

脑卒中 GSK-3 β 调控内质网-线粒体偶联参与炎症性脑损伤的机制研究

雷建华¹, 杜贺芳², 刘昱肖²

摘要: **目的** 探讨糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)通过内质网-线粒体偶联参与脑卒中炎症性脑损伤的机制,为精准治疗提供理论参考和潜在靶点。**方法** 构建大鼠大脑中动脉栓塞模型,分为假手术组、模型组和 GSK-3 β 抑制剂(TDZD-8)干预组,采用神经功能评分评估脑损伤程度,TTC 染色评估脑梗死面积,电镜观察线粒体超微结构,检测线粒体钙离子浓度,ELISA 实验检测炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)水平,并通过 Western blotting 分析相关蛋白表达水平。**结果** 与假手术组相比,模型组神经功能显著受损,脑梗死面积增加,炎症因子表达水平及 GSK-3 β 表达显著升高,同时内质网-线粒体偶联增强,线粒体钙超载;TDZD-8 可显著改善上述指标,降低炎症因子水平及脑梗死面积。**结论** GSK-3 β 异常激活通过调节内质网-线粒体偶联损伤脑组织,促进线粒体钙超载和炎症反应;抑制 GSK-3 β 活性可有效改善脑卒中炎症性脑损伤,为开发精准治疗策略提供了新的途径和分子靶点。

关键词: 脑卒中; 糖原合成激酶-3 β ; 内质网-线粒体偶联; 脑损伤

中图分类号: R743

文献标识码: A

Mechanism of glycogen synthase kinase-3 β participating in stroke-induced inflammatory brain injury by regulating endoplasmic reticulum-mitochondria coupling LEI Jianhua, DU Hefang, LIU Yuxiao. (Department of Neurology, Handan Central Hospital, Handan 056000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) participating in stroke-induced inflammatory brain injury through endoplasmic reticulum-mitochondria coupling, and to provide a theoretical reference and potential targets for precise treatment. **Methods** A rat model of middle cerebral artery occlusion was established, and the rats were divided into sham-operation group, model group, and GSK-3 β inhibitor(TDZD-8) intervention group. Neurological function score was used to evaluate the degree of brain injury; TTC staining was used to evaluate cerebral infarct area; electron microscopy was used to observe mitochondrial ultrastructure; mitochondrial calcium concentration was measured; ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β)], and Western blot was used to measure the expression levels of related proteins. **Results** Compared with the sham-operation group, the model group had significant neurological function impairment, an increase in cerebral infarct area, and significant increases in the expression levels of inflammatory factors and GSK-3 β , with enhanced endoplasmic reticulum-mitochondria coupling and mitochondrial calcium overload. TDZD-8 significantly improved the above indicators and reduced the levels of inflammatory factors and cerebral infarct area. **Conclusion** Abnormal activation of GSK-3 β damages brain tissue by regulating endoplasmic reticulum-mitochondria coupling and promotes mitochondrial calcium overload and inflammatory response. Inhibiting GSK-3 β activity can effectively improve stroke-induced inflammatory brain injury, which provides a new pathway and a molecular target for developing precise treatment strategies.

Key words: Stroke; Glycogen synthase kinase-3 β ; Endoplasmic reticulum-mitochondria coupling; Brain injury

脑卒中分为缺血性卒中和出血性卒中两类,是全球范围内导致死亡和致残的主要疾病之一^[1,2]。缺血性脑卒中常因动脉粥样硬化或心源性栓塞引发血流中断;出血性脑卒中则由血管破裂导致^[3,4]。其临床特点包括脑缺血、炎症及神经元损伤等^[5,6]。高血压、糖尿病和吸烟等为主要危险因素^[7,8]。全球脑卒中新发病例超 1 300 万,低收入国家负担更重^[9,10]。有效的预防与早期治疗对改善患者预后至关重要。尽管近年来在脑卒中病理机制和治疗研究方面取得了显著进展,但脑卒中后神经损伤的复杂性仍然限制了有效治疗策略的开发。因此,深

入探索脑卒中的分子机制对于改善患者预后具有重要意义。

糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛参与细胞代谢、增殖、分化和凋亡等过程^[11,12]。近年来的研究表明,GSK-3 β 在脑卒中后的

