

海藻糖挽救多个信号通路关键基因  
敲低导致的神经管畸形

完成人

欧阳雨潇

指导小组成员

杨雪艳 副研究员

# 目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 神经管的形成过程	2
1.2 神经管畸形及其致病原因	2
1.3 海藻糖与神经管畸形	4
1.4 研究中涉及的基因	7
二、材料与amp;方法	8
2.1 实验材料	8
2.1.1 实验动物	8
2.1.2 Morpholino oligos	8
2.1.3 抗体	8
2.1.4 实验耗材	9
2.2 实验试剂	9
2.2.1 斑马鱼胚胎培养液	9
2.2.2 斑马鱼胚胎麻醉剂	9
2.2.3 显微注射液	9
2.2.4 蛋白样本制备所需试剂	10
2.2.5 Western Blot 实验所需试剂	10
2.3 实验仪器和设备	12
2.4 实验软件	12

2.5 实验方法	12
2.5.1 收集斑马鱼胚胎	12
2.5.2 斑马鱼胚胎显微注射	12
2.5.3 3dpf 胚胎 NTDs 表型观察	13
2.5.4 蛋白样品制备	13
2.5.5 Western Blot	14
三、研究结果	15
3.1 海藻糖对各基因敲低导致的 NTDs 的表型挽救效果	15
3.1.1 <i>Grhl3</i>	15
3.1.2 <i>Wnt5a</i>	16
3.1.3 <i>Wnt3a</i>	18
3.1.4 <i>Vangl2</i>	20
3.2 海藻糖对 <i>Wnt5a</i> 和 <i>Vangl2</i> 敲低胚胎的自噬水平重建效果	22
四、讨论	23
参考文献	26
致谢	29

# 摘要

神经管畸形 (Neural tube defects, NTDs) 是由于胚胎发育期间神经管未能完全闭合而导致的出生缺陷, 其致病原因复杂多样, 受到多种遗传和环境因素的影响。海藻糖作为一种天然双糖, 能够激活细胞自噬以及调节细胞内蛋白的分布和稳定性从而应用于多种疾病的治疗。在前期的工作中, 我们发现海藻糖具有预防和治疗神经管畸形的潜在可能性。因此在本研究中, 我们在斑马鱼胚胎中对 4 个确定的 NTDs 相关的信号通路关键基因 *Vangl2*、*Grhl3*、*Wnt5a* 及 *Wnt3a* 进行了敲低, 并通过显微注射 5% 海藻糖溶液的方式进行挽救, 发现海藻糖对除 *Vangl2* 以外的各中基因缺陷导致的 NTDs 表型均能起到一定的挽救作用, 而在 *Vangl2* 敲低胚胎中反而加剧了 NTDs 表型。在随后的自噬水平分析中, 我们则发现海藻糖在 *Wnt5a* 敲低胚胎中能激活自噬, 而在 *Vangl2* 敲低胚胎中却抑制了自噬作用。因此我们认为海藻糖能够通过调节细胞自噬作用的方式对由各种原因导致的 NTDs 起到预防作用。总之, 我们的研究初步证明了海藻糖具有应用于防治多种类型的 NTDs 的潜在价值, 并为进一步进行相关机理和临床应用研究提供了一定的思路。

**关键词:** 神经管畸形, 海藻糖, 细胞自噬, 信号通路

# Abstract

Neural tube defects (NTDs) are a series of severe birth defects caused by the incomplete closure of the neural tube during embryonic development. The etiology of NTDs is complex, including many genes and pathways such as autophagy, apoptosis and signal transduction. As a natural disaccharide, trehalose can activate autophagy and regulate the distribution and stability of intracellular protein. Our previous study suggested trehalose may be promising in the prevention and treatment of NTDs. In this study, we knocked down four NTDs-related signaling pathway genes including *Vangl2*, *Grhl3*, *Wnt5a* and *Wnt3a* in zebrafish embryos by morpholinos and rescued them by microinjection of 5% trehalose solution. We discovered that trehalose can rescue NTDs caused by defects in all these morphant embryos except *Vangl2*-knockdown embryos, in which trehalose even exacerbated the NTDs phenotype. Then we analyzed autophagy levels in these embryos and found that trehalose can activate autophagy in *Wnt5a*-knockdown embryos, but inhibit autophagy in *Vangl2*-knockdown embryos. Therefore, we believe that trehalose can prevent a portion of NTDs by upregulating autophagy level in embryos. In conclusion, our study preliminarily demonstrated the potential value of trehalose in the prevention of various types of NTDs and provided some ideas for further related mechanism researches and clinical applications.

**Key words:** Neural tube defects (NTDs), trehalose, autophagy, signaling pathways

# 一、前言

神经管畸形 (Neural tube defects, NTDs) 是一类常见的出生缺陷, 主要的类型有脊柱裂 (spina bifida) 和无脑畸形 (anencephaly) 等。在世界范围内, 新生儿 NTDs 的发病率约为 1-2%<sup>[1]</sup>。妊娠期补服叶酸是目前最常用的一种预防措施, 可以有效减少 50-70% 的 NTDs。但是随着叶酸的普及, 目前仍有大量对叶酸补服不响应的神经管畸形患儿出生。在神经管畸形的小鼠模型中, 也有很多基因敲除小鼠对补充叶酸完全不响应, 例如 *Axd*、*Ct*、*Grhl3*、*Map3K4*<sup>[2]、[3]</sup> 等。因此寻找叶酸之外的其他安全有效的神经管畸形预防策略, 进一步降低神经管畸形的发生率是出生缺陷领域在后叶酸时代亟待解决的关键问题。

海藻糖是一种天然双糖, 广泛存在于各物种之中, 可以通过阻止蛋白质变性的方式调节蛋白质的分布与稳定性, 从而在各种压力环境下为细胞提供保护作用。此外, 海藻糖还能抑制葡萄糖转运体 (glucose transporter, GLUT) 对葡萄糖的转运作用, 在细胞内模拟一种低 ATP 的饥饿状态, 从而激活细胞自噬<sup>[4]</sup>。哺乳动物虽然自身不能够内源合成海藻糖, 但是研究发现海藻糖的保护作用在哺乳动物中同样有效, 可以广泛应用于神经退行性疾病、感染性疾病、代谢性疾病、衰老、癌症等多种疾病的临床治疗<sup>[5]</sup>。

课题组在前期的工作中发现海藻糖可以以一种剂量依赖性方式挽救斑马鱼 *Ambra1* (autophagy and beclin 1 regulator 1) 基因敲低引起的 NTDs 表型, 而且在此过程中可以检测到自噬水平的显著变化<sup>[6]</sup>。之前也有研究者发现给予糖尿病孕鼠口服海藻糖可以通过激活自噬、减少氧化压力和线粒体损伤从而有效降低胚胎中神经管畸形的发生率<sup>[7]</sup>。因此海藻糖具有成为神经管畸形预防药物的潜在可能性, 但是目前还没有学者对海藻糖能否广泛适用于预防各类遗传或环境因素引起的神经管畸形进行系统的研究。本课题拟利用斑马鱼体系进行快速、高通量的筛选, 检测和评估海藻糖在多种重要的信号通路基因表达异常引起的神经管畸形模型中的保护效果, 确定海藻糖预防神经管畸形的适用范围, 进而探讨海藻糖抑制神经管畸形发生的具体分子机理, 为深入理解出生缺陷的发生机制提供新的视角, 并为海藻糖的临床应用铺平道路。

## 1.1 神经管的形成过程

神经管是胚胎发育过程中形成的中枢神经系统的原始结构，在后续过程中会逐渐分化为脑和脊髓。神经管的形成过程可分为初级神经管化（primary neurulation）和次级神经管化（secondary neurulation, SN）两个过程。初级神经管化是指神经板（neural plate）在周围细胞的引导下，增殖内陷并最终与上胚层细胞分离，形成中空管的过程（图 1 所示）。对于绝大多数脊椎动物来说，初级神经管化是前部神经管形成所必需的过程。在人类胚胎发育中，初级神经管化一般出现在受精后的第 3-4 周。而次级神经管化则发生在初级神经管化完全结束之后，在人类胚胎发育中一般出现在受精后的第 5-6 周。在该过程中，胚胎尾芽中的间充质干细胞分化形成神经上皮细胞，然后分散到尾芽背部，产生围绕中央腔的神经上皮（图 1）<sup>[8]</sup>。

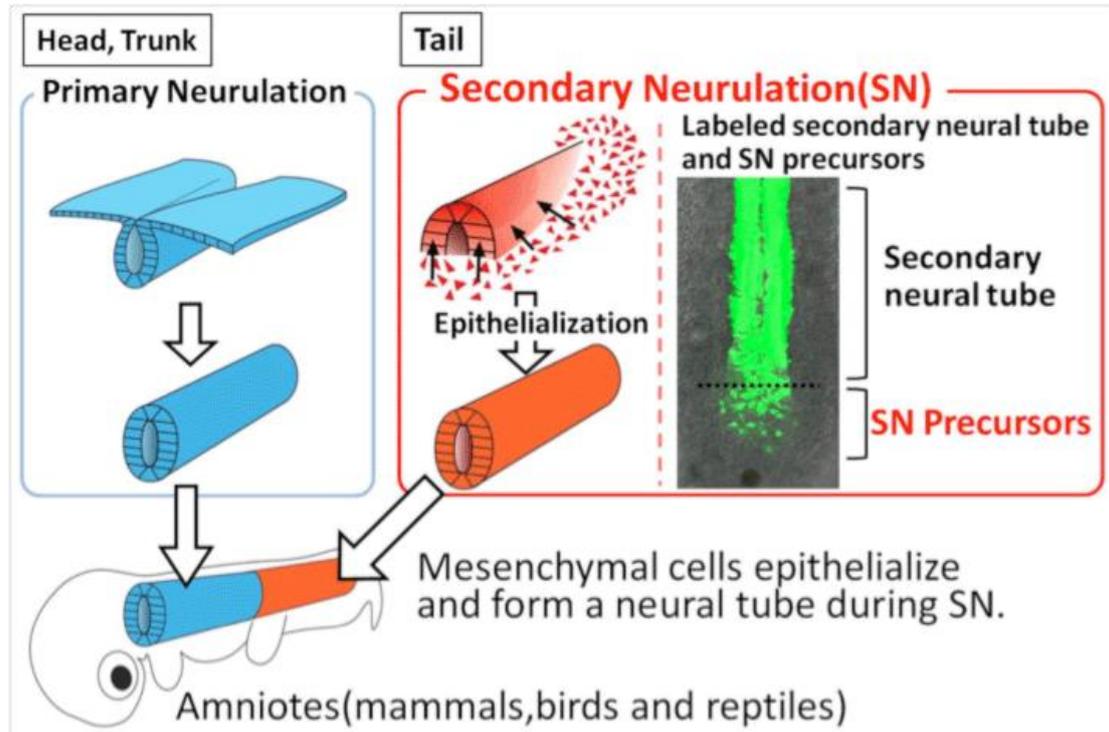


图 1. 羊膜动物的初级神经管化与次级神经管化<sup>[9]</sup>

羊膜动物包括哺乳动物、鸟类和爬行动物；蓝色方框内为初级神经管化的示意图，在该过程中上皮细胞直接内陷形成中空的神经管；右侧红色方框左侧为次级神经管化（SN）的示意图，在此过程中身体后部区域的间充质干细胞转化为神经上皮细胞；红色方框右侧为电镜下经荧光标记的 SN 前体转化为次级神经管的过程

