

壳寡糖通过抑制cGAS-STING通路缓解母体糖尿病诱导的胚胎神经管畸形

王冰斌¹ 周美¹ 陈然¹ 聂赛群¹ 方丽¹ 张冰艳¹ 张雯婷¹ 吴文俊² 吴艳青^{1*}
(¹温州大学生命与环境科学学院-生命科学研究院,温州 325035; ²温州医科大学附属第一医院内分泌科,温州 325035)

摘要 母体糖尿病显著介导胚胎神经管畸形(neural tube defects, NTDs),但其调控机制和治疗策略仍不清楚。该研究运用链脲佐菌素构建糖尿病雌鼠模型,并在此基础上进一步构建胚胎神经管畸形模型以探究壳寡糖(chitosan oligosaccharides, COSs)对NTDs的作用及其调控机制。首先,该研究收集了E10.5天的胚胎组织,用体视解剖显微镜和HE染色观察分析各组的胚胎神经管闭合情况。结果显示, COSs干预处理可显著减少母体糖尿病诱导的胚胎NTDs发生。其次,该研究进一步收集E8.5天胚胎,通过免疫荧光染色检测胚胎组织中cleaved Caspase-1和NLRP3的表达水平,发现COSs给药可有效抑制糖尿病引发的胚胎神经上皮细胞焦亡。最后,通过对环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)、干扰素刺激基因(stimulator of interferon gene, STING)和干扰素- β 1(interferon- β 1, IFN- β 1)的蛋白免疫印迹和免疫荧光染色分析发现, COSs干预显著抑制了由母体糖尿病引起的cGAS-STING信号通路异常激活和炎症因子表达水平增加。该研究表明COSs通过抑制cGAS-STING通路缓解神经上皮细胞焦亡,从而抑制母体糖尿病诱导的胚胎NTDs发生。

关键词 神经管畸形; 母体糖尿病; 细胞焦亡; cGAS-STING通路; 壳寡糖

Chitosan Oligosaccharides Alleviates Maternal Diabetes-Induced Embryonic Neural Tube Defects through Inhibiting the cGAS-STING Pathway

WANG Bingbin¹, ZHOU Mei¹, CHEN Ran¹, NIE Saiqun¹, FANG Li¹, ZHANG Bingyan¹,
ZHANG Wenting¹, WU Wenjun², WU Yanqing^{1*}

(¹Institute of Life Sciences, College of Life and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China;

²Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Maternal diabetes significantly mediates embryonic NTDs (neural tube defects), but the underlying regulatory mechanisms and therapeutic strategies remain unclear. In this study, a diabetic female mouse model was established using streptozotocin, and on this basis, a embryonic NTDs model was further generated to explore the role and regulatory mechanism of COSs (chitosan oligosaccharides) for the occurrence of embryonic NTDs. Firstly, embryonic tissues were collected at E10.5, and the closure of the embryonic neural tube was examined using stereomicroscope and HE staining. The results demonstrated that COSs intervention significantly reduced the incidence of maternal diabetes-induced embryonic NTDs. Moreover, immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of cleaved Caspase-1 and NLRP3 in embryonic tissues at E8.5. COSs intervention was

收稿日期: 2025-11-04

接受日期: 2025-12-25

国家自然科学基金(批准号: 82571576、82272254)、浙江省自然科学基金(批准号: LTGD24H090005)和温州市基础性科研项目(批准号: Y20220060)资助的课题

*通信作者。Tel: 0577-86591683, E-mail: yqwu220946@yeah.net

Received: November 4, 2025

Accepted: December 25, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82571576, 82272254), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LTGD24H090005) and the Basic Scientific Research Project of Wenzhou (Grant No.Y20220060)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86591683, E-mail: yqwu220946@yeah.net

found to effectively suppress the pyroptosis of embryonic neuroepithelial cells caused by maternal diabetes. Finally, Western blot and immunofluorescence staining were used to detect the expression levels of cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), STING (stimulator of interferon gene), and IFN- β 1 (interferon- β 1). It was found that the aberrant activation of the cGAS-STING signaling pathway and the elevated levels of inflammatory cytokines induced by maternal diabetes were significantly alleviated by COSs intervention. This study indicates that COSs alleviate pyroptosis in neuroepithelial cells by inhibiting the cGAS-STING pathway, thus reducing the incidence of maternal diabetes-induced NTDs.

