

β -1,3-半乳糖基转移酶2对脑缺血损伤模型小鼠脑损伤的作用及其机制

马丰源¹,刁赫²,古岳²,卢连生³,范莉婕²,王鹏⁴

(锦州医科大学 1. 口腔医学院口腔修复科;2. 第一附属医院放射科;3. 第一附属医院传染科;4. 基础医学院神经生物学教研室,辽宁省神经退行性疾病重点实验室,辽宁 锦州 121000)

摘要 **目的** 探讨 β -1,3-半乳糖基转移酶2 (B3galt2) 对脑缺血损伤模型小鼠脑损伤的作用及其机制。**方法** 将成年雄性C57BL/6J小鼠随机分为假手术组 (Sham组)、大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型组、MCAO 模型+慢病毒载体对照组 (LV-GFP组)、MCAO模型+慢病毒载体过表达B3galt2组 (LV-B3galt2组),每组6只。各组小鼠于脑缺血24 h后进行神经功能缺损评分和旋转棒实验,采用2,3,5-三氨基苯甲四氮唑染色测定脑梗死体积,采用尼氏染色法观察各组小鼠脑缺血半影区神经元数量,检测各组小鼠脑组织中氧化应激相关因子水平。**结果** 与Sham组比较,MCAO模型组小鼠脑梗死体积增大,神经功能缺损明显 ($P < 0.05$),脑缺血区神经元数量明显减少,活性氧 (ROS) 和丙二醛 (MDA) 水平明显升高 (均 $P < 0.05$),超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平明显降低 (均 $P < 0.05$);与MCAO模型组比较,LV-B3galt2组小鼠脑梗死体积减小,神经功能明显改善 ($P < 0.05$),脑缺血区神经元数量明显增加,ROS和MDA水平明显降低 (均 $P < 0.05$),SOD和GSH水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。**结论** B3galt2过表达可以减轻脑缺血损伤模型小鼠脑损伤,其作用机制可能是通过抑制氧化应激反应实现的。

关键词 β -1,3-半乳糖基转移酶2; 脑缺血损伤模型小鼠; 脑损伤

中图分类号 R743.3 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2024)08-0736-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240722.1244.006>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.08.011

Effect and mechanism of β -1,3-galactosyltransferase 2 on brain injury in cerebral ischemic injury mice model

MA Fengyuan¹, DIAO He², GU Yue², LU Liansheng³, FAN Lijie², WANG Peng⁴

(1. Department of Prosthodontics, School of Stomatology of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 3. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 4. Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Liaoning Provincial Key Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Jinzhou 121000, China)

Abstract **Objective** To explore the role of β -1,3-galactosyltransferase 2 (B3galt2) in mice with cerebral ischemic injury.

Methods Adult male C57BL/6J mice were randomly divided into the sham, suture-occluded middle cerebral artery occlusion (MCAO) model, MCAO model + lentiviral vector control (LV-GFP), and MCAO model + lentiviral vector overexpression B3galt2 (LV-B3galt2) groups, with six mice in each group. Neurological deficit scoring and rotating rod experiments were performed 24 h after ischemia in each group, and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to determine the infarction volume. The number of neurons in the ischemic cerebral cortex was determined in each group using Nissl staining. The levels of oxidative stress-related factors in the brain tissues were detected using the relevant kits. **Results** Compared with the sham group, the MCAO model group showed increased infarct volume and neurological deficits ($P < 0.05$), significantly decreased number of neurons in the ischemic cerebral cortex and levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH) (all $P < 0.05$), and significantly increased levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) (all $P < 0.05$). Compared with the MCAO model group, the LV-B3galt2 group had reduced volume of cerebral infarction, significantly improved neurological deficits (all $P < 0.05$), significantly increased number of neurons in the ischemic cerebral cortex of mice, significantly decreased levels of ROS and MDA ($P < 0.05$), and significantly elevated levels of SOD and GSH (all $P < 0.05$). **Conclusion** B3galt2 overexpression can reduce brain injury in an ischemic damage mouse model, and its mechanism may be through the inhibition of oxidative stress reactions.