## 1.2 神经管畸形及其致病原因

神经管闭合是一个受到精细调控的动态过程，闭合过程中任何环节的异常

都会导致闭合失败，造成不同类型的神经管畸形（Neural tube defects, NTDs）。在哺乳动物中，初级神经管化不是一个连续的过程，而是从体轴上的几个离散的位点开始的。在小鼠胚胎中，闭合起始位点共有 3 个，分别位于后脑/颈椎边界（closure 1）、前脑/中脑边界（closure 2）和前脑喙端（closure 3）。初级神经管化从以上三个位点开始，以单向或双向的方式沿体轴进行，最终在前神经孔及后神经孔处完成闭合（图 2.a）。人类胚胎缺乏 closure 2，且 closure 1 的位置更靠喙端（图 2.b）。初级神经管化完成后，次级神经管化从闭合的后神经孔处开始进行。对于人类而言，closure 1 闭合失败会导致颅脊柱裂（craniorachischisis），前神经孔闭合失败会导致无脑畸形（anencephaly），而后神经孔闭合失败则会造成腰骶椎裂（lumbosacral spina bifida）（图 2.b）<sup>[8]</sup>。

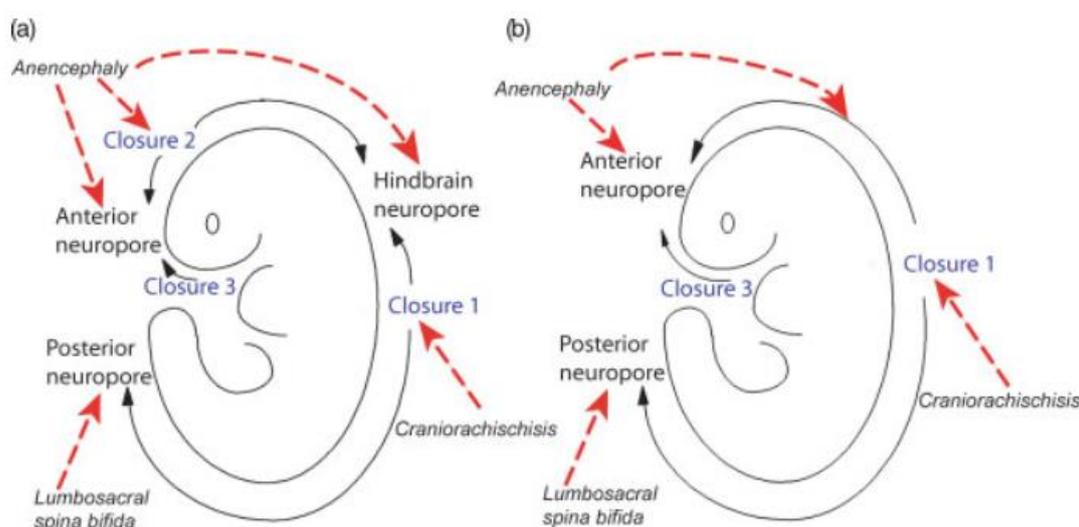


图 2. 小鼠和人类胚胎的神经管闭合过程以及导致 NTDs 的因素<sup>[8]</sup>

(a) 小鼠胚胎神经管闭合过程；(b) 人类胚胎神经管闭合过程；图中 Closure1、Closure2 和 Closure3 为初级神经管化的三个起始位点，而 Anterior neuropore 和 Posterior neuropore 是初级神经管最终完成闭合的位点；红色箭头指示了导致不同类型的 NTDs 的因素

神经管畸形是最为常见的出生缺陷之一。在全球范围内，新生儿 NTDs 的发病率约为 1-2%<sup>[1]</sup>。神经管畸形的致病原因复杂多样，如在小鼠模型中已经有超过 300 种突变体显示出神经管闭合缺陷的表型，涉及多种细胞功能和信号通路，包括细胞自噬作用、细胞骨架蛋白、细胞周期和神经细胞发生相关蛋白、细胞凋亡相关蛋白、细胞表面蛋白等，以及 Notch、Wnt/PCP、Shh、TGF- $\beta$ /BMP 以及 Wnt/ $\beta$ -catenin 等信号通路<sup>[2]</sup>。其中，细胞自噬是指自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体从而去除不需要的细胞成分的过程，对于细胞的生存、分

化、发育等至关重要，也是胚胎发育过程中实现快速的细胞重构的基础。在神经管闭合期间，发育中的神经上皮会保持高水平的自噬，而自噬损伤积累到一定的程度会导致大量神经上皮细胞凋亡，最终导致 NTDs 的发生<sup>[10]</sup>。而细胞凋亡则是一种由基因控制的细胞程序性死亡，用于清除异常和不需要的细胞，主要由半胱天冬酶（caspase）家族调控。细胞凋亡和自噬作用密切相关，也是神经管发育所必需的过程，其水平过高或过低都会使神经管闭合受损，从而造成 NTDs 表型<sup>[11]</sup>。

妊娠期补服叶酸是目前最常用的 NTDs 预防措施，可以有效减少 50-70% 的 NTDs。但是随着叶酸的普及，目前仍有大量对于叶酸补服不响应的 NTDs 患儿出生。在神经管畸形的小鼠模型中，也有很多基因敲除小鼠对补充叶酸完全不响应，例如 *Axd*、*Ct*、*Grhl3*、*Map3K4* 等<sup>[2]</sup>、<sup>[3]</sup>。因此寻找叶酸之外的其他安全有效的神经管畸形预防策略，进一步降低 NTDs 的发生率是出生缺陷领域在后叶酸时代亟待解决的关键问题。

### 1.3 海藻糖与神经管畸形

海藻糖（trehalose）是一种天然双糖，其结构如图 3 所示。海藻糖广泛存在于各物种中，可以通过阻止蛋白质变性的方式调节蛋白质的分布与稳定性，从而在各种压力环境下为细胞提供保护作用。此外，如图 4 所示，海藻糖还能抑制葡萄糖转运体（glucose transporter, GLUT）对葡萄糖的转运作用，在细胞内模拟一种低 ATP 的饥饿状态，从而启动细胞自噬<sup>[4]</sup>。哺乳动物虽然自身不能够内源合成海藻糖，但是研究发现海藻糖的保护作用在哺乳动物中同样有效，可以广泛应用于神经退行性疾病、感染性疾病、代谢性疾病、衰老、癌症等多种类型的疾病的临床治疗<sup>[5]</sup>。

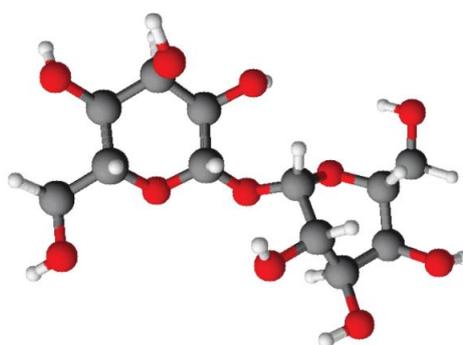


图 3. 海藻糖分子化学结构的球棍模型<sup>[12]</sup>

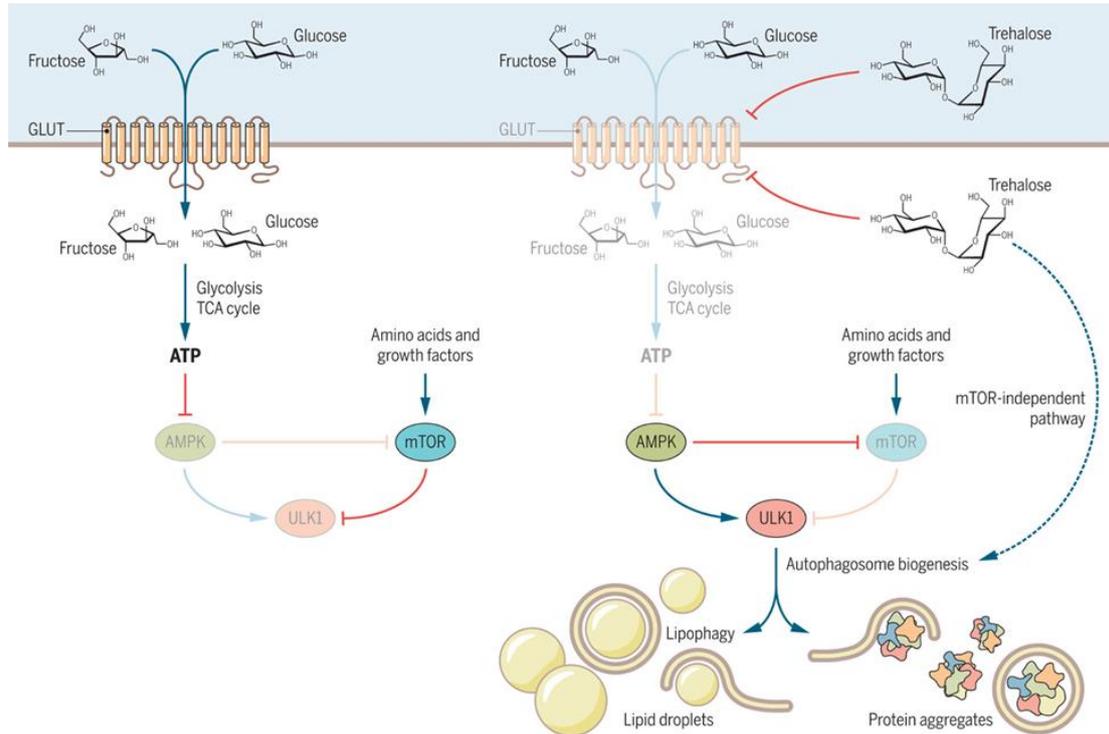


图 4. 海藻糖对细胞自噬的促进作用<sup>[4]</sup>

左侧为通常情况下，葡萄糖通过 GLUT 转运至胞内，并通过 TCA 循环产生 ATP，抑制 AMPK 的活性从而抑制自噬作用的过程；而右侧则表明海藻糖能抑制 GLUT 对葡萄糖的转运作，使得胞内 ATP 含量下降并解除对 AMPK 的抑制作用，而 AMPK 能活化 ULK1 并解除 mTOR 对 ULK1 的抑制作用，从而激活细胞自噬；此外，海藻糖可能还会通过其它的 mTOR-independent 的通路来诱导自噬

在出生缺陷领域，海藻糖的应用尚处于起步阶段。目前已有研究表明给予糖尿病孕鼠口服海藻糖可以通过激活自噬、减少氧化压力和线粒体损伤从而有效降低胚胎中神经管畸形的发生率<sup>[7]</sup>。在课题组前期的研究中，我们也发现 2% 海藻糖可以显著减轻斑马鱼自噬相关基因 *Ambra1a*-MO 敲低造成的 NTDs 表型，而 5% 海藻糖的挽救效果更好（图 5.a）。此外还发现 *Ambra1a*-MO 敲低的胚胎中，LC3-II 相对 LC3-I 的表达水平显著降低，而 SQSTM1/p62 表达显著增加，说明自噬过程受到了损害（图 5.b, c, d）。将 5% 的海藻糖注射到这些敲低胚胎中可以显著增加 LC3-II 的表达并且减少 SQSTM1/p62 的表达(图 5.b, c, d)。随后我们将 2% 或 5% 的海藻糖与 250pg 人 *AMBRA1* mRNA 和 *Ambra1a*-MO 一起注射斑马鱼胚胎，检测海藻糖是否也能协助增强 *AMBRA1* 蛋白的挽救效果。结果表明，5% 海藻糖可以显著改善 WT-*AMBRA1* mRNA 的挽救作用 ( $p < 0.01$ )（图 5）。相关研究结果表明海藻糖可以单独或者与人 *AMBRA1* mRNA 协同重