Keywords neural tube defects; maternal diabetes; pyroptosis; cGAS-STING pathway; chitosan oligosaccharides

神经管是中枢神经系统(central nervous system, CNS)的始基,对于CNS发育至关重要。胚胎神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是在胚胎发育第3~4周时由神经管闭合缺陷导致的。由NTDs导致的出生畸形是常见且病情严重的先天性异常,其中部分NTDs类型,如颅裂症和无脑畸形等,在妊娠期或新生儿期均是致命的。其他NTDs类型(如脊柱裂和脑膨出)的患儿可以存活,但需付出极大的治疗和护理成本^[1]。NTDs的发病率在不同地区有所不同,其在全球范围内的发生率大致在0.12%~12.41%^[2]。NTDs病因复杂,由遗传因素、环境因素或二者交互作用诱发所致。目前,大量动物及临床研究均证实母体糖尿病(diabetes mellitus, DM)可显著提高胚胎NTDs的发生风险^[3-4]。但是对于母体糖尿病诱导胚胎NTDs的作用机制研究尚不充分。因此,进一步探究母体糖尿病诱发的胚胎NTDs的调控机制,并针对其制定合理、安全、有效的治疗策略至关重要。

由神经干细胞分化发育而来的神经上皮细胞是形成正常闭合神经管的关键基础。异常的神经上皮细胞死亡,包括细胞凋亡、细胞过度自噬、细胞早衰和细胞焦亡,均与NTDs发生密切相关。细胞焦亡是一种炎性介质介导的程序性死亡。其主要通过两条通路激活:(1)在经典通路中,炎症小体(如NLRP3)激活Caspase-1;(2)在非经典通路中,胞质脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)直接激活人源Caspase-4/5或鼠源Caspase-11。炎性Caspases切割焦孔素D(gasdermin D, GSDMD),释放其N-端片段。该片段在细胞膜上寡聚形成孔道,引起细胞裂解,促进促炎细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)的释放^[5-6]。研究显示,在CNS疾病或损伤状态下,包括神经元、脑巨噬细胞样细胞、少突胶质细胞等类型的细胞都存

在不同程度的细胞焦亡现象^[7-8]。糖尿病作为一种以慢性高血糖为特征并伴有慢性炎症的疾病,与细胞焦亡过程中的相关炎症变化有重要关联。因此,细胞焦亡是否在母体糖尿病诱发胚胎NTDs形成过程中发挥重要作用以及糖尿病介导神经上皮细胞焦亡的机制可能是重要的研究方向。我们的前期研究已证实细胞焦亡参与母体糖尿病诱导的胚胎NTDs的形成过程^[9]。但是对于母体糖尿病诱导细胞焦亡的作用机制及其相关治疗策略的探究仍不充分。

环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-干扰素刺激基因(stimulator of interferon gene, STING)信号通路是机体感知内源性或外源性DNA并启动免疫应答的关键途径,其功能失调是多种炎症与免疫性疾病的重要诱因。cGAS-STING信号通路是细胞内免疫应答的关键调控通路,参与调控机体炎症病理和免疫性疾病。cGAS识别异常的细胞质双链DNA并激活STING,通过级联反应激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3),诱导多种促炎细胞因子[如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)]以及I型干扰素的产生,促进焦亡炎症小体组装^[10]。大量证据显示,cGAS-STING信号通路介导的免疫应激和炎症反应是细胞焦亡的关键调控因素^[11-12]。此外,糖尿病也可以激活单核细胞中的cGAS-STING通路,促进单核细胞活化,进而促进糖尿病视网膜病变^[13]。因而,我们推测母体糖尿病可能通过激活cGAS-STING通路,诱导神经上皮细胞焦亡。