Keywords β -1,3-galactosyltransferase 2; cerebral ischemic injury mice model; brain injury

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202210160016); 辽宁省自然科学基金 (2022-MS-391)

作者简介: 马丰源 (1999-), 男, 本科在读。

通信作者: 王鹏, E-mail: wangpeng@jzmu.edu.cn

收稿日期: 2023-07-30

网络出版时间: 2024-07-23 10:17:08

已有研究^[1]表明,我国40岁以上人群脑卒中患病率高达2.58%。目前,缺血性脑卒中为脑卒中的多发类型,对患者的危害较大,探究缺血性脑卒中的治疗方法较为重要^[2-3]。缺血性脑卒中患者由于大脑供血动脉发生狭窄或闭塞,脑组织缺血缺氧,从而导致脑组织死亡和局灶性神经元损伤^[4]。当脑缺血发生时,缺血区的神经细胞由于血流供应急速缺乏而迅速发生坏死性死亡;缺血区外神经细胞死亡常呈现凋亡特征,即缺血半暗带区。防止缺血半暗带区神经细胞凋亡对缺血性脑卒中有良好的治疗作用^[5-6]。缺血性脑卒中发病机制复杂,已有研究^[7]证实氧化应激在缺血性脑卒中损伤中发挥重要作用。脑缺血后细胞缺氧会产生氧化应激反应^[8]。同时,已有研究^[9]表明,减轻氧化应激反应对神经元具有保护作用。

糖基化是蛋白质的翻译后修饰之一,糖基转移酶在糖基化过程发挥关键作用。已有研究^[10-12]证明,糖基转移酶能够促进神经元及神经胶质细胞的正常发育。 β -1,3-半乳糖基转移酶2(β -1,3-galactosyl-transferase 2, B3galt2)是 β -1,3-半乳糖基转移酶家族成员之一,是催化多种糖复合体形成的酶。糖复合体在神经系统中起着至关重要的作用^[13]。研究^[14]表明,B3galt2表达上调可以保护脑缺血再灌注后血脑屏障的完整性,在神经保护中起关键作用;但对于脑局部持续缺血后脑损伤所致氧化应激的影响尚不明确。本研究探讨B3galt2过表达对脑缺血损伤模型小鼠脑损伤的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要仪器设备

24只成年雄性C57BL/6J小鼠(12~14周龄,20~25g)购自辽宁长生生物技术股份有限公司并于锦州医科大学SPF动物房饲养。小鼠于12 h光照/黑暗循环的温度控制室中,自由进食和饮水。

主要仪器设备包括小鼠缺血线栓(广州佳灵生物技术有限公司,L1800),小动物台式麻醉机(美国Harvard公司),冰冻切片机(德国Leica公司,CM350S),低温高速离心机(德国Eppendorf AG公司,22331Hamburg),超声波破碎仪(美国Qsonica公司,Sonicator Q700),震动切片机(德国Leica公司,VT1200S),超纯水机(美国Millipore公司,Milli-Q In-

tegral 3),双臂小动物脑立体定位仪(美国Stoelting公司,51903),光学显微镜(德国Leica公司DMI 4000 B),SOD试剂盒、GSH试剂盒、MDA试剂盒、ROS试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司),细胞核制备试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.2 分组

将小鼠随机分为假手术(Sham)组、大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型组、MCAO模型+慢病毒载体对照(LV-GFP)组、MCAO模型+慢病毒载体过表达B3galt2(LV-B3galt2)组,每组6只。

1.3 模型建立

1.3.1 慢病毒载体过表达小鼠制备:慢病毒载体过表达B3galt2购于上海吉凯基因医学科技股份有限公司。于MCAO造模前7 d, LV-GFP组和LV-B3galt2组小鼠戊巴比妥钠麻醉后固定在立体定位仪中,分别将慢病毒载体对照和慢病毒载体过表达B3galt2(0.35 μ L/min)注射到小鼠的右侧脑室(前囟后0.6 mm,前囟外侧1.5 mm,脑表面腹侧1.7 mm)。注射后将针保持在适当位置5 min防止泄漏,然后5 min内缓慢抽出。