建自噬过程，并挽救由于 *Ambra1a*-MO 敲低引起的斑马鱼胚胎的形态异常<sup>[6]</sup>。

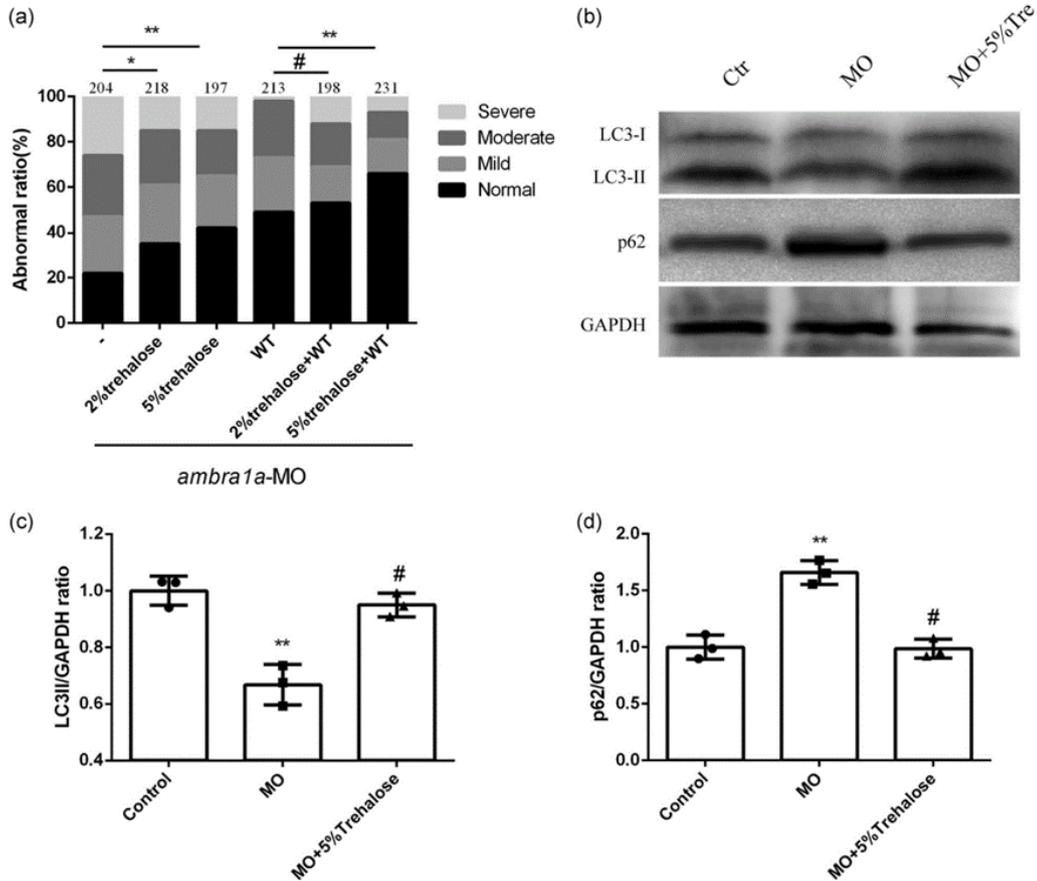


图 5. 海藻糖对斑马鱼胚胎神经管畸形的表型挽救与自噬水平的重建<sup>[6]</sup>

(a) 不同浓度的海藻糖溶液对 *Ambra1a*-MO 敲低导致的斑马鱼胚胎神经管畸形的表型挽救效果；(b), (c), (d) 5%海藻糖溶液重建 *Ambra1a*-MO 敲低导致的神经管畸形斑马鱼胚胎中的自噬水平

以往探索新的神经管畸形预防策略大多是沿袭叶酸的研究模式，试图通过补充代谢底物或者代谢产物来预防神经管畸形的发生。例如补充甲硫氨酸在 *Axd* 突变体小鼠中可以降低 50%的神经管畸形发生率<sup>[13]</sup>。*Ct* 突变体小鼠的脊柱裂发生率在补充肌醇之后可以下降 70-85%<sup>[14], [15]</sup>。SELH/Bc 品系的小鼠在饲喂 Purina5001 之后露脑畸形的比例下降 55-85%<sup>[16]</sup>。课题组前期与 Richard Finnell 课题组的合作研究结果也证实补充甲酸盐后可以使得 78%的 *Slc25a32* 基因敲除小鼠完成神经管闭合过程<sup>[17]</sup>。但是这些预防策略往往是针对特定的代谢通路，而且只在少数几种小鼠神经管畸形模型中进行了验证，缺乏一种能够广泛适用，并且经过全面评估的预防手段。

但是海藻糖与先前的研究思路完全不同，是从调节细胞内稳态的角度出

发。目前认为海藻糖可以作为自噬诱导因子发挥作用，而细胞凋亡与细胞自噬密切相关，很可能也会受到海藻糖的影响。此外，海藻糖还可以调节细胞内蛋白质的稳定性，以及通过调节内吞作用调控细胞表面蛋白质的分布<sup>[18]</sup>，因此对于包括细胞表面受体蛋白、信号通路蛋白以及转录因子等因素导致的 NTDs 同样也有可能受到海藻糖的影响。

尽管目前针对海藻糖对 NTDs 的治疗效果的研究较少，但已有大量研究表明海藻糖可以广泛应用于多种疾病的临床治疗<sup>[5]</sup>。同时，海藻糖的安全性也在大量研究中得到了证实。目前已有大量的小鼠和大鼠实验表明，即使摄入占食物总量 10% 的海藻糖也不会产生任何毒副作用<sup>[19]</sup>。在临床试验方面，静脉注射 90mg/ml 海藻糖的方法也已被应用于治疗 3 型脊髓小脑共济失调

（spinocerebellar ataxia type 3, SCA3）患者的二期临床实验中<sup>[5]</sup>。所以一旦证实海藻糖能够有效抑制神各类经管畸形的发生，就可以比较迅速地完成临床转化。

#### 1.4 研究中涉及的基因

在本研究中，我们利用斑马鱼体系进行了快速、高通量的筛选，观察海藻糖对于不同类型基因敲低导致的发育畸形是否具有挽救效应。课题组先前的研究已表明海藻糖对于细胞自噬相关基因 *Ambra1* 敲低导致的神经管畸形具有显著的挽救效应。而此次研究中涉及的基因则包括 *Grhl3*、*Vangl2*、*Wnt5a* 和 *Wnt3a*，它们不直接参与细胞自噬以及细胞凋亡的过程，但都是重要的信号通路基因或转录因子基因，在神经管发育过程中起到重要的作用，其缺失或异常在小鼠模型中均会导致 NTDs 表型。

## 二、材料与amp;方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

野生型斑马鱼（AB 品系），在标准条件、28.5℃恒温下饲养于课题组的斑马鱼房内。

#### 2.1.2 Morpholino oligos

MO（Morpholino oligos）是由约 25 个 Morpholino 亚基组成的短链，每个亚基含有一个碱基、一个亚甲基吗啉环和一个二氨基磷酸酯键。作为反义寡核苷酸，MO 能与互补 RNA 通过碱基互补配对的方式结合，从而起到调节 pre-mRNA 剪接、抑制 mRNA 翻译起始过程的作用。

本研究中共用到 4 种基因的 MO，均购自 GENE TOOLS 公司。各组 MO 的靶标及碱基序列信息如表 1 所示。

表 1 各组 MO 的靶标及碱基序列

MO 名称	靶标	碱基序列	分子量
<i>Vangl2</i> -MO	<i>Vangl2</i> 基因	GTACTGCGACTCGTTATCCATGTC	8070.75
<i>Grhl3</i> -MO	<i>Grhl3</i> 基因	TGAGAGCCTCAATCTCCTTGGTCAT	8410.05
<i>Wnt5a</i> -MO	<i>Wnt5a</i> 基因	ACTTCAGCTTCAGCAGCATCATAAC	8372.05
<i>Wnt3a</i> -MO	<i>Wnt3a</i> 基因	ATAGTGTTTTTACCGAACGTCCAGC	8434.07

将各组 MO 粉末分别加入无菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解，配置成浓度为 1mM 的储存液。

#### 2.1.3 抗体

##### 一抗

rabbit anti-MAP1LC3/LC3A/B，购自 CST 公司。

SQSTM1/p62 (D5E2) rabbit mAb，购自 CST 公司。

anti-GAPDH monoclonal，购自 Proteintech 公司。

##### 二抗

anti-mouse immunoglobulin G，购自 Proteintech 公司。

anti-rabbit immunoglobulin G，购自 Proteintech 公司。

## 2.1.4 实验耗材

1mL、200 $\mu$ L 及 10 $\mu$ L 枪头，购自 Axygen 公司。

1.5ml 及 2ml EP 管，购自 Axygen 公司。

5ml 及 10ml 移液管，购自 Axygen 公司。

斑马鱼胚胎培养皿，购自 Thermo 公司。

15ml、50ml 离心管，购自 Corning 公司。

硝酸纤维素（NC）膜，购自 Merck 公司。

## 2.2 实验试剂

### 2.2.1 斑马鱼胚胎培养液

配制 50 $\times$  E3 培养液，如表 2 所示。

表 2 50 $\times$  E3 培养液配方

成分	加入量
NaCl	14.69g
KCl	0.63g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.43g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.06g
加水定容至	1000 mL

使用时，用超纯水稀释至 1 $\times$ 。每 10L 1 $\times$  E3 加 1mL 1%的亚甲基蓝。

### 2.2.2 斑马鱼胚胎麻醉剂

25 $\times$  Tricaine (0.4%): 将 tricaine 粉末以 0.4%的质量体积比浓度溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中，得到 25 $\times$ 储备液。

### 2.2.3 显微注射液

按表 3 配制各组显微注射液，各组注射液的总体积均为 20 $\mu$ L。

表 3 各组显微注射液配方

组别名称	加入对应 MO 储存液	MO 浓度	加入 10%海藻糖母液	海藻糖浓度	加入 ddH <sub>2</sub> O
<i>Vangl2</i> -MO	4.31μL	4ng/2.3nL	0	0	15.69μL
<i>Vangl2</i> -MO+5% Trehalose			10μL	5%	5.69μL
<i>Grhl3</i> -MO	4.14μL	4ng/2.3nL	0	0	15.86μL
<i>Grhl3</i> -MO+5% Trehalose			10μL	5%	5.86μL
<i>Wnt5a</i> -MO	15.58μL	15ng/2.3nL	0	0	4.42μL
<i>Wnt5a</i> -MO+5% Trehalose			0 (改加 1mg 海藻糖粉末)	5%	4.42μL
<i>Wnt3a</i> -MO	8.25μL	8ng/2.3nL	0	0	11.75μL
<i>Wnt3a</i> -MO+5% Trehalose			10μL	5%	1.75μL

#### 2.2.4 蛋白样本制备所需试剂

RIPA 裂解液 (弱), 购自 Roche 公司。

蛋白酶抑制剂 (Cocktail), 购自 Roche 公司。

5× SDS loading buffer, 按表 3 配制。

表 3 5× SDS loading buffer 配方

成分	加入量
1M Tris-HCl (pH6.8)	6mL
1%溴酚蓝	10mL
β-巯基乙醇	5mL
10%SDS	20mL
50%甘油	50mL
加水定容至	100 mL