收稿日期:2025-02-10;修订日期:2025-05-30

基金项目:2024 河北省医学科学研究课题计划项目(20241660)

作者单位:(1. 邯郸市中心医院神经内科,河北 邯郸 056000;2. 华北医疗健康集团邢台总医院骨六科,河北 邢台 054000)

通信作者:雷建华;E-mail:d101761@163.com

病理反应中起关键作用,其异常活化与氧化应激、炎症反应和细胞凋亡密切相关^[13]。此外,GSK-3 β 能够调控内质网-线粒体偶联(endoplasmic reticulum-mitochondria coupling),这一结构在维持细胞内钙离子稳态、能量代谢和细胞凋亡信号中发挥核心作用^[14,15]。然而,关于GSK-3 β 通过调控内质网-线粒体偶联参与脑卒中后炎症性脑损伤的具体机制尚不明确。

基于上述背景,本研究旨在探讨GSK-3 β 通过调控内质网-线粒体偶联在脑卒中炎症损伤中的作用及其潜在机制。通过揭示这一调控轴的具体作用,为脑卒中的精准治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠30只,22~24周龄,体重(220 $\pm$ 20)g,购自北京维通利华公司。实验前适应性喂养1周,温度20~22℃,相对湿度45%~55%,昼夜间隔12h。

1.2 仪器

分析天平(大龙兴创实验仪器股份公司);荧光酶标仪(美国Thermo);电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司);化学发光成像系统(中国Tanon公司)。

1.3 试剂

GSK-3 β 抑制剂TDZD-8(美国MCE公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液、钙离子检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 大脑缺血再灌注大鼠模型建立 实验中将大鼠随机分为假手术组、MCAO模型组和TDAD-8组,各15只。实验前进行1周适应性饲养,术前24h禁食但不禁水。模型组和TDAD-8组将大鼠麻醉后仰卧固定于操作台,剃除颈部毛发后用碘伏消毒,并使用眼科剪剪开皮肤,暴露颈部总动脉、颈部内动脉和颈部外动脉。结扎颈部总动脉和颈部外动脉,在颈部总动脉与分叉口之间打活结,并用血管夹夹闭颈部内动脉。在分叉处插入线栓,通过颈部内动脉进入大脑中动脉,阻塞2h后拔出线栓,逐层缝合,形成缺血再灌注模型。术后腹腔注射青霉素预防感染。假手术组不插入线栓,其余步骤与模型组一致。

1.4.2 神经功能缺陷评分 待大鼠苏醒后24h,评估其神经功能缺陷情况。评分如下:0分表示无神经损伤,自由活动正常;1分表示提尾时对侧前肢出现内收屈曲;2分表示为向对侧转圈追尾;3分表示为向对侧倾斜,站立不稳定;4分表示为活动能力完全丧失或意识昏迷。

1.4.3 TTC染色 完成神经功能缺陷评分后,每组随机选取5只,迅速断颈处死,取出脑组织,用预冷的PBS清洗血液,滤纸吸干后用保鲜膜包裹,置于-20℃冰箱中速冻约20min,以便后续切片。取出冷冻脑组织均匀切成5片,放入2%TTC试剂中,37℃避光水浴10~15min。梗死区域显示为灰白色,正常脑组织染成红色。使用Image J软件测量脑梗死面积,计算公式为:梗死面积(%)=灰白色面积/总梗死面积 $\times$ 100%。

1.4.4 电镜检测超微结构 取大鼠新鲜心肌组织并用电镜固定液和1%锇酸固定。PBS漂洗3次后,使用不同浓度乙醇进行脱水,包埋后用超薄切片机制备60~80nm的切片,于2%醋酸铀饱和酒精溶液染色8min,70%乙醇和清水清洗后,0.5%枸橼酸铅溶液染色,超纯水清洗后室温干燥过夜,在透射电子显微镜下观察线粒体的形态学变化。