1.3.2 MCAO模型建立:MACO模型组、LV-GFP组和LV-B3galt2组按照文献^[15]方法诱导脑缺血性损伤建立MCAO模型,将小鼠2%异氟烷诱导麻醉后分离并结扎右侧颈总动脉和同侧颈外动脉,颈内动脉暂时用止血夹夹闭,在颈总动脉剪一小口,将缺血线栓插入颈总动脉,并从颈动脉分叉处远端推进,轻微感觉有阻力时即停止。缝合小鼠颈部皮肤,局部持续缺血24 h。Sham组小鼠不插缺血线栓,其他手术步骤相同。

1.4 Western blotting检测B3galt2蛋白表达

取LV-GFP组和LV-B3galt2组小鼠脑组织,剪碎后用超声波破碎仪破碎组织,裂解液裂解并匀浆,离心后收集上清。BAC法测定蛋白浓度。蛋白上样后10% SDS-PAGE电泳分离、转膜、牛血清白蛋白封闭。孵育一抗,TBST浸泡条带摇床上洗3次,孵育二抗,TBST摇床上洗3次,凝胶成像系统成像并使用Image J软件分析。以目的蛋白条带与标准蛋白条带灰度比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.5 神经功能评价

1.5.1 行为学评分:使用神经功能障碍状态量表

(neurological disability status scale, NDSS)^[16] 评估局部持续缺血24 h后小鼠的神经功能, NDSS从0分(无神经功能障碍)~10分(死亡), 评分越高, 神经功能损伤越严重。

1.5.2 旋转棒实验: 在MCAO造模前3 d训练各组小鼠保持在旋转棒杆(50转/min)上1 min左右。在缺血24 h后将各组小鼠置于旋转杆(50转/min)上, 记录小鼠第1次掉落旋转棒的时间, 即为跌倒潜伏期。

1.6 梗死体积测量

各组小鼠进行行为学评分和旋转棒实验后麻醉, 断头取完整脑组织于-20 °C冰箱冷冻12 min后切片(厚1 mm)。将切片在1%2,3,5-三氨基苯甲四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中37 °C避光孵育5 min。采用ImageJ软件对脑片的梗死部位进行测量并计算脑梗死体积。脑梗死体积=(对侧脑半球体积-同侧脑半球非梗死体积)/对侧脑半球体积×100%。

1.7 尼氏染色

将小鼠麻醉固定于手术板上, 开胸暴露心脏, 在心尖部位快速注射预冷的生理盐水以排出血液。血液排净后, 快速注射4%多聚甲醛(4 °C)至小鼠右心耳流出液体无色时停止灌注, 断头取完整脑组织。4%多聚甲醛固定脑组织4~6 h, 然后采用

20%~30%蔗糖浸泡, 自然沉淀后制作冷冻切片。脑切片于4%多聚甲醛固定30 min, 蒸馏水洗涤3次后, 将切片用溶解在乙酸盐缓冲液中的0.04%甲酚紫(Sigma-Aldrich)染色1 h。染色结束后依次蒸馏水清洗3次、95%乙醇脱水3次、二甲苯透明3次, 封片。光学显微镜下计算染色细胞。每组小鼠计数6张切片并计算平均值。

1.8 氧化应激相关指标检测

取各组小鼠脑组织, 检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的水平, 操作按照试剂盒说明书进行。

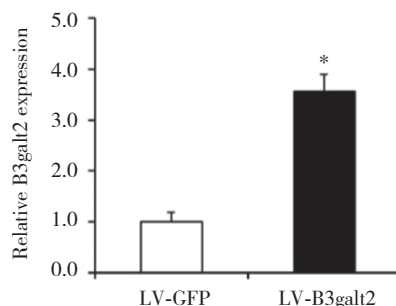
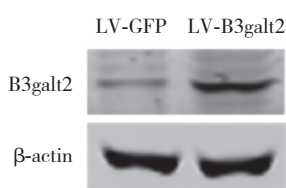
1.9 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2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 B3galt2蛋白表达