混匀后分装, -20°C保存。

#### 2.2.5 Western Blot 实验所需试剂

Acryl/Bis 30% Solution (29:1), 购自上海生工。

Tween 20, 购自上海生工。

脱脂奶粉，购自上海生工。

预染蛋白标准品（10-180KDa），购自 GeneTech。

无水乙醇及无水甲醇，购自国药试剂。

ECL 显影液，购自 Tanon 公司。

浓缩胶及 12%分离胶，按表 4 配制。配制完成后现将浓缩胶加之凝胶模具总高度的 2/3 处，完全凝固后再用分离胶填满模具并插上梳子。

表 4 浓缩胶及 12%分离胶配方

名称	H <sub>2</sub> O	30% Acrylamide	1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	10% SDS	10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	TEMED
浓缩胶	6.8mL	1.7mL	1.25mL	100μL	100μL	10μL
12%分 离胶	6.6mL	8.0mL	5.0mL	200μL	200μL	8μL

10×电泳缓冲液及 10×转膜缓冲液，按表 5 配制。

表 5 10×电泳缓冲液及 10×转膜缓冲液配方

名称	Tris	甘氨酸	SDS	加 ddH <sub>2</sub> O 定容至
10×电泳缓冲液	30.2g	187.5g	10.0g	1L
10×转膜缓冲液	30.2g	144g	3.7g	1L

10× TBS 溶液，按表 6 配制，每份总体积 1L。

表 6 10× TBS 溶液配方

成分	加入量
Tris (pH7.5)	24.23g
NaCl	80.06g
HCl	调节 pH 至 7.6

使用时稀释至 1×，并加入 0.1%的 TWEEN 20，得到 1× TBST 溶液。

封闭液：将 2.5g 脱脂奶粉溶解于 1× TBST 溶液中并定容至 50ml，得 5%脱脂牛奶。

## 2.3 实验仪器和设备

仪器名称	厂商
解剖镜 (SMZ143-N2TG)	Motic
电子天平	上海精科天平厂
移液枪	RANIN
恒温培养箱	上海志成设备有限公司
冰箱	海尔
-80°C冰箱	Thermo Fisher
电动移液器	Axygen
电动组织研磨器	TIANGEN
Western Blot 电泳槽	Bio-Rad
Western Blot 转膜仪	Bio-Rad
化学发光成像仪	Tanon

## 2.4 实验软件

Western Blot 成像软件: Tanon GIS。

数据分析软件: Minitab 17、GraphPad Prism 8。

## 2.5 实验方法

### 2.5.1 收集斑马鱼胚胎

在进行显微注射操作的前一天, 将雌性和雄性野生型 (AB 品系) 斑马鱼置于同一交配缸中, 用挡板将两者分隔开来, 每个交配缸中放置雌、雄鱼各一条。次日上午 8:00-10:00 之间, 在装配完显微注射针及注射液后, 撤去挡板使雌、雄斑马鱼进行交配。待雌鱼产卵后将鱼卵收集至培养皿内, 加入适量 1× E3 培养液。

### 2.5.2 斑马鱼胚胎显微注射

将收集到的斑马鱼卵排布在注射专用平板 (由琼脂糖以 1.5% 的质量体积比溶解于 1× E3 培养液, 凝固后制成) 上。选取 1-8 细胞期的胚胎进行显微注射。针对每一基因, 各配置三组显微注射液:

a) WT 对照组: 注射液中仅含有 ddH<sub>2</sub>O;

b) MO 敲降组：注射液含有特定浓度的相应基因的 MO；

c) MO 敲降+海藻糖挽救组（含有特定浓度的 MO 及 5%海藻糖）。

将注射液以 2.3nL 的体积注射入斑马鱼胚胎卵黄囊内。完成注射后，将胚胎收集至培养皿中，并加入适量 1×E3 培养液，置于 28℃恒温培养箱中培养 3 天。

### 2.5.3 3dpf 胚胎 NTDs 表型观察

3 天后，挑除已死亡的胚胎，并对尚未破膜的胚胎进行剥除卵膜操作。在培养液中加入约 1mL 1× Tricaine 以麻醉胚胎。在解剖镜下观察每组胚胎的畸形程度，并拍照记录。针对每个基因的各組胚胎，分别收集 30 条胚胎于 1.5mL 离心管中，-80℃保存，用于后续的水平分检测。根据畸形严重程度将胚胎分为 Normal、Mild、Moderate、Severe 四个类型（图 6），并分别统计其数量。对于每一基因，分别通过卡方 ( $\chi^2$ ) 检验判断各组间是否存在显著差异。

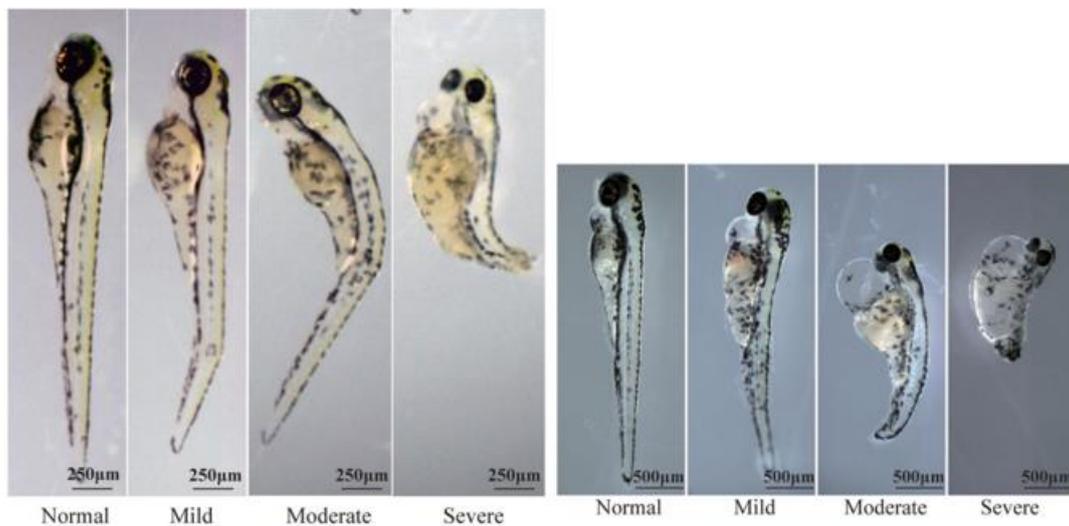


图 6. 3dpf 斑马鱼胚胎的畸形严重程度判断标准<sup>161</sup>

### 2.5.4 蛋白样品制备

取出-80℃保存的斑马鱼胚胎，往各离心管中加入 300µL RIPA 裂解液（弱）（裂解液中需加入蛋白酶抑制剂，用前者将后者由 50×稀释至 1×）。将各离心管置于冰上，使用电动组织研磨器小心研磨离心管中的胚胎，直至裂解液中无明显颗粒，随后于冰上裂解 30min。裂解完成后，将各离心管在 4℃下 12000rpm 离心 10min。完成离心后，使用移液枪将上清液转移到干净的 1.5ml

离心管内，随后在各离心管中加入约 60 $\mu$ L 5 $\times$  SDS loading buffer，上下颠倒使液体充分混合。将各离心管置于 95 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10min。

### 2.5.5 Western Blot

按表 4 配制 SDS-PAGE 胶。待凝胶完全凝固后，将其固定在电泳槽内，并倒入约 1L 1 $\times$ 电泳缓冲液（由 10 $\times$ 电泳缓冲液经 ddH<sub>2</sub>O 稀释后得到），随后向样孔中加入样品以及预染蛋白标准品，每个样孔上样 25 $\mu$ L。完成后打开电源，首先在 80V 恒压下电泳 30min，随后在 120V 恒压下电泳约 90min。

电泳结束后，将 SDS-PAGE 胶取出，弃去浓缩胶以及分离胶的边缘部分。将胶浸泡在 1 $\times$ 转膜缓冲液（由 100mL 10 $\times$ 转膜缓冲液经过 700mL ddH<sub>2</sub>O 及 200mL 无水甲醇稀释后得到）中，并将 NC 膜浸泡于无水甲醇或无水乙醇中活化。将转膜专用的夹子浸泡于转膜缓冲液中，黑色的一面朝下从上到下依次放置海绵、3 层滤纸、SDS-PAGE 胶、NC 膜、三层滤纸、海绵。夹上夹子后将其装到转膜仪中，放入电泳槽内，并在电泳槽内放入冰盒。完成后将电泳槽置于冰上并打开电源，在 200mA 恒流下转膜 120min。

转膜结束后，将 NC 膜取出并放入加有封闭液（5%脱脂牛奶）的盒子中，在摇床上室温孵育 1h。封闭结束后，弃去脱脂牛奶并用 1 $\times$  TBST 洗涤。将 NC 膜按照各蛋白的条带位置裁剪为 3 份，分别加入经 1 $\times$  TBST 稀释的相应一抗，在 4 $^{\circ}$ C 摇床上过夜孵育。

次日，回收一抗并用 1 $\times$  TBST 洗涤 NC 膜 3 次，每次 10min。随后加入由 5%脱脂牛奶稀释的对应二抗，在摇床上室温孵育 1h。完成后弃去二抗，用 1 $\times$  TBST 洗涤 NC 膜 3 次，每次 10min。完成后将 NC 膜放置在化学发光成像仪内，滴加 ECL 显色液并进行拍照。

# 三、研究结果

## 3.1 海藻糖对各基因敲低导致的 NTDs 的表型挽救效果

### 3.1.1 *Grhl3*

*Grhl3* (grainyhead-like transcription factor 3) 是一种转录因子，能与特定 DNA 序列结合并参与 RNA 聚合酶 II 的转录调控，在脊索动物的胚胎发育、外包 (epiboly)、面部形态发生等过程中发挥作用。*Grhl3* 在神经管闭合的过程中是必需的，尽管其机制尚不清楚，可能在后肠内胚层的细胞增殖中具有直接调节功能。*Grhl3* 突变会抑制后肠的细胞增殖，导致胚胎腹背两侧组织生长不平衡，造成尾区腹侧弯曲过大，从而抑制后神经孔闭合，最终导致卷尾 (curly tail) 畸形或脊柱裂 (图 7) [20]。在小鼠模型中，由 *Grhl3* 缺陷导致的 NTDs 不能被叶酸或肌醇挽救 [21]。

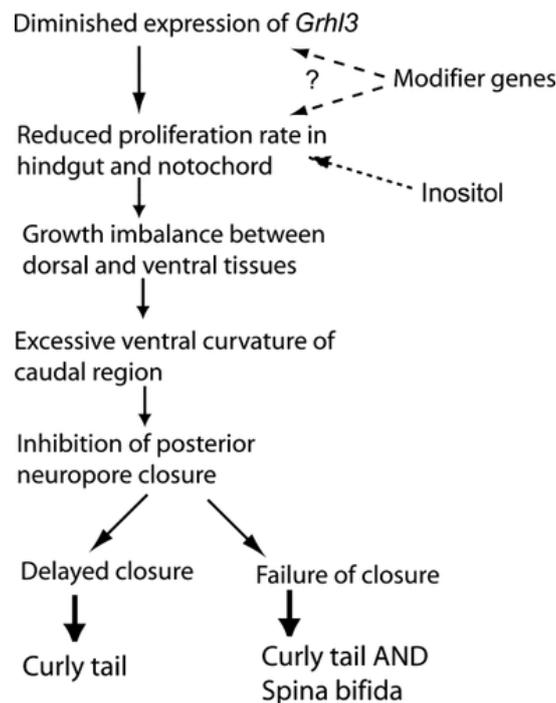


图 7. *Grhl3* 表达水平降低导致神经管畸形 [20]