1.4.5 线粒体Ca²⁺含量测定 取适量脑组织,将细胞中线粒体分离出来,按照钙离子检测试剂盒说明书检测细胞内线粒体Ca²⁺含量。

1.4.6 ELISA 收集大鼠脑组织上清液,通过ELISA试剂盒检测TNF- α 和IL-1 β 的表达水平,实验步骤参照说明书。

1.4.7 Western blotting 使用RIPA裂解液处理大鼠脑组织,每5min涡旋1次,共30min。在4℃、12000rpm条件下离心10min后,收集上清后加入上样缓冲液进行蛋白样品制备,然后通过SDS-PAGE分离并转移至PVDF膜。采用5%脱脂牛奶封闭2h,4℃进行一抗过夜。然后用TBST洗涤5次,每次5min,再用HRP标记的二抗染色2h,并用TBST洗涤5次,每次5min。最终使用ECL显色液曝光,灰度值通过Image J软件进行分析。

1.4.8 统计学分析 数据采用GraphPad Prism 9.0统计软件处理,各项指标以($\bar{x}\pm s$)表示,数据来源于至少3次独立实验,多组间比较采用方差分析ANOVA检验进行,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经功能缺陷评分

假手术组大鼠神经功能正常;与假手术组相比,模型组大鼠神经功能发生缺陷,神经功能评分上升至(3.20 $\pm$ 0.68);与模型组相比,TDZD-8组大鼠神经功能缺陷明显降低,神经功能评分降至(1.73 $\pm$ 0.70),差异有统计学意义。

2.2 大鼠脑梗死面积

假手术组大鼠未出现脑梗死;与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死面积增大至(35.40% $\pm$ 3.48%);与模型组相比,TDZD-8组大鼠脑梗死面积至(22.14% $\pm$ 8.38%),差异有统计学意义,结果(见图1)。

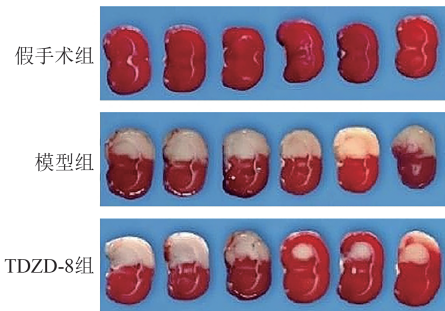
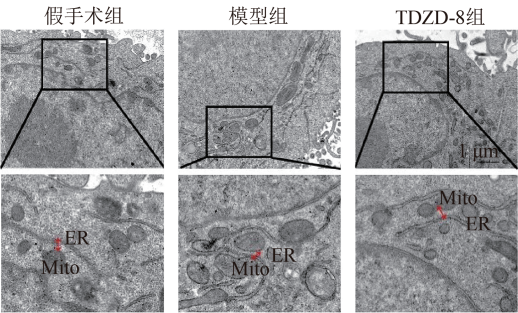


图1 冠状脑切片 TTC 染色的代表性图像

2.3 大鼠脑组织中内质网-线粒体接触情况

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中内质网和线粒体之间的距离由(54.40±9.87) nm 降低至(25.12±5.16)nm,而TDZD-8给药干预后,大鼠脑组织中内质网和线粒体之间的距离增加至(45.44±5.34)nm,且均具有显著性差异(见图2)。



注:放大倍数为 10 000 倍。

图2 透射电子显微镜观察大鼠脑组织中内质网-线粒体之间接触的情况

2.4 大鼠脑细胞线粒体中Ca²⁺浓度的变化

与假手术组相比,模型组大鼠脑细胞线粒体中Ca²⁺浓度由(6.83±2.13)mg/dl 增长至(13.44±1.85)mg/dl,而TDZD-8给药干预后,大鼠脑细胞线粒体中Ca²⁺浓度恢复至(8.49±1.42)mg/dl,差异具有统计学意义。

2.5 大鼠脑组织中炎症因子TNF-α和IL-1β的表达水平

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中炎症因子TNF-α和IL-1β的表达水平显著增加,而TDZD-8给药干预后,与模型组相比,大鼠脑组织中炎症因子TNF-α和IL-1β的表达水平显著降低,结果(见表1)。

2.6 Western blotting 检测大鼠脑组织中GSK-3β、TNF-α和IL-1β蛋白表达情况

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中GSK-3β、TNF-α和IL-1β蛋白的表达水平显著增加,而TDZD-8给药干预后,与模型组相比,大鼠脑组织中GSK-3β、TNF-α和IL-1β蛋白的表达水平显著降低。结果(见图3、表2)。