Western blotting结果显示, 与LV-GFP组比较, LV-B3galt2组B3galt2蛋白表达增高(*P* < 0.05), 见图1。说明慢病毒载体过表达B3galt2小鼠制备成功。



**P* < 0.05 vs. LV-GFP group.

图1 LV-GFP组和LV-B3galt2组小鼠B3galt2表达比较

Fig.1 Comparison of B3galt2 protein between groups LV-GFP and LV-B3galt2

2.2 各组小鼠行为学评分和旋转棒实验结果比较

与Sham组比较, MCAO组与LV-GFP组小鼠行为学评分明显增高(*P* < 0.05)。与MCAO模型组比较, LV-B3galt2组小鼠行为学评分明显降低(*P* < 0.05)。旋转棒实验结果显示, 与Sham组比较, MCAO模型组与LV-GFP组小鼠跌落潜伏时间明显减少(*P* < 0.05)。与MCAO模型组比较, LV-B3galt2组小鼠跌落潜伏时

间明显增加(*P* < 0.05)。见表1。

2.3 各组小鼠脑梗死体积比较

TTC染色结果显示, Sham组小鼠无脑梗死。与Sham组比较, MCAO模型组与LV-GFP组小鼠脑梗死体积明显增加(*P* < 0.05)。与MACO模型组比较, LV-B3galt2组小鼠脑梗死体积明显减少(*P* < 0.05)。见表1、图2。

表1 各组小鼠神经功能评分和跌落潜伏时间比较

Tab.1 Comparison of neurological score and latency to fall in each group

Group	n	Neurological score	Latency to fall (s)	Infarct volume (%)
Sham	6	0.0 ± 0.0	68 ± 12	0.0 ± 0.0
MCAO model	6	7.5 ± 1.2 ¹⁾	31 ± 8 ¹⁾	55.6 ± 11.9 ¹⁾
LV-GFP	6	7.3 ± 1.1 ¹⁾	30 ± 5 ¹⁾	53.8 ± 12.4 ¹⁾
LV-B3galt2	6	5.6 ± 0.9 ²⁾	49 ± 9 ²⁾	28.5 ± 7.1 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. sham group; 2) $P < 0.05$ vs. MCAO model group.

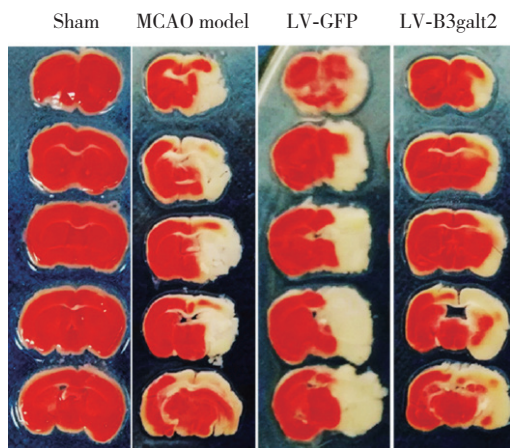


图2 各组小鼠脑TTC染色结果

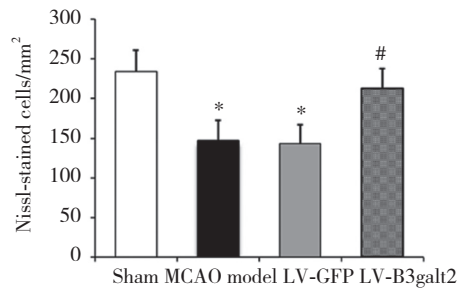
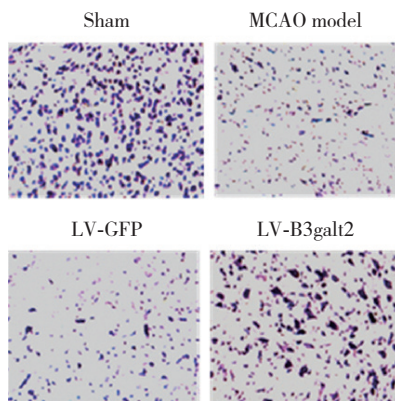
Fig.2 TTC staining results of mice brain in each group

