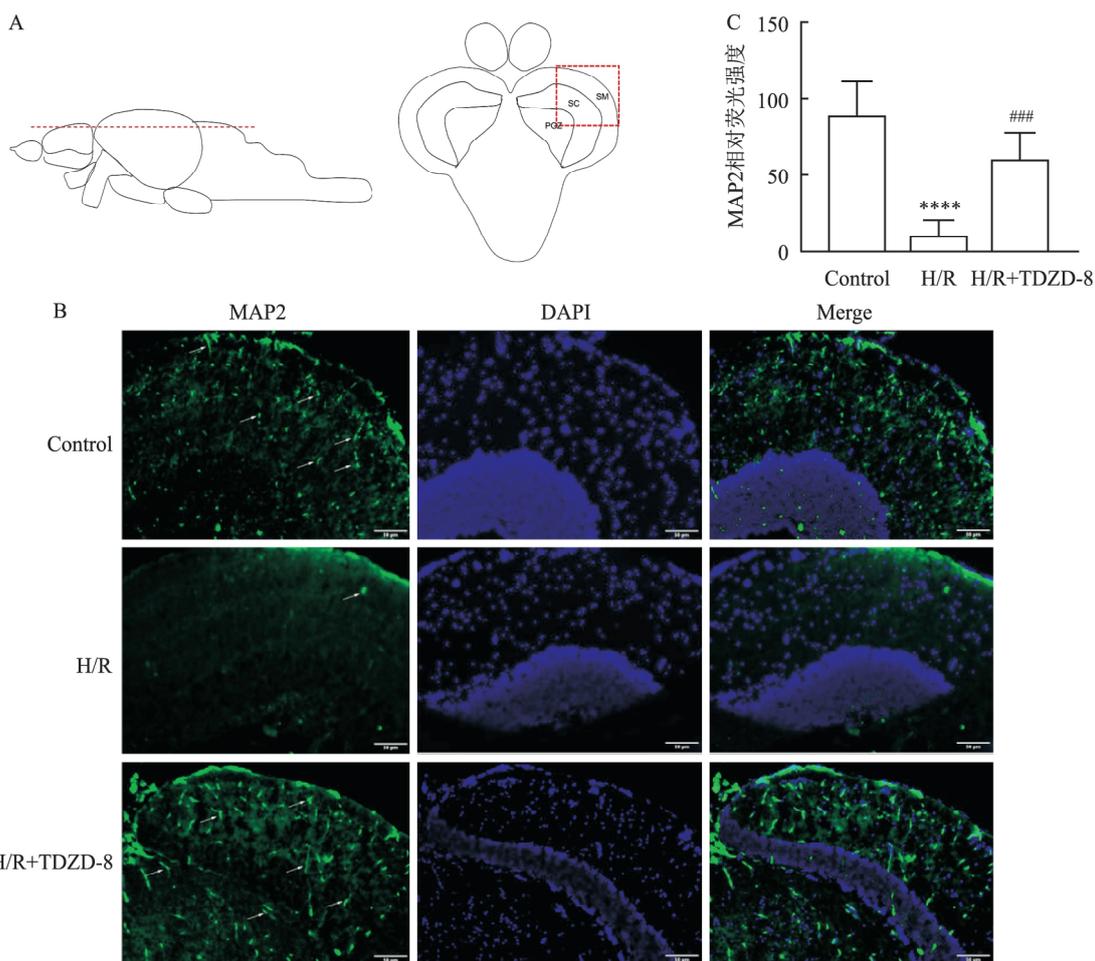


图5 免疫荧光检测各组 MAP2 的分布与表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: 斑马鱼中脑水平切面示意图; 红色虚线框选区域为视顶盖边缘层及中央层; B: 斑马鱼中脑视顶盖区 MAP2 的分布与荧光表达 $\times 200$; 箭头所标为 MAP2 阳性细胞; C: MAP2 相对荧光强度的统计分析; 与 Control 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 H/R 组比较: ### $P < 0.001$

显示, 中枢神经系统中 GSK-3β 的 Ser9 位点磷酸化因 H/R 损伤而减少, 导致缺氧引起的神经元死亡, 这与先前的研究^[12] 结果一致。MAP2 是调节微管动态组装特性的一类细胞骨架蛋白, 其在缺血和代谢受到损害后发生降解^[13], 但这种降解的时间过程和

初始触发因素尚不完全清楚。本研究结果显示, H/R 导致 p-GSK-3β / GSK-3β 比值下降, MAP2 蛋白与免疫荧光表达均降低。免疫荧光结果显示, MAP2 主要分布于斑马鱼中脑视顶盖外缘层及中央层, 其内主要为神经纤维, 用于维持微管稳定。MAP2 蛋