表1 大鼠脑组织炎症因子TNF-α和IL-1β的表达水平 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	假手术组	模型组	TDZD-8组
TNF-α(ng/L)	95.98±2.49	141.8±12.02 ^{###}	120.8±3.03 [*]
IL-1β(ng/L)	25.20±2.29	46.86±4.76 ^{###}	35.75±2.37 [*]

注:与假手术组比较^{###}*P*<0.001;与模型组比较^{*}*P*<0.05。

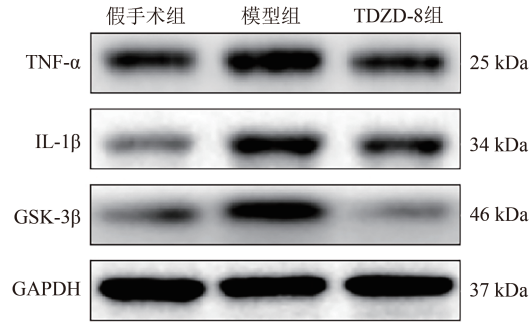


图3 大鼠脑组织中GSK-3β、TNF-α和IL-1β蛋白表达情况

表2 大鼠脑组织中GSK-3β、TNF-α和IL-1β蛋白表达情况 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	假手术组	模型组	TDZD-8组
GSK-3β	1.00±0.04	2.19±0.14 ^{####}	0.72±0.04 ^{****}
IL-1β	1.00±0.02	2.38±0.16 ^{####}	1.75±0.19 ^{**}
TNF-α	1.00±0.02	1.54±0.01 ^{####}	1.10±0.02 ^{****}

注:与假手术组比较^{####}*P*<0.001;与模型组比较^{**}*P*<0.01, ^{****}*P*<0.0001。

3 讨论

本研究通过建立MCAO大鼠模型,探讨了GSK-3β在脑卒中损伤中的作用及其与内质网-线粒体偶联的关系。研究表明,GSK-3β的异常激活是脑卒中炎症性脑损伤的重要驱动因素,其通过影响内质网-线粒体偶联引发线粒体钙超载和炎症反应。本研究阐明了GSK-3β在脑卒中的关键作用,揭示了新的病理机制,并提出了潜在的治疗作用靶点。

已有研究报道GSK-3β在脑卒中后多种病理过程中发挥关键作用,其激动剂通过NF-κB信号通路促进NLRP3炎性小体的形成,诱导TNF-α和IL-1β等促炎因子的过度表达^[16]。本文实验结果也显示MCAO模型中GSK-3β表达显著升高,同时伴随TNF-α和IL-1β等促炎因子水平的增加,提示GSK-3β的激活在脑卒中的炎症反应中具有重要作用。此外,使用GSK-3β抑制剂TDZD-8显著降低了炎症因子的表达和脑组织损伤,进一步支持GSK-3β抑制作为治疗脑卒中及其后遗症的潜在策略。

内质网-线粒体偶联是维持细胞信号传导的重要结构^[17,18]。本文中MCAO模型的内质网-线粒体接触显著增加,提示脑卒中可能引发内质网-线粒体偶联的过度激活。这种现象与细胞内线粒体功能损伤密切相关,而GSK-3 β 抑制剂显著改善了这一异常,表明调节内质网-线粒体偶联可能是减轻脑损伤的关键环节。与以往的研究相比,本研究进一步揭示了脑卒中对细胞器功能及其相互作用的影响,为深入理解大脑损伤的分子机制提供了新的视角。

有意义的是,本研究首次明确了GSK-3 β 通过内质网-线粒体偶联影响脑细胞炎症反应的机制。结果表明,GSK-3 β 激活可能通过改变内质网和线粒体之间钙离子的传递,促进脑卒中后神经元中的炎症反应,而GSK-3 β 抑制剂的使用不仅显著改善了脑细胞中线粒体Ca²⁺浓度,还降低了炎症因子的水平。这一发现提示GSK-3 β 在缺血性脑卒中模型中不仅影响线粒体功能,还可能通过影响内质网和线粒体之间的联系进而影响脑卒中病理损伤。