经过 *Grhl3*-MO 处理后，3dpf 的斑马鱼胚胎与对照组相比畸形个体的比例极显著上升，主要表现为 Normal 类型的减少和 Mild 类型的增多 (图 8.c)。而经过海藻糖挽救后，胚胎畸形个体比例与未经挽救的 *Grhl3*-MO 敲低胚胎相比呈现下降趋势，存在极显著的统计学差异，主要表现为 Normal 类型的增多，而 Moderate 和 Severe 类型的比例则下降至与对照组较为相似的水平 (图 8)。

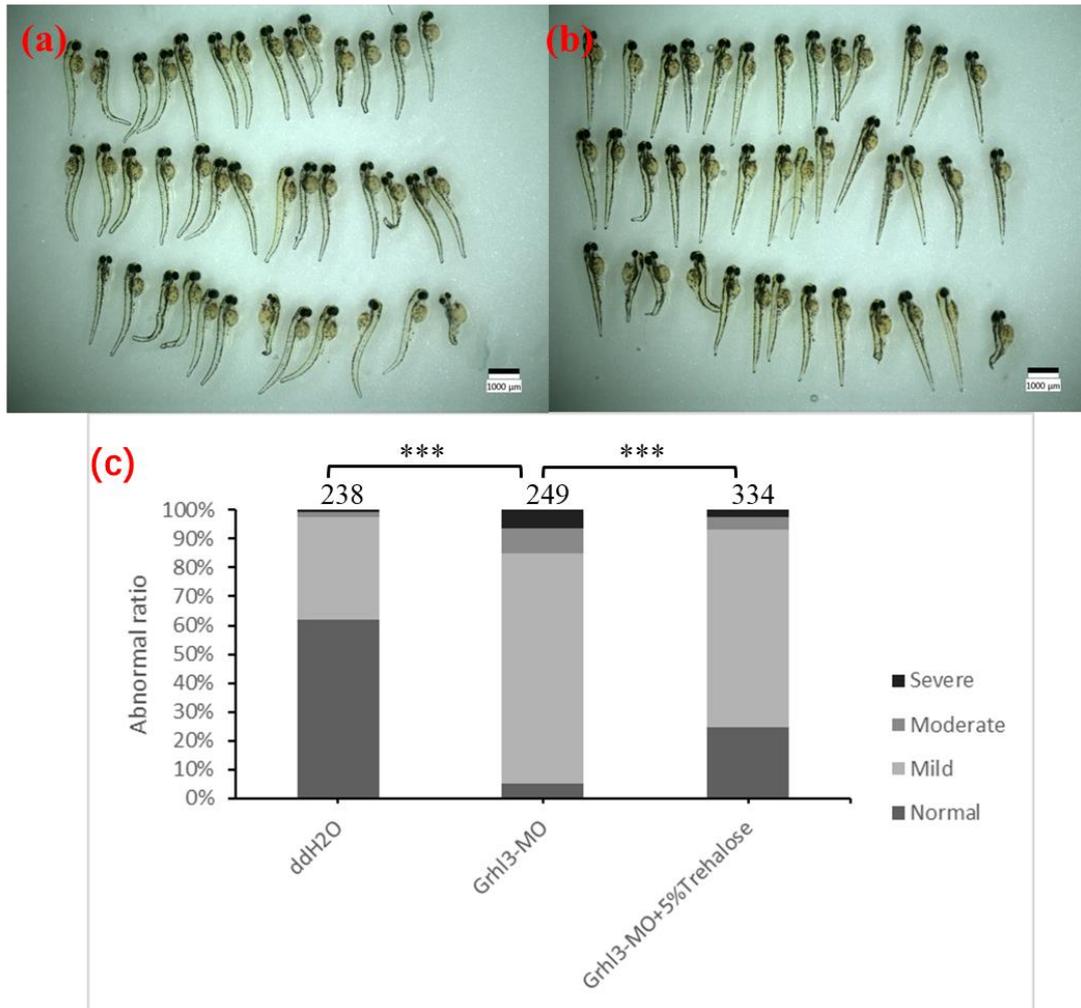


图 8. 海藻糖对 *Grhl3*-MO 敲低导致的 NTDs 表型的挽救效应

(a) 经 *Grhl3*-MO 处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(b) 经 *Grhl3*-MO 处理及海藻糖挽救后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(c) 经过不同处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后神经管异常的比例分布图；ddH<sub>2</sub>O 组为注射 ddH<sub>2</sub>O 的对照组；ddH<sub>2</sub>O 组与 *Grhl3*-MO 组的卡方检验  $\chi^2=180.278$ ,  $p<0.001$  (以\*\*\*表示)；*Grhl3*-MO 组与 *Grhl3*-MO+5%Trehalose 组的卡方检验  $\chi^2=44.437$ ,  $p<0.001$

### 3.1.2 *Wnt5a*

*Wnt5a* (wingless-type MMTV integration site family, member 5a)是一种分泌蛋白，作用于 Wnt/PCP 通路（一种非经典 Wnt 信号通路）的上游，是该通路中的重要配体，能够与 Frizzled (Fz) 受体蛋白结合并活化该信号通路（图 9）。PCP 信号通路与细胞骨架的运动有关，主要调控细胞的极性和定向运动<sup>[23]</sup>。*Wnt5a* 缺陷与 Robinow 综合征等疾病相关。在胚胎发育过程中，*Wnt5a* 是原肠作用后期后中内胚层（posterior mesendodermal region）和外胚层区域的细胞伸长和 CE 运动所必需的，其缺失会导致胚胎发育异常从而导致新生儿的死亡<sup>[24]</sup>。*Foxy-5* 是

Wnt5a 的激动剂，能够通过上调 Dishevelled 蛋白和下游 RhoA-ROCK 信号传导激活非经典 Wnt 信号通路，从而调节细胞骨架的运动<sup>[25]</sup>，目前主要应用于与乳腺癌相关的研究。但是在出生缺陷领域，目前还没有任何能够挽救由 *Wnt5a* 缺陷导致的 NTDs 的药物或补充剂被发现。

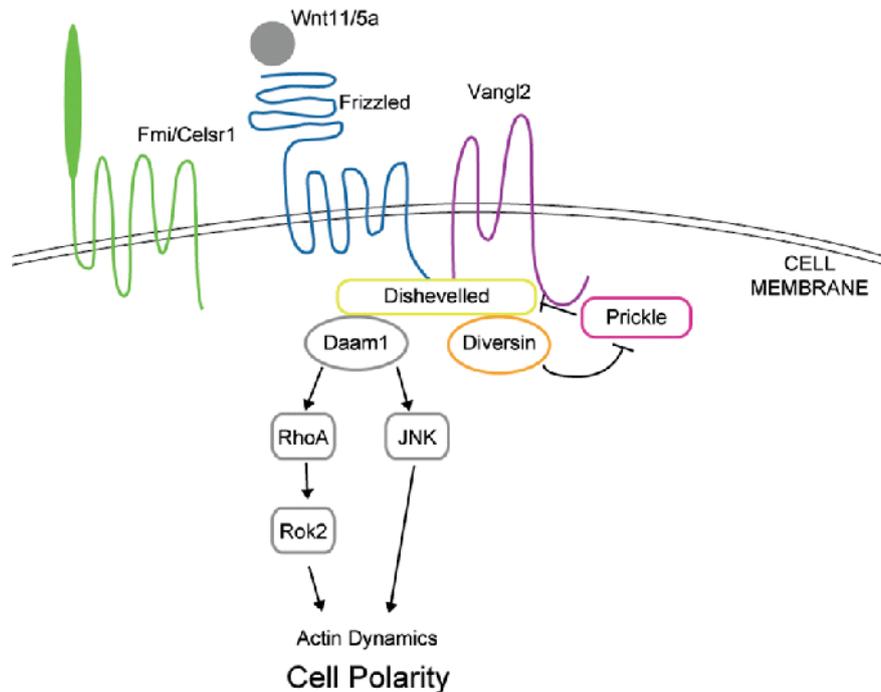


图 9. Vangl2、Wnt5a 蛋白及 PCP 信号通路模式图<sup>[22]</sup>

经过 *Wnt5a*-MO 处理后，3dpf 的斑马鱼胚胎与对照组相比畸形个体的比例呈现上升趋势，且具有极显著的统计学差异，主要表现为 Normal 类型的减少和 Moderate 类型的增多（图 10.c）。而经过海藻糖挽救后，胚胎畸形个体比例与未经挽救的 *Wnt5a*-MO 敲低胚胎相比呈现极显著的下降趋势，主要表现为 Normal 类型的增多，但 Moderate 类型与对照组相比仍然较高（图 10）。

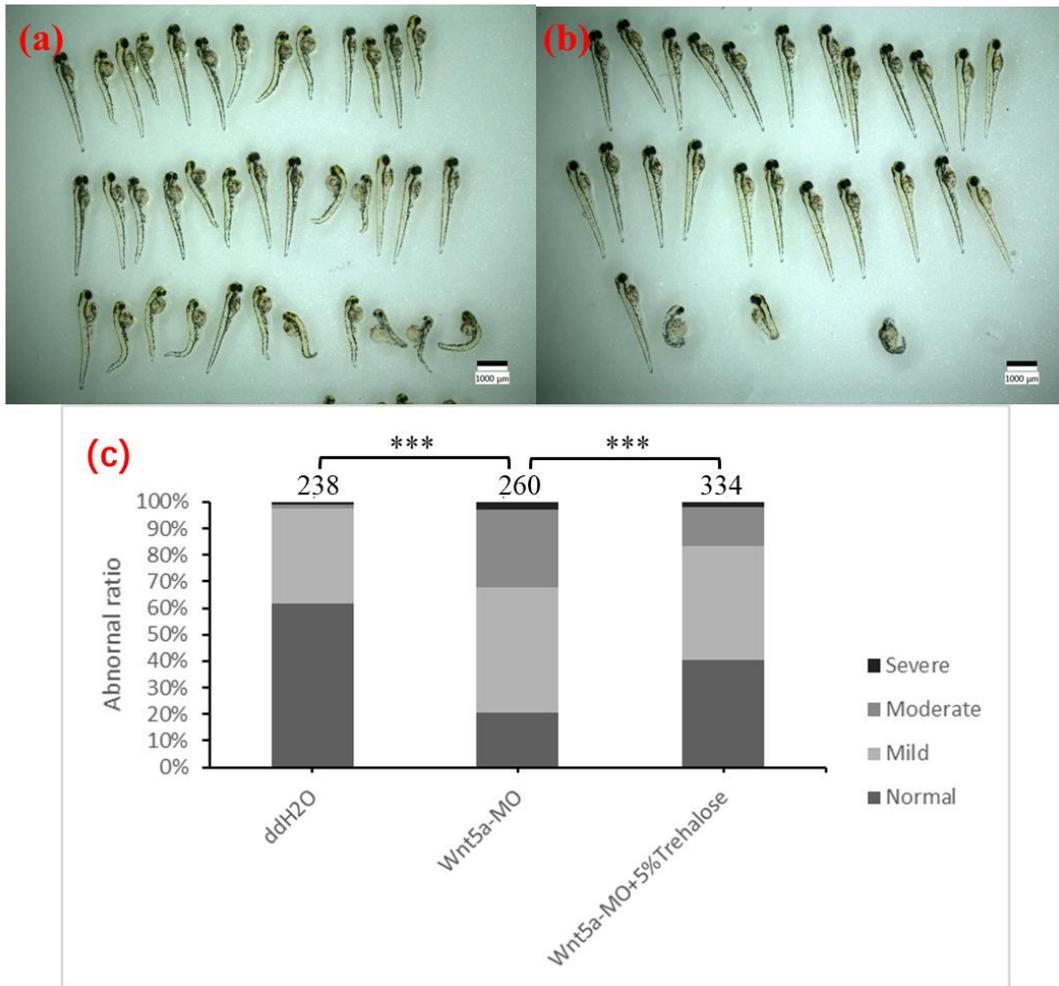


图 10. 海藻糖对 *Wnt5a*-MO 敲低导致的 NTDs 表型的挽救效应

(a) 经 *Wnt5a*-MO 处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(b) 经 *Wnt5a*-MO 处理及海藻糖挽救后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(c) 经过不同处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后神经管异常的比例分布图；ddH<sub>2</sub>O 组为注射 ddH<sub>2</sub>O 的对照组；ddH<sub>2</sub>O 组与 *Wnt5a*-MO 组的卡方检验  $\chi^2=118.782$ ,  $p<0.001$  (以\*\*\*表示)；*Wnt5a*-MO 组与 *Wnt5a*-MO+5%Trehalose 组的卡方检验  $\chi^2=34.857$ ,  $p<0.001$