白表达量在 H/R 后出现下降。为进一步阐明 MAP2 的降解与 GSK-3 β 的关系,本研究使用了高选择性 GSK-3 β 抑制剂 TDZD-8 进行预处理。结果证明,TDZD-8 在不影响其他激酶的情况下,可选择性地激活 GSK-3 β 的 Ser9 位点磷酸化从而抑制 GSK-3 β 的活性^[14],并能保护大脑免受缺血/再灌注损伤^[15]。本研究实验结果表明,TDZD-8 预处理能够减轻斑马鱼 H/R 损伤造成的脑梗死和神经细胞凋亡,提高斑马鱼脑组织中的 p-GSK-3 β /GSK-3 β 的比值以及 MAP2 蛋白和荧光的表达。上述研究结果提示斑马鱼 H/R 导致的脑损伤可能是由于缺氧/复氧抑制了 GSK-3 β 在 Ser9 位点的磷酸化而使其活化,促进了 MAP2 蛋白的降解造成神经元微管稳态失衡,最终导致神经元凋亡。

综上所述,GSK-3 β 参与了斑马鱼 H/R 损伤的神经机制,并且与 MAP2 存在相关性,TDZD-8 通过抑制 GSK-3 β 活性减少 MAP2 的降解,从而减少脑梗死面积及神经元凋亡,最终有效改善脑缺氧/复氧损伤。但该研究的局限性在于并没有进一步证明 GSK-3 β 对 MAP2 磷酸化的调节作用,以及干扰 MAP2 表达后对 GSK-3 β 及 H/R 损伤的影响,需进一步深入研究其具体机制,为保护脑缺氧/复氧造成的神经损伤提供一种新思路。

参考文献

- [1] Kim Y, Won Y J, Lim B G, et al. Neuroprotective effects of magnesium l-threonate in a hypoxic zebrafish model[J]. BMC Neuroscience, 2020, 21(1): 29.
- [2] Wang L, Zhang Z, Wang H. Downregulation of lncRNA GASS prevents mitochondrial apoptosis and hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats through the microRNA-128-3p/Bax/Akt/GSK-3beta axis[J]. Neuroreport, 2021, 32(17): 1395-402.
- [3] Huang S, Wang H, Turlova E, et al. GSK-3beta inhibitor TDZD-8 reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(5): 405-15.
- [4] 袁 杨,刘 昊,王海涛,等. 抑郁大鼠海马区微管蛋白表达的变化[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(3): 355-7.
- [5] Lim C S, Walikonis R S. Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway[J]. Cell Signal, 2008, 20(5): 825-35.
- [6] Zou X, Liu Q, Guo S, et al. A novel zebrafish larvae hypoxia/reoxygenation model for assessing myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Zebrafish, 2019, 16(5): 434-42.
- [7] Braga M M, Rico E P, Cordova S D, et al. Evaluation of spontaneous recovery of behavioral and brain injury profiles in zebrafish after hypoxia[J]. Behav Brain Res, 2013, 253: 145-51.
- [8] Das T, Soren K, Yerasi M, et al. Revealing sex-specific molecular changes in hypoxia-ischemia induced neural damage and subsequent recovery using zebrafish model [J]. Neuroscience Letters, 2019, 712: 134492.
- [9] Sawahata M, Izumi Y, Akaike A, et al. In vivo brain ischemia-reperfusion model induced by hypoxia-reoxygenation using zebrafish larvae[J]. Brain Res Bull, 2021, 173: 45-52.
- [10] Diao M, Zhu Y, Yang J, et al. Hypothermia protects neurons against ischemia/reperfusion-induced pyroptosis via m6A-mediated activation of PTEN and the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2020, 159: 25-31.
- [11] Engels J, Elting N, Braun L, et al. Sildenafil enhances quantity of immature neurons and promotes functional recovery in the developing ischemic mouse brain [J]. Dev Neurosci, 2017, 39(1-4): 287-97.
- [12] Joshi B, Singh D, Wasan H, et al. Tideglusib ameliorates ischemia/reperfusion damage by inhibiting GSK-3beta and apoptosis in rat model of ischemic stroke [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2022, 31(4): 106349.
- [13] Hua H, Zhang W, Li J, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion by dietary phytochemical extracts from Tibetan turnip (*Brassica rapa L.*) [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113410.
- [14] Koehler D, Shah Z A, Hensley K, et al. Lanthionine ketimine-5-ethyl ester provides neuroprotection in a zebrafish model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int, 2018, 115: 61-8.
- [15] Koehler D, Shah Z A, Williams F E. The GSK3beta inhibitor, TDZD-8, rescues cognition in a zebrafish model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int, 2019, 122: 31-7.