壳寡糖(chitosan oligosaccharides, COSs)是一种具有抗炎抗氧化活性的天然来源活性物质,在功能食品、医药和农业等领域应用广泛。在抗炎方面,COSs

可通过抑制Toll样受体4/NF- κ B信号通路的活化, 缓解葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎^[14]。此外, 大量研究揭示了COSs对于治疗哮喘、关节炎和炎症性肠病等慢性疾病具有重要意义^[15-17]。更重要的是, COSs具有保护神经元等CNS关键细胞的效应, 发挥缓解神经炎症和改善神经发育环境的作用^[9,18]。COSs是否能通过干预cGAS-STING通路, 减少母体糖尿病诱导的胚胎NTDs形成, 需要进一步探究。

本研究构建了糖尿病胚胎畸形小鼠模型, 验证了母体糖尿病显著诱导胚胎NTDs发生, 并揭示了细胞焦亡参与糖尿病介导的神经上皮细胞死亡, 从而调控胚胎NTDs发生的作用机制。在此基础上, 我们进一步发现, 母体糖尿病导致cGAS-STING通路异常激活, 而COSs干预可将其活性恢复至接近正常水平, 这为探究母体糖尿病诱导胚胎NTDs发生的分子机制及开发相关临床治疗策略提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

糖尿病小鼠模型构建使用的链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)(S8050)购自北京索莱宝科技有限公司; 壳寡糖(V30069)购自大连中科格莱克生物科技有限公司; 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(C0105S)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司; 组织细胞通用裂解液(AIWB-012)购自武汉亲和生命科技有限责任公司; 高敏ECL蛋白质印迹底物(17046)和兔单克隆 β -actin抗体(R380624)购自成都正能生物科技有限责任公司; cGAS兔单克隆抗体(D3O8O)、IFN- β 1兔单克隆抗体(D2J1D)购自Cell Signaling Technology公司; Phospho-TMEM173/STING抗体(TA7416)、Phospho-NF- κ B p65抗体(TP56372)、NF- κ B p65抗体(T55034)购自上海艾比玛特医药科技有限公司; cleaved Caspase-1抗体(sc-398715)购自Santa Cruz公司; NLRP3抗体(DF7438)购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 重组STING抗体(ab288157)、山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor[®] 488)(ab150077)、山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor[®] 647)(ab150079)、山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor[®] 488)(ab150113)购自Abcam公司; DAPI Fluoromount-G[™]抗荧光淬灭封片剂(36308ES20)购自上海翌圣生物科技股份有限公司。

蛋白免疫印迹的化学发光成像系统购自上海金鹏分析仪器有限公司; 石蜡包埋机购自孝感市亚光医用电子技术有限公司(YB-6LF); 手动轮转式切片机(HistoCore BIOCUT)、正置显微镜(DM3000)购自德国Leica公司; 激光共聚焦扫描显微镜购自日本Olympus公司; 多功能微孔板检测仪购自美国Agilent公司。

1.2 实验动物分组及糖尿病模型构建

45只8周龄C57BL/6J雌鼠和10只12周龄C57BL/6J雄鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠送达后, 将其饲养于温度为(22 \pm 2.0) $^{\circ}$ C, 湿度为50% \pm 5%, 光照为12 h(光照7:00—19:00)的控制室内。在饲养和实验期间, 小鼠可以自由获取维持饲料和水。所有实验程序均符合温州大学实验动物福利与伦理委员会要求(伦理编号: WZU-2022-045)。

将C57BL/6J雌鼠随机分为非糖尿病(non-diabetes, ND)组、糖尿病(diabetes mellitus, DM)组、COSs处理的DM(DM+COSs)组。在禁食12 h后, 对DM组和DM+COSs组雌鼠连续2天腹腔注射剂量为100 mg/kg的STZ, 以破坏胰岛 β 细胞的正常功能, 构建类似人类I型糖尿病的小鼠模型。ND组小鼠给予等量生理盐水。1周后监测血糖值。当12 h空腹血糖值达到11.2~16.7 mmol/L时, 判定雌鼠为糖尿病雌鼠。糖尿病雌鼠模型构建成功后, 将雌鼠与C57BL/6J雄鼠交配。从次日早上8点开始, 通过检查孕栓判断雌鼠有无受孕, 如果有孕栓, 则将小鼠判断为已受孕, 标记为孕0.5天(E0.5)。此外, DM+COSs组从E4.5到E10.5经口灌胃300 mg/kg的COSs^[18]。测定E6.5和E10.5时雌鼠的血糖水平, 以确认其妊娠期的高血糖状态。在E8.5时, 收集胚胎进行生物化学和分子生物学分析。在E10.5时, 收集胚胎并观察神经管的闭合情况。