### 3.1.3 *Wnt3a*

*Wnt3a* (wingless-type MMTV integration site family, member 3A)也是一种分泌蛋白，是经典 Wnt 信号通路 (Wnt/ $\beta$ -catenin 通路) 的主要配体，与细胞膜上的 LRP5/6 等受体结合后能抑制轴蛋白 (Axin) 的活性，从而解除轴蛋白对  $\beta$ -catenin 的抑制作用，使细胞内  $\beta$ -catenin 浓度上升并进入细胞核内。进入细胞核后， $\beta$ -catenin 能激活 Cyclin D1 等基因，对细胞的增殖、分化、迁移等行为产生调控作用 (图 11) [26]。*Wnt3a* 与脊索动物胚胎发育、肛后尾形态发生、丘脑发育等过程相关。此外，*Wnt3a* 在背部神经管中高度表达，与神经嵴的形成相关。当 *Wnt3a*

的活性受到抑制时，胚胎的神经嵴形成过程会受到抑制，因此 *Wnt3a* 在神经管的形成过程中同样也是必不可少的<sup>[27]</sup>。与 *Wnt5a* 一样，目前尚未有研究发现任何能够挽救由 *Wnt3a* 缺陷导致的 NTDs 的药物或补充剂。

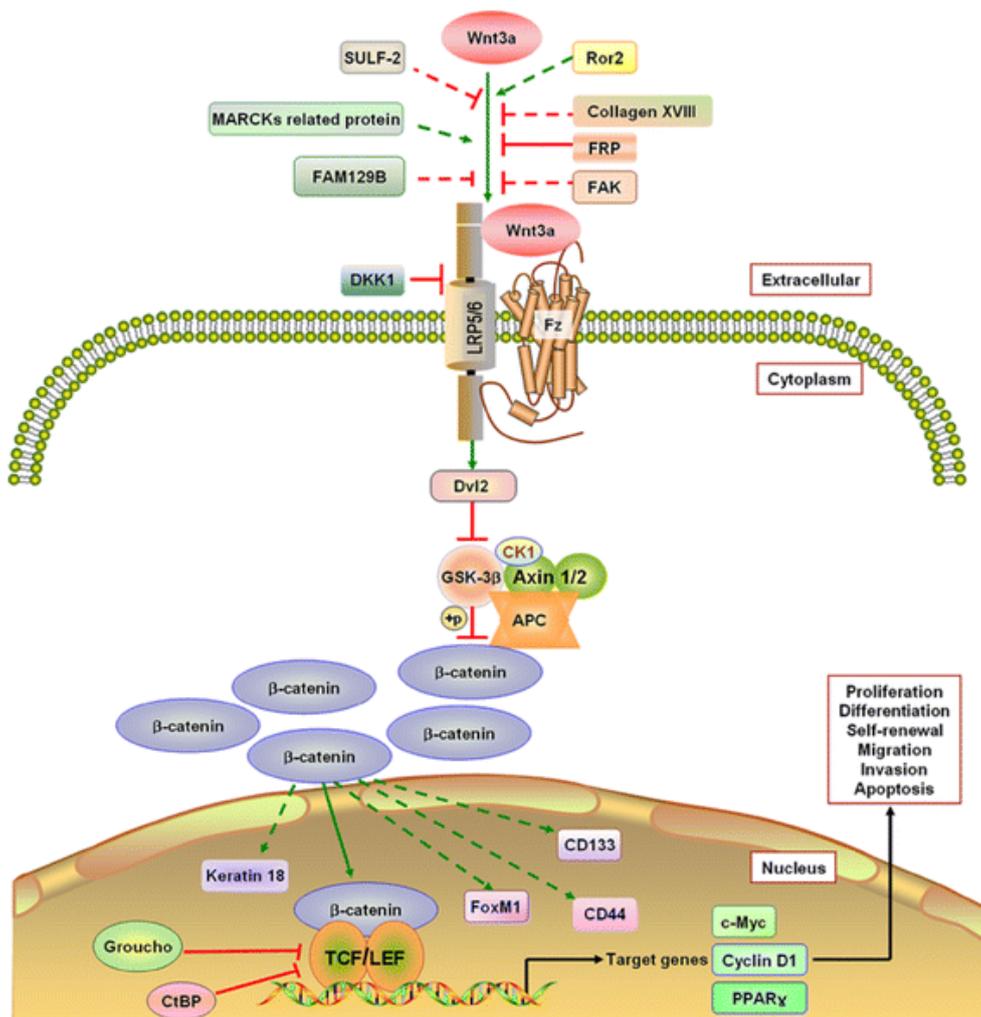


图 11. *Wnt3a* 蛋白及 *wnt/β-catenin* 信号通路模式图<sup>[26]</sup>

经过 *Wnt3a*-MO 处理后，3dpf 的斑马鱼胚胎与对照组相比畸形个体的比例呈现极显著的上升趋势，主要表现为 Normal 类型的减少和 Moderate、Severe 类型的增多（图 12.c）。而经过海藻糖挽救后，胚胎畸形个体比例与未经挽救的 *Wnt3a*-MO 敲低胚胎相比呈现极显著的下降趋势，主要表现为 Mild 类型的增多以及 Severe 类型的减少，尽管 Normal 类型的比例出现了微小幅度的下降（图 12）。

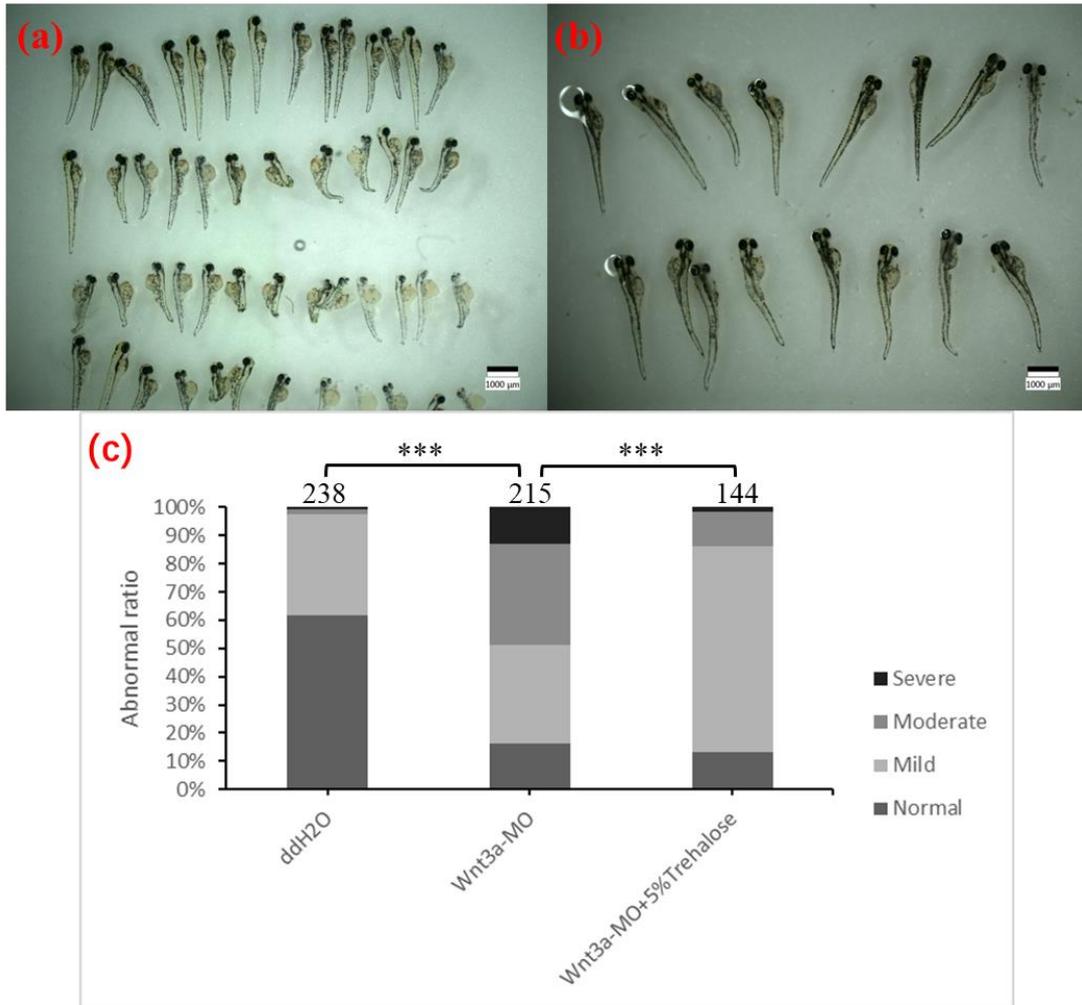


图 12. 海藻糖对 *Wnt3a*-MO 敲低导致的 NTDs 表型的挽救效应

(a) 经 *Wnt3a*-MO 处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(b) 经 *Wnt3a*-MO 处理及海藻糖挽救后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(c) 经过不同处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后神经管异常的比例分布图；ddH<sub>2</sub>O 组为注射 ddH<sub>2</sub>O 的对照组；ddH<sub>2</sub>O 组与 *Wnt3a*-MO 组的卡方检验  $\chi^2=157.109$ ,  $p<0.001$  (以\*\*\*表示)；*Wnt3a*-MO 组与 *Wnt3a*-MO+5%Trehalose 组的卡方检验  $\chi^2=57.108$ ,  $p<0.001$

### 3.1.4 *Vangl2*

*Vangl2* (VANGL planar cell polarity protein 2) 是一种四次跨膜的细胞表面受体蛋白，也是 PCP 信号通路的重要组成部分（图 9）。在胚胎发育的过程中，神经管的完全闭合需要神经板顶端的收缩与会聚伸展（convergent extension, CE）相互协调，而这两者都直接受到 WNT/PCP 通路的调节。*Vangl2* 缺陷与 NTDs 直接相关，其表达不足会使得 CE 运动受阻，造成胚胎发育过程中神经板边缘隆起形成神经褶并最终形成神经管的过程受阻，从而导致小鼠颅脊柱裂等严重的 NTDs 表型<sup>[28]</sup>。此外，*Vangl2* 还会与 PCP 信号通路其他基因<sup>[29]</sup>以及某些环境因