尽管本研究取得了一些进展,但仍存在一定的局限性。首先,实验采用MCAO动物模型,虽然能够模拟脑卒中的基本病理过程,但结果可能无法完全反映人类脑卒中的复杂病理特征;其次,研究主要集中在GSK-3 β 与内质网-线粒体偶联的关系,其具体分子机制和其他潜在下游信号尚未深入探讨;最后,研究结论的临床转化价值还需进一步通过多中心实验和临床验证进行评估。

总而言之,本研究首次从内质网-线粒体偶联的角度,探讨了GSK-3 β 在脑卒中炎症性脑损伤中的作用机制。研究发现GSK-3 β 异常激活通过调控内质网-线粒体偶联损伤脑组织,抑制GSK-3 β 活性能够有效改善脑卒中的炎症反应和线粒体功能障碍。研究结果不仅为脑卒中的分子研究提供了新的视角,也为开发针对GSK-3 β 的精准治疗策略奠定了基础。

伦理学声明: 本研究方案经邯郸市中心医院实验动物伦理委员会审批(批号:240306-012),符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 雷建华负责论文设计、实验操作、研究过程的实施、撰写论文;杜贺芳负责数据收集、统计学分析、绘制图表;刘昱肖负责拟定写作思路、文献收集、指导撰写论文、修改论文并最后定稿。

[参考文献]

[1] Shehjar F, Maktabi B, Rahman ZA, et al. Stroke: Molecular mechanisms and therapies: Update on recent developments [J]. *Neurochem Int*, 2023, 162: 105458.

- [2] Owolabi MO, Thrift AG, Mahal A, et al. Primary stroke prevention worldwide: Translating evidence into action [J]. *Lancet Public Health*, 2022, 7(1): e74-e85.
- [3] Feske SK. Ischemic stroke [J]. *Am J Med*, 2021, 134(12): 1457-1464.
- [4] Magid-Bernstein J, Girard R, Polster S, et al. Cerebral hemorrhage: pathophysiology, treatment, and future directions [J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1204-1229.
- [5] Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7609.
- [6] Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259-305.
- [7] George MG. Risk factors for ischemic stroke in younger adults: A focused update [J]. *Stroke*, 2020, 51(3): 729-735.
- [8] Matsuo R, Ago T, Kiyuna F, et al. Smoking status and functional outcomes after acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2020, 51(3): 846-852.
- [9] Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions [J]. *Neurology*, 2021, 97(20 Suppl 2): S6-S16.
- [10] Fan J, Li X, Yu X, et al. Global burden, risk factor analysis, and prediction study of ischemic stroke, 1990—2030 [J]. *Neurology*, 2023, 101(2): e137-e150.
- [11] Balboni B, Masi M, Rocchia W, et al. GSK-3 β allosteric inhibition: A dead end or a new pharmacological frontier? [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7541.
- [12] Lin J, Song T, Li C, et al. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118659.
- [13] Appunni S, Gupta D, Rubens M, et al. Deregulated protein kinases: friend and foe in ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(12): 6471-6489.
- [14] Chen C, Dong X, Zhang W, et al. Dialogue between mitochondria and endoplasmic reticulum-potential therapeutic targets for age-related cardiovascular diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1389202.
- [15] Kalarikkal M, Saikia R, Oliveira L, et al. Nup358 restricts ER-mitochondria connectivity by modulating mTORC2/Akt/GSK3 β signalling [J]. *EMBO Rep*, 2024, 25(10): 4226-4251.
- [16] Khan SS, Janrao S, Srivastava S, et al. GSK-3 β : An exuberating neuroinflammatory mediator in Parkinson's disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 210: 115496.
- [17] Zhao WB, Sheng R. The correlation between mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and Ca²⁺ transport in the pathogenesis of diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2025, 46(2): 271-291.
- [18] Zhang Y, Wu Y, Zhang M, et al. Synergistic mechanism between the endoplasmic reticulum and mitochondria and their crosstalk with other organelles [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 51.

引证本文:雷建华,杜贺芳,刘昱肖. 脑卒中GSK-3 β 调控内质网-线粒体偶联参与炎症性脑损伤的机制研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2025, 42(7): 637-640.