2.4 各组小鼠脑组织神经元数量比较

尼氏染色结果显示, Sham组小鼠神经元结构轮廓清楚, 数量很多。与Sham组比较, MCAO模型组与LV-GFP组小鼠神经元轮廓模糊不清, 数量明显减少 ($P < 0.05$)。与MCAO组比较, LV-B3galt2组小鼠神经元结构轮廓较清楚, 数量明显增多 ($P < 0.05$)。见图3。

2.5 各组小鼠脑组织中氧化应激指标水平比较

与Sham组比较, MCAO模型组与LV-GFP组小鼠ROS、MDA水平明显升高 ($P < 0.05$), SOD、GSH水平明显降低 ($P < 0.05$)。与MCAO模型组比较, LV-B3galt2组小鼠ROS、MDA水平明显降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表2。



A, Nissl-staining image $\times 400$; B, number of nerve cells. * $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. MCAO model group.

图3 尼氏染色显示各组神经元数量

Fig.3 The number of nerve cells by Nissl staining

表2 各组小鼠脑组织中氧化应激因子水平比较

Tab.2 Comparison of oxidative stress factor levels in brain tissue of mice in each group

Group	Relative ROS level	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	GSH (nmol/mg)
Sham	1.00 ± 0.11	9.89 ± 1.41	54.6 ± 7.41	29.4 ± 4.46
MCAO model	2.32 ± 0.42 ¹⁾	18.64 ± 2.42 ¹⁾	37.3 ± 6.47 ¹⁾	15.6 ± 4.21 ¹⁾
LV-GFP	2.21 ± 0.39 ¹⁾	19.87 ± 2.36 ¹⁾	36.6 ± 6.16 ¹⁾	14.2 ± 3.98 ¹⁾
LV-B3galt2	1.51 ± 0.16 ²⁾	14.55 ± 2.03 ²⁾	52.3 ± 4.87 ²⁾	24.7 ± 4.21 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. sham group; 2) $P < 0.05$ vs. MCAO model group.

3 讨论

B3galt2是糖基转移酶家族的成员之一,对蛋白质的糖基化修饰调节具有重要作用^[13]。研究表明,B3galt2上调可减少血脑屏障的通透性^[14]、抑制NLRP3炎症小体^[17],发挥神经保护作用。本研究结果表明,B3galt2表达上调可降低脑缺血后脑损伤小鼠神经功能评分,改善小鼠脑组织病理损伤,保护神经元。

氧化应激是指机体受到各种刺激时,体内氧化与抗氧化反应失衡,ROS在体内蓄积导致生物膜脂质过氧化、核酸、蛋白质破坏,引起细胞继发性损伤^[18]。以往研究表明,氧化应激与神经元损伤关系密切^[9]。氧化应激过程中产生大量ROS及炎症细胞因子,从而导致神经元坏死凋亡。MDA是一种脂质过氧化产物,机体发生氧化反应时产生大量MDA,而MDA水平反映了机体氧化程度和细胞损伤程度。SOD广泛分布在各种生物体内,在高热和酸碱条件中也十分稳定,是体内主要的自由基清除剂之一。GSH具有抗氧化的同时还具有解毒作用,在加速自由基排泄同时,也可以抑制自由基对细胞的损害,维持细胞代谢平衡。本研究检测了各组小鼠脑组织中ROS、MDA、GSH和SOD水平,结果显示,与MCAO模型组比较,LV-B3galt2组ROS和MDA水平降低,而SOD和GSH水平提高(均 $P < 0.05$),说明B3galt2保护神经功能的作用可能是通过减轻氧化应激反应来实现的。

综上所述,LV-B3galt2过表达可以减轻脑缺血损伤后小鼠神经细胞破坏,改善神经功能;其作用机制可能与其抗氧化应激能力有关。本研究初步证明了B3galt2对脑缺血损伤模型小鼠脑损伤具有保护作用,下一步将在基因或分子水平继续探讨B3galt2对脑缺血损伤模型小鼠脑损伤的作用机制。

参考文献:

- [1] 王陇德,彭斌,张鸿祺,等.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J]. 中国脑血管病杂志,2022,19(2):136-144. DOI:10.3969/j.issn.1672-5921.2022.02.011.
- [2] 苏明珠,马跃文. 放散式冲击波通过Notch1/Hes1通路调节脑缺血后海马组织中神经干细胞的增殖与分化[J]. 中国组织工程研究,2021,25(19):3009-3015. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.3538.
- [3] 黄广海,何云凌,邸瑶,等.BNIP3表达变化与脑缺血损伤关系的

- 研究[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2016,23(4):256-260. DOI:10.3969/j.issn.1006-2963.2016.04.007.
- [4] ZHAO YF,ZHANG XJ,CHEN XY,et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke:from mechanisms to treatment (Review)[J]. Int J Mol Med,2022,49(2):15. DOI:10.3892/ijmm.2021.5070.
- [5] 张予阳,史琳琳,郝冬海,等. Bcl-2在缺血性神经细胞损伤中的作用及药物的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(1):21-24.
- [6] 汪青青. 川蛭通络胶囊减轻光化学卒中小鼠脑损伤作用机制的研究[D]. 青岛:青岛大学,2023.
- [7] VONGSFAK J,PRATCHAYASAKUL W,APAIJAI N,et al. The alterations in mitochondrial dynamics following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Antioxidants,2021,10(9):1384. DOI:10.3390/antiox10091384.
- [8] 张慧丹,孟璐,龙涛,等. 氧化应激诱导高血压的分子遗传学机制研究进展[J]. 中南药学,2023,21(6):1599-1604. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.030.
- [9] 刘娟,钟子安,杨柳,等. 迷迭香酸调控SIRT1/NF- κ B通路对缺氧复氧神经元炎症及氧化应激损伤的影响[J]. 中国药师,2022,25(2):227-231. DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.02.005.
- [10] ANGATA K,LEE W,MITOMA J,et al. Cellular and molecular analysis of neural development of glycosyltransferase gene knockout mice [J]. Methods Enzymol,2006,417:25-37. DOI:10.1016/S0076-6879(06)17003-2.
- [11] KROES RA,HE H,EMMETT MR,et al. Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107(28):12646-12651. DOI:10.1073/pnas.0909862107.
- [12] YAO DG,MCGONIGAL R,BARRIE JA,et al. Neuronal expression of GalNAc transferase is sufficient to prevent the age-related neurodegenerative phenotype of complex ganglioside-deficient mice [J]. J Neurosci,2014,34(3):880-891. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3996-13.2014.
- [13] JIA MJ,YANG X,YANG TH,et al. β -1,3-galactosyltransferase 2 deficiency exacerbates brain injury after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. Brain Res Bull,2021,169:104-111. DOI:10.1016/j.brainresbull.2021.01.010.
- [14] YANG X,LIANG J,JIA MJ,et al. β -1,3-galactosyltransferase 2 ameliorates focal ischemic cerebral injury by maintaining blood-brain barrier integrity [J]. Neurochem Int,2021,144:104976. DOI:10.1016/j.neuint.2021.104976.
- [15] HATA R,MIES G,WIESSNER C,et al. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice:hemodynamic,biochemical, and magnetic resonance imaging [J]. J Cereb Blood Flow Metab,1998,18(4):367-375. DOI:10.1097/00004647-199804000-00004.
- [16] RODRIGUEZ R,SANTIAGO-MEJIA J,GOMEZ C,et al. A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice [J]. J Neurosci Methods,2005,147(1):22-28. DOI:10.1016/j.jneumeth.2005.02.013.
- [17] GUO X,ZHANG Y,LIU C,et al. Intranasal administration of β -1,3-galactosyltransferase 2 confers neuroprotection against ischemic stroke by likely inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammatory activation [J]. FASEB J,2022,36(10):e22542. DOI:10.1096/fj.202200456RR.
- [18] FLOHÉ L. Looking back at the early stages of redox biology [J]. Antioxidants,2020,9(12):1254. DOI:10.3390/antiox9121254.

(编辑 武玉欣)