素<sup>[30]</sup>互作导致 NTDs 表型。在小鼠模型中，由 *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> 突变以及糖胺聚糖的硫酸化程度降低共同导致的 NTDs 能通过补服外源性硫酸盐进行挽救<sup>[30]</sup>。

经过 *Vangl2*-MO 处理后，3dpf 的斑马鱼胚胎与对照组相比畸形个体的比例呈现出极显著的上升趋势,主要表现为 Normal 类型的减少和 Moderate、Severe 类型的增多（图 13.c）。而经过海藻糖挽救后，胚胎畸形个体比例与未经挽救的 *Vangl2*-MO 敲低胚胎相比继续上升，且存在统计学差异（图 13）。这说明海藻糖不仅不能够挽救 *Vangl2*-MO 引起的发育畸形，反而有进一步加重的趋势。

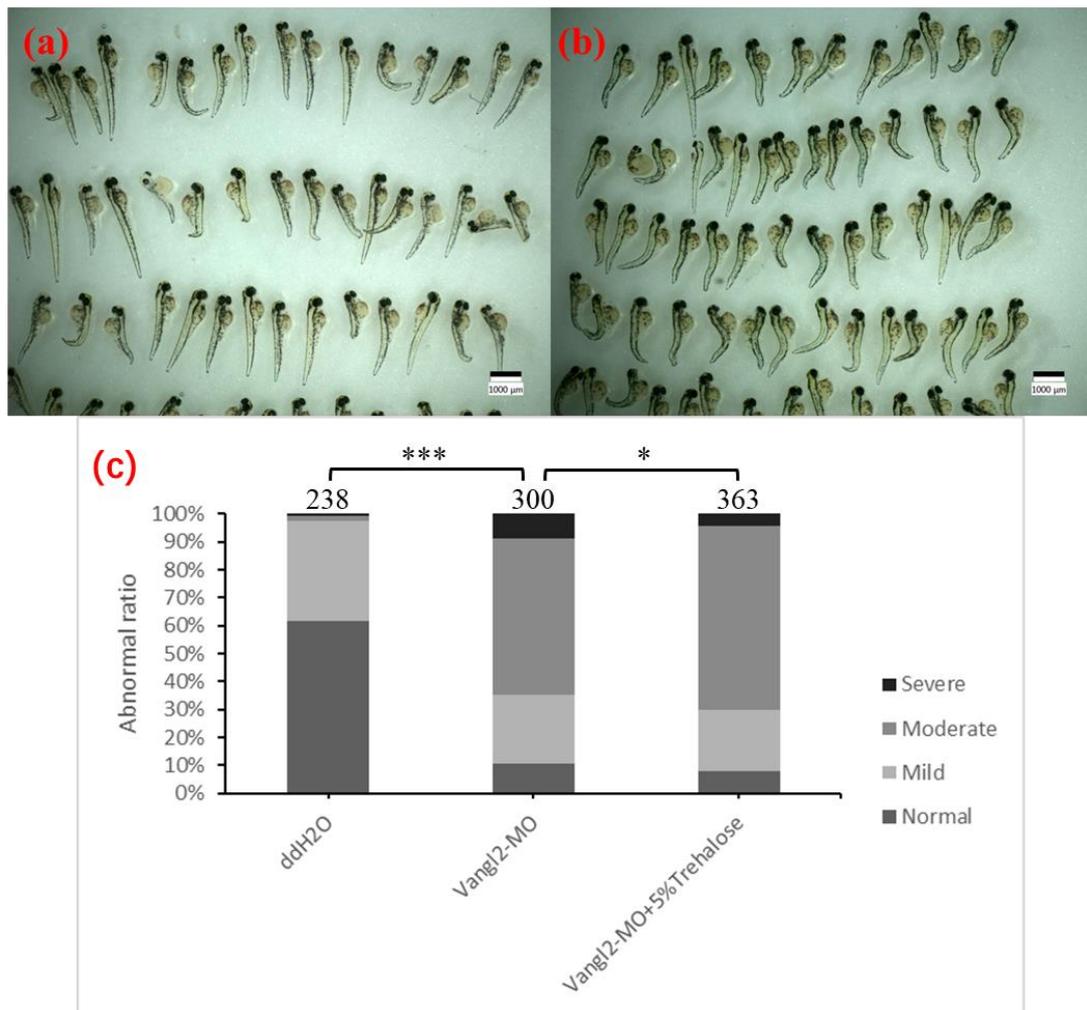
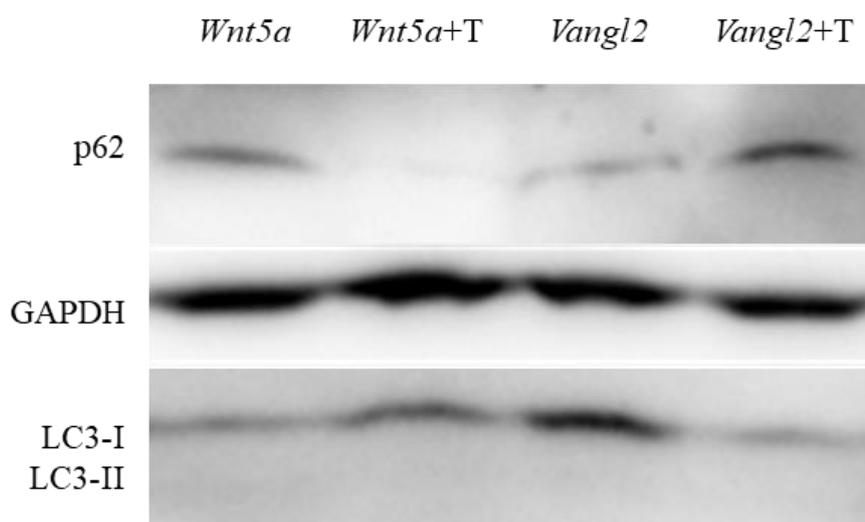


图 13. 海藻糖对 *Vangl2*-MO 敲低导致的 NTDs 表型的挽救效应

(a) 经 *Vangl2*-MO 处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(b) 经 *Vangl2*-MO 处理及海藻糖挽救后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后的 NTDs 表型；(c) 经过不同处理后的斑马鱼胚胎在 3dpf 后神经管异常的比例分布图；ddH<sub>2</sub>O 组为注射 ddH<sub>2</sub>O 的对照组；ddH<sub>2</sub>O 组与 *Vangl2*-MO 组的卡方检验  $\chi^2=248.878$ ,  $p<0.001$ （以\*\*\*表示）；*Vangl2*-MO 组与 *Vangl2*-MO+5%Trehalose 组的卡方检验  $\chi^2=9.666$ ,  $p=0.022$ （以\*表示  $p<0.05$ ）

### 3.2 海藻糖对 *Wnt5a* 和 *Vangl2* 敲低胚胎的自噬水平重建效果

由于实验进度的原因，目前仅在 *Wnt5a* 和 *Vangl2* 基因的 MO 敲降胚胎及海藻糖挽救胚胎中得到了初步的自噬水平分析结果，还需要进一步优化条件和增加重复次数。在 *Wnt5a* 基因敲降的胚胎中，海藻糖能够降低 p62 的表达水平，表明自噬水平得到提高，与表型分析的结果相符；而对于 *Vangl2* 基因敲降的胚胎，海藻糖则增强了 p62 的表达水平，说明自噬水平进一步受损，同样与表型分析的结果相符。但是对于 LC3-I 和 LC3-II 的表达水平，在以上两种基因的敲降胚胎中均未观察到海藻糖的明显作用（图 14）。



**图 14. 海藻糖对 *Wnt5a*-MO 和 *Vangl2*-MO 敲低胚胎中自噬水平的挽救效应**

图中左侧文字代表相应条带（蛋白）的名称，上方文字则表示组别。其中 *Wnt5a* 和 *Vangl2* 分别表示经过对应的 MO 处理后从 3dpf 胚胎中提取的样本；*Wnt5a+T* 和 *Vangl2+T* 则分别表示经过对应的 MO 处理及海藻糖挽救后从 3dpf 胚胎中提取的样本

## 四、讨论

本研究涉及的基因包括 4 种重要的信号通路基因 *Vangl2*、*Grhl3*、*Wnt3a* 和 *Wnt5a*。通过表型分析，我们发现对于这四种基因，相应的 MO 敲降均会导致斑马鱼胚胎发生一定比例的发育畸形，而通过在相应的敲降胚胎中同时注射 5% 的海藻糖溶液能够有效地挽救由 *Grhl3*、*Wnt3a* 以及 *Wnt5a* 敲低导致的发育畸形表型，与预期基本相符。但是对于 *Vangl2* 敲降胚胎，5% 的海藻糖溶液反而进一步加剧了发育畸形表型，与预期不符。

海藻糖作为一种自噬激活剂，我们在前期研究中观察到其对由自噬相关基因 *Ambra1* 敲低导致的 NTDs 的挽救作用是比较容易理解的。但是在本研究中，我们发现对于与自噬和凋亡没有直接相关性的重要信号通路基因，海藻糖的作用表现出了明显的差异。对于转录因子 *Grhl3* 和分泌蛋白 *Wnt5a*、*Wnt3a*，海藻糖同样能够挽救由它们表达水平降低导致的 NTDs 表型，并且从初步实验中也可以看到海藻糖使细胞中的 p62 表达降低，表明自噬水平发生了上升。但是在 Wnt/PCP 信号途径中重要的膜表面受体蛋白 *Vangl2* 敲降胚胎中得到的实验结果与预期相反，海藻糖不仅没能挽救 *Vangl2* 敲低引起的发育畸形，反而进一步加剧了 NTDs 表型。而且从初步试验中看到 p62 的表达也呈现增加的情况，提示自噬水平不升反降，与海藻糖的自噬激活剂的功能相悖。因此该实验结果需要进一步的重复验证，相关的机制也还需要深入的研究。

实际上，尽管本研究中涉及的 4 个基因都不直接参与细胞自噬的过程，但自噬作用并不是孤立的，而是与很多其他的信号通路存在复杂多样的相互作用关系的。相关文献表明，在本研究涉及的 4 个基因中，*Vangl2*、*Wnt3a* 和 *Wnt5a* 三者都与细胞自噬过程存在一定的相互作用。

*Wnt5a* 蛋白所属的 PCP 信号通路与细胞骨架的运动有关<sup>[23]</sup>，而细胞骨架，特别是肌动蛋白，在自噬体的形成和成熟的过程中是必不可少的。在自噬体形成的初始阶段，肌动蛋白能促进自噬体前膜的形成和发育以及参与调节 ULK 复合物的活性。而在自噬溶酶体的形成过程中，肌动蛋白则起到了促进自噬体与溶酶体融合的作用<sup>[31]</sup>。Suborno Jati 等人的研究发现，*Wnt5a* 能诱导 *Rac1/Disheveled* 的激活以及肌动蛋白组装，从而导致 ULK1 激酶活性的提高以

及自噬标志物 LC3BII 的积累<sup>[32]</sup>。因此在我们的研究中，海藻糖可能既能直接激活自噬作用，又能通过提高 *Wnt5a* 蛋白的稳定性的方式弥补 *Wnt5a* 表达水平的降低以及间接提高 *Wnt5a* 敲降胚胎中的自噬水平，从而对 NTDs 的表型起到挽救的效果。