1.3 胚胎畸形率统计

取E10.5天雌鼠, 用戊巴比妥麻醉后, 解剖雌鼠并取出子宫, 剥离胎盘和胎膜后取出胚胎, 记录胚胎实际数目和重吸收数。在体视解剖显微镜下观察、记录胚胎神经管闭合情况, 并统计各组小鼠胚胎的NTDs发生率和重吸收率。

1.4 组织固定、包埋和切片

将E8.5或E10.5孕鼠麻醉处死后, 以生理盐水和4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)先后进行心脏灌流, 解剖获取胚胎。取材后, 将组织用4% PFA常

温浸泡固定 24 h 以上。将固定好的组织用流水冲洗 6 h, 以去除残留固定液, 接下来在常温下进行 75%、85%、95%、100% 梯度乙醇脱水。然后二甲苯浸泡进行组织透化, 石蜡包埋后制备蜡块。组织石蜡蜡块用切片机切成 5 μm 厚度的薄片, 在显微镜下确定合适的组织片段, 随后标注信息并将载玻片在常温下晾干备用。

1.5 HE 染色

取 E10.5 胚胎组织蜡块切片, 根据苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒的要求, 依次进行以下操作。首先将切片用 100% 二甲苯脱蜡 2 次, 每次 15 min, 随后将切片置于 100%、95%、85%、75% 的梯度浓度乙醇中各 5 min, 进行复水。随后, 于室温下对切片进行苏木精溶液染色 3 min 和伊红溶液染色 2 min。接下来, 将切片置于 75%、85%、95% 和 100% 的梯度浓度乙醇中各 5 min, 进行脱水; 然后浸泡于 100% 二甲苯中使组织透明, 浸泡 2 次, 每次 15 min。最后滴加中性树脂进行封片。将组织切片置于光学显微镜下并观察胚胎神经管截面结构, 以进一步确认神经管的闭合情况。

1.6 免疫荧光染色

取 E8.5 胚胎组织石蜡切片, 将其浸泡于 100% 二甲苯中进行脱蜡, 随后将切片置于 100%、95%、85%、75% 的梯度浓度乙醇中进行复水。3% H_2O_2 溶液孵育组织 15 min 后, 将切片浸入柠檬酸钠缓冲液, 水浴加热 (95~100 $^{\circ}\text{C}$) 10~20 min, 待其自然冷却至室温。随后将切片在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育于 5% BSA 溶液中 30 min, 随后用对应一抗孵育切片组织, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。cleaved Caspase-1、NLRP3 和 STING 抗体的使用浓度均为 1:300 (以 1% BSA 配制)。次日, 组织切片于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育于对应荧光二抗 (浓度为 1:500, 以 1% BSA 配制) 1 h。最后用荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色。封片后, 在激光共聚焦扫描显微镜下观察组织结构, 捕获相应蛋白表达的荧光信号。

1.7 蛋白免疫印迹

将 E8.5 的孕鼠麻醉处死后, 从子宫中取出胚胎, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。实验时, 将冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的胚胎组织取出, 使用组织裂解液裂解组织, 通过 BCA 检测试剂盒检测蛋白质浓度, 并经 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性, 配制等量、变性的蛋白样品。蛋白上样量为 20 μg , 上样体积为 10 μL /孔。通过 SDS-PAGE 电泳

分离蛋白后, 将蛋白电转至 PVDF 膜上。以 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 2 h。用 PBST 洗涤后, 与相应一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。再用 PBST 洗涤后, 加入对应兔源二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, 重复 PBST 洗涤操作。最后对膜进行曝光显影, 并使用 ImageJ 软件对不同蛋白指标的灰度值进行统计分析。使用的一抗包括 cGAS 兔单克隆抗体 (1:1 000)、IFN- β 1 兔单克隆抗体 (1:1 000)、重组抗-STING 抗体 (1:1 000)、Phospho-TMEM173/STING 抗体 (1:500)、Phospho-NF- κB p65 抗体 (1:500) 和 NF- κB p65 抗体 (1:5 000)。使用 β -actin (抗体稀释比例为 1:5 000) 作为内参对照。

1.8 统计分析

所有实验均使用来自不同雌鼠的胚胎组织进行至少 3 次独立重复, 数据用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示。本研究采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据统计分析, 两组实验数据之间的比较采用独立样本 *t* 检验。ImageJ 软件用于定量分析蛋白免疫印迹实验中蛋白的表达量。P < 0.05 表示组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 COSs 治疗缓解母体糖尿病诱导的胚胎 NTDs

本研究首先确认了 COSs 的抗炎和抗氧化活性对母体糖尿病诱导的胚胎 NTDs 发生的影响。研究发现, 与正常对照组 (0%) 相比, 糖尿病组胚胎 NTDs 的发生概率大幅度增加 (11.9%), 在 E10.5 时部分胚胎的神经管呈不闭合状态, 表明母体糖尿病显著诱导胚胎 NTDs 发生 (表 1 和图 1A)。更为重要的是 COSs 干预治疗显著降低母体糖尿病诱导的胚胎 NTDs 发生概率 (1.8%), DM+COSs 组绝大多数胚胎神经管均为闭合形态, 与 ND 组胚胎无异 (表 1 和图 1A)。但是 DM+COSs 组的胚胎重吸收率 (10.7%) 显著高于 DM 组小鼠的胚胎重吸收率 (4.5%) (表 1)。我们推测这可能是由于小鼠的生殖生理特性, 孕期对小鼠进行胃内给药可能会干扰其胚胎发育过程。进一步对胚胎组织进行病理切片 HE 染色, 结果显示, ND 组和大部分 DM+COSs 组胚胎的神经管均能正常闭合, 而部分 DM 组胚胎存在明显未闭合的神经管 (图 1B)。同时, 我们检测了 E6.5 和 E10.5 孕鼠的血糖值, 发现与 ND 组相比, DM 组孕鼠血糖均显著升高 (P < 0.001), 而相比于 DM 组, DM+COSs 组孕鼠的血糖并无显著差异 (E6.5: P = 0.468; E10.5: P = 0.241), 提示 COSs 对糖尿病小鼠的血糖值无显著影响 (图 1C 和图 1D)。以上研

究表明, COSs治疗显著抑制母体糖尿病诱导的胚胎NTDs发生。

2.2 COSs干预逆转糖尿病介导的胚胎神经上皮细胞焦亡

神经上皮细胞大量死亡在母体糖尿病诱导胚胎神经管闭合异常中起重要作用。已知, 细胞焦亡是一种新型的细胞程序性死亡方式。细胞焦亡是糖尿病所致神经系统损伤的关键机制之一。本文进一步探究了COSs对母体糖尿病介导的胚胎组织神经上皮细胞焦亡的调控作用。焦亡相关标志物NLRP3和

cleaved Caspase-1的免疫荧光检测结果显示, 相比于ND组, DM组胚胎神经上皮细胞中NLRP3和cleaved Caspase-1的荧光强度显著增加, 而COSs干预可有效抑制这两种蛋白的异常表达(图2A和图2B)。这些结果表明, COSs处理可通过降低神经上皮细胞焦亡水平, 减少母体糖尿病条件下胚胎NTDs的发生。

2.3 COSs抑制母体糖尿病介导的胚胎组织中cGAS-STING通路异常激活

cGAS-STING信号通路的长期激活与细胞焦亡发生发展息息相关。本课题进一步探究了cGAS-