The role of GSK-3 β in Zebrafish cerebral hypoxia/reoxygenation injury and its effect on microtubule-associated protein 2

Yang Mengsi^{1,2}, Zhang Li^{1,2}, Hu Xianwen^{1,2}

(¹Key Lab of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes, Hefei 230601; ²Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and its correlation with microtubule-associated protein 2 (MAP2) during cerebral hypoxia/reoxygenation (H/R) in zebrafish. **Methods** The cerebral hypoxia/reoxygenation model of zebrafish was established. Healthy adult zebrafishes of the same size

磷酸二酯酶 4D 纯合子敲除小鼠的构建

朱振铎, 苏甜甜, 程慧娟, 江春如, 方茹红, 管秋韵, 何凤, 葛明丽, 魏伟, 汪庆童

摘要 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术构建磷酸二酯酶 4D (PDE4D) 纯合子敲除小鼠, 为深入探究 PDE4D 基因的功能及作用机制提供基础。方法 针对 PDE4D 基因外显子 4、5 号构建载体显微注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵中, 经过母本繁育和子代交配获得 PDE4D^{-/-}小鼠, 通过 PCR 产物测序及基因型鉴定技术测定小鼠基因型。使用超声成像系统和 HE 染色检测小鼠主要器官形态和功能的变化, 通过 Western blot 实验验证 PDE4D 蛋白在小鼠体内的表达情况。结果 PDE4D^{-/-}小鼠基因型稳定遗传, 小鼠体型较小, 体内主要器官无明显形态及组织学改变。PDE4D 杂合或纯合敲除小鼠

主要组织中 PDE4D 表达减少或基本不表达, 敲除效果较好。**结论** 本课题利用 CRISPR/Cas9 技术成功建立了 PDE4D^{-/-}小鼠, 未发现明显生理异常, 可用于以 PDE4D 为靶点的疾病发病机制及药物研究。

关键词 磷酸二酯酶 4D; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 基因型鉴定

中图分类号 R 394.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0208-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.006

2022-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81973314, 81973332); 安徽省杰出青年科学基金(编号: 1808085J28); 安徽高校协同创新项目(编号: GXXT-2020-066); 2021 年安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD2021047)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽医科大学风湿关节炎研究中心, 合肥 230032

作者简介: 朱振铎, 男, 硕士研究生;

汪庆童, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hfwqt727@163.com;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是 21 个基因编码的 11 种不同亚型酶(PDE1-PDE11)的超级大家族^[1], PDE4D 亚型在心脏、肝脏、肾脏等组织中表达较高。PDE4D 的主要功能是通过与环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)结合并将其降解为 5'-腺嘌呤核苷酸(adenosine 5'-monophosphate 5'AMP)^[2]。PDE4D 表达升高会增加房颤的易感性和心源性中风的风险, 也在非酒精性脂肪肝、阿尔茨海默病等疾病的发生发展中发挥重要作用^[3], PDE4D 可能为这些疾病的潜在治疗靶点。构建 PDE4D 基因敲除小鼠对充分阐明 PDE4D 的病理作用机制及药物靶点的明确具有重要意义。该研究与江苏集萃药康生物科技有限公司合作, 利用

were divided into control group (Control), hypoxia/reoxygenation group (H/R) and hypoxia/reoxygenation + GSK-3 β inhibitor group (H/R + TDZD-8) for experiment. The brain tissues of zebrafish in each group were selected to determine the mRNA expressions of hypoxia inducible factor 1 α and 1 β (HIF-1 α and HIF-1 β) at different reoxygenation time points by qRT-PCR, and the protein expression levels of HIF-1 α , GSK-3 β , p-GSK-3 β (Ser 9) and MAP2 were detected by Western blot, TTC staining and TUNEL staining were used to detect cerebral infarction area and cell apoptosis, and immunofluorescence was used to detect the distribution and expression of MAP2 in brain. **Results** Compared with Control group, the mRNA levels of Hif-1 α and Hif-1 β ($P < 0.01$) and protein expression of Hif-1 α ($P < 0.01$) increased in H/R group, the area of cerebral infarction ($P < 0.01$) and apoptotic cells ($P < 0.01$) increased, p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β ratio, MAP2 protein expression ($P < 0.05$) and immunofluorescence expression of MAP2 ($P < 0.01$) reduced; Furthermore, TDZD-8 pretreatment could relieve the brain injury of H/R zebrafish by decreasing the infarct size and cell apoptosis, improving the ratio of p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β , and increasing the expression of MAP2. **Conclusion** Hypoxia/reoxygenation can cause brain neuron damage in zebrafish, and its mechanism may be related to inhibition of GSK-3 β phosphorylation and MAP2 expression. GSK-3 β specific inhibitor TDZD-8 can reverse the damage of brain neurons caused by hypoxia/reoxygenation by promoting the expression of P-GSK-3 β (Ser 9) and reducing MAP2 degradation.

Key words zebrafish; cerebral hypoxia/reoxygenation injury; GSK-3 β ; MAP2; TDZD-8