而 *Vangl2* 蛋白虽然同属 PCP 信号通路，但是已有研究表明它能够参与除 PCP 信号通路以外的过程。Yan Gong 等人的研究发现，*Vangl2* 能直接与溶酶体相关膜蛋白 2A (LAMP-2A) 结合并将其靶向降解，从而降低溶酶体数量，调控间充质干细胞的分化<sup>[33]</sup>。因此在我们的研究中，海藻糖虽然理论上能够直接上调 *Vangl2* 敲降胚胎中的自噬水平以及提高 *Vangl2* 蛋白的稳定性来改善 NTDs 表型，但 *Vangl2* 蛋白稳定性的上升可能会反过来对敲降胚胎中的自噬水平产生更强的抑制作用，从而在整体上下调自噬水平并使 NTDs 表型进一步加重。

*Wnt3a* 蛋白及其所属的经典 Wnt 信号通路同样与细胞自噬存在相互作用。Kai Gao 等人的研究在大鼠模型中发现，当脊髓发生损伤时，*Wnt3a* 能与膜受体 LRP5/6 结合并将其磷酸化，从而通过  $\beta$ -catenin 的方式抑制 mTOR 的活性，使神经细胞中的自噬水平上升，从而抑制神经细胞凋亡并促进脊髓的损伤后修复<sup>[34]</sup>。因此在本研究中，海藻糖对于 *Wnt3a* 敲降胚胎的作用可能与 *Wnt5a* 敲降胚胎类似，同时通过增强 *Wnt3a* 蛋白的稳定性以及直接与间接重建自噬水平的方式挽救 NTDs 表型。

由于受疫情影响导致实验进度中途停止的原因，目前仅在 *Wnt5a* 和 *Vangl2* 基因的 MO 敲降胚胎及海藻糖挽救胚胎中进行了初步的自噬水平分析，且结果的质量不高、缺少重复实验，因此该实验还值得进一步的优化与重复验证。同时海藻糖在 *Wnt3a* 以及 *Grhl3* 敲降胚胎中是否也能起到重建自噬水平也值得通过实验进行证明。此外，本研究沿用了课题组前期研究中从自噬水平的重建出发来分析海藻糖挽救 NTDs 表型的机制，发现海藻糖同样能在这些与自噬不直接相关的基因中提高自噬水平。但是实际上，由于这些基因的敲降可能并不会直接导致自噬水平明显受损，因此海藻糖调节蛋白的分布与稳定性的效应可能在这些胚胎中发挥着更重要的作用，需要进一步开展相关实验进行研究。

总之，我们的研究结果表明海藻糖具有预防由 *Grhl3*、*Wnt5a* 以及 *Wnt3a* 基因缺陷导致的神经管畸形的潜在可行，但是对由 *Vangl2* 缺陷导致的 NTDs 却反而起到了降低自噬水平并加剧症状的效果。在接下来的研究中，海藻糖预防 NTDs 的机制还值得从多个方面进一步探索，包括蛋白的分布与稳定性、细胞凋亡等。此外，还可以进一步在小鼠或者更高级的模式动物中研究海藻糖对于这几种基因缺陷导致的 NTDs 的防治作用，从而为海藻糖的临床应用铺平道路。

## 参考文献

1. Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects[J]. *Clinical Genetics*, 2007,71(4):295-310.
2. Harris MJ, Juriloff DM. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects[J]. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2007,79(3):187-210.
3. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure[J]. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2010,88(8):653-669.
4. Mardones P, Rubinsztein DC, Hetz C. Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport[J]. *Sci Signal*, 2016;9(416):fs2.
5. Hosseinpour Moghaddam K, Caraglia M, Sahebkar A. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts[J]. *Journal of cellular physiology*, 2018,233(9):6524-6543.
6. Ye J, Tong Y, Lv J, et al. Rare mutations in the autophagy - regulating gene *AMBRA1* contribute to human neural tube defects[J]. *Human Mutation*, 2020,41(8):1383-1393.
7. Xu C, Li X, Wang F, et al. Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2013,305(5):E667-E678.
8. Greene, Nicholas & Copp, Andrew. Development of the vertebrate central nervous system: Formation of the neural tube[J]. *Prenatal diagnosis*, 2009,29(4):303-11.
9. Kawachi, T., Tadokoro, R., and \*Takahashi, Y.: Cell lineage, self-renewal, and epithelial-to-mesenchymal transition during secondary neurulation[J]. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 2021,64(3):367-373.
10. Wang, F., Xu, C., Reece, E. et al. Protein kinase C-alpha suppresses autophagy and induces neural tube defects via miR-129-2 in diabetic pregnancy[J]. *Nat Commun*, 2017,8:15182.
11. Wang L, Lin S, Yi D, Huang Y, Wang C, Jin L, Liu J, Zhang Y, Ren A. Apoptosis, Expression of PAX3 and P53, and Caspase Signal in Fetuses with Neural Tube Defects[J]. *Birth Defects Res*, 2017,109(19):1596-1604.
12. Ruzza, Paolo & Hussain, Rohanah & Biondi, Barbara & Calderan, Andrea & Tessari, Isabella & Bubacco, Luigi & Siligardi, Giuliano. Effects of Trehalose on Thermodynamic Properties of Alpha-synuclein Revealed through Synchrotron Radiation Circular Dichroism[J]. *Biomolecules*, 2015,5:724-34.
13. Essien FB. Maternal methionine supplementation promotes the remediation of axial defects in *Axd* mouse neural tube mutants[J]. *Teratology*, 1992,45: 205–212.
14. Greene ND, Copp AJ. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse[J]. *Nat Med*, 1997,3: 60–66.
15. Cogram P, Tesh S, Tesh J, et al. D-chiro-inositol is more effective than myo-inositol in preventing folate-resistant mouse neural tube defects[J]. *Hum Reprod*, 2002,17:

- 2451–2458.
16. Harris, M. & Juriloff, Diana. Maternal diet alters exencephaly frequency in SELH/Bc strain mouse embryos[J]. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 2005,73. 532-40.
  17. Kim J, Lei Y, Guo J, et al. Formate rescues neural tube defects caused by mutations in *Slc25a32*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018,115(18):4690-4695.
  18. Lucero P, Peñalver E, Moreno E, Lagunas R. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000,66(10):4456-4461.
  19. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek AP, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. *Food Chem Toxicol*, 2002,40(7):871-98.
  20. Gustavsson P, Copp AJ, Greene ND. Grainyhead genes and mammalian neural tube closure[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2008,82(10):728-35.
  21. Ting, S., Wilanowski, T., Auden, A. et al. Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor *Grhl-3*[J]. *Nat Med*, 2003,9:1513–1519.
  22. Huang, Shihhui & Hirota, Yuki & Sawamoto, Kazunobu. Various facets of vertebrate cilia: Motility, signaling, and role in adult neurogenesis[J]. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 2009,85. 324-36.
  23. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG. *Wnt5a* control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors[J]. *Science*, 2008,320(5874):365-369.
  24. Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, Ulrich F, Tada M, Heisenberg CP. The role of *Ppt/Wnt5* in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation[J]. *Mech Dev*, 2003,120(4):467-76.
  25. Li R, Lin S, Zhu M, Deng Y, Chen X, Wei K, Xu J, Li G, Bian L. Synthetic presentation of noncanonical *Wnt5a* motif promotes mechanosensing-dependent differentiation of stem cells and regeneration[J]. *Sci Adv*, 2019,5(10):eaaw3896.
  26. He, Sha & Lu, Yi & Liu, Xia & Huang, Xin & Keller, Evan & Qian, Chao-Nan & Zhang, Jian. *Wnt3a*: functions and implications in cancer[J]. *Chinese journal of cancer*, 2015, 34(3):50
  27. 李云飞, 管英俊, 于丽. *Wnt* 信号通路与神经管缺陷关系的研究进展[J]. *神经解剖学杂志*, 2009, 25(2):3.
  28. Torban, Elena & Kor, Christine & Gros, Philippe. *Van Gogh-like2* (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates[J]. *Trends in genetics*, 2004,TIG. 20. 570-7.
  29. 王娟, 杨雪艳, 王红艳,等. *Vangl2* 及其相关基因与神经管畸形的关系[J]. *生命的化学*, 2010, (5):4.
  30. Nychyk O, Galea GL, Molè M, Savery D, Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. *Vangl2*-environment interaction causes severe neural tube defects, without abnormal neuroepithelial convergent extension[J]. *Dis Model Mech*, 2022,15(1):dmm049194.

31. Coutts AS, La Thangue NB. Regulation of actin nucleation and autophagosome formation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016,73(17):3249-3263.
32. Jati S, Kundu S, Chakraborty A, Mahata SK, Nizet V, Sen M. Wnt5A Signaling Promotes Defense Against Bacterial Pathogens by Activating a Host Autophagy Circuit[J]. *Front Immunol*, 2018,9:679.
33. Gong Y, Li Z, Zou S, Deng D, Lai P, Hu H, Yao Y, Hu L, Zhang S, Li K, Wei T, Zhao X, Xiao G, Chen Z, Jiang Y, Bai X, Zou Z. Vangl2 limits chaperone-mediated autophagy to balance osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Dev Cell*, 2021,26;56(14):2103-2120.e9.
34. Gao K, Niu J, Dang X. Wnt-3a improves functional recovery through autophagy activation via inhibiting the mTOR signaling pathway after spinal cord injury[J]. *Neurosci Lett*, 2020,737:135305.

# 致谢

感谢导师杨雪艳对本项目的全程指导。在刚进入课题组时，我对显微注射操作几乎一无所知。但是在杨老师的耐心教导下，我逐渐熟悉了显微注射的各项步骤，最终能够独立地开展实验。当我在实验中遇到难以理解的概念或无法独立解决的实际问题时，杨老师也总是能及时帮助我解决问题或者提供思路。衷心感谢杨老师对我的毕业论文的全程指导！

感谢课题组的研究生陈淑霞师姐、刘晨楠师兄对我在实验中所提供的各方面的帮助。在进入课题组之前，我除了在实验课中以外没有做过 Western Blot 实验。因此在正式开展我的实验之前，陈师姐和刘师兄对该实验的完整流程与操作要点进行了详细的教学，从蛋白质的提取到凝胶的制备，再到电泳、转膜、封闭，一直到最后的抗体孵育及显影。在实验遇到困难，例如未出现目标条带或各条带左右相连无法分辨时，我也是根据两位师兄师姐的建议对实验条件进行了优化。总之，非常感谢他们在繁忙的学业与科研中抽出时间为我提供指导与帮助！

此外，生命科学学院 2018 级本科生马靖超同学和我共同参与该课题，负责对其它两个基因 *Ambra1*、*Casp3a* 敲降的胚胎的研究。生命科学学院 2018 级本科生李霖同学也在项目的前期参与了部分实验。除了完成各自的实验任务外，我们还多次对实验方案、实验结果进行了交流讨论。因此，两位同学对我的毕业设计所做出的贡献同样值得感谢！

我的毕业设计的一部分还受到了曦源项目的支持，因此感谢曦源项目以及 AIBS II 课程的全体老师与负责人对本项目提供的经费支持以及宝贵的指导和意见！

最后，感谢我在大学四年所遇到的每一位老师与同学！在你们的陪伴下，  
我度过了充实而快乐的大学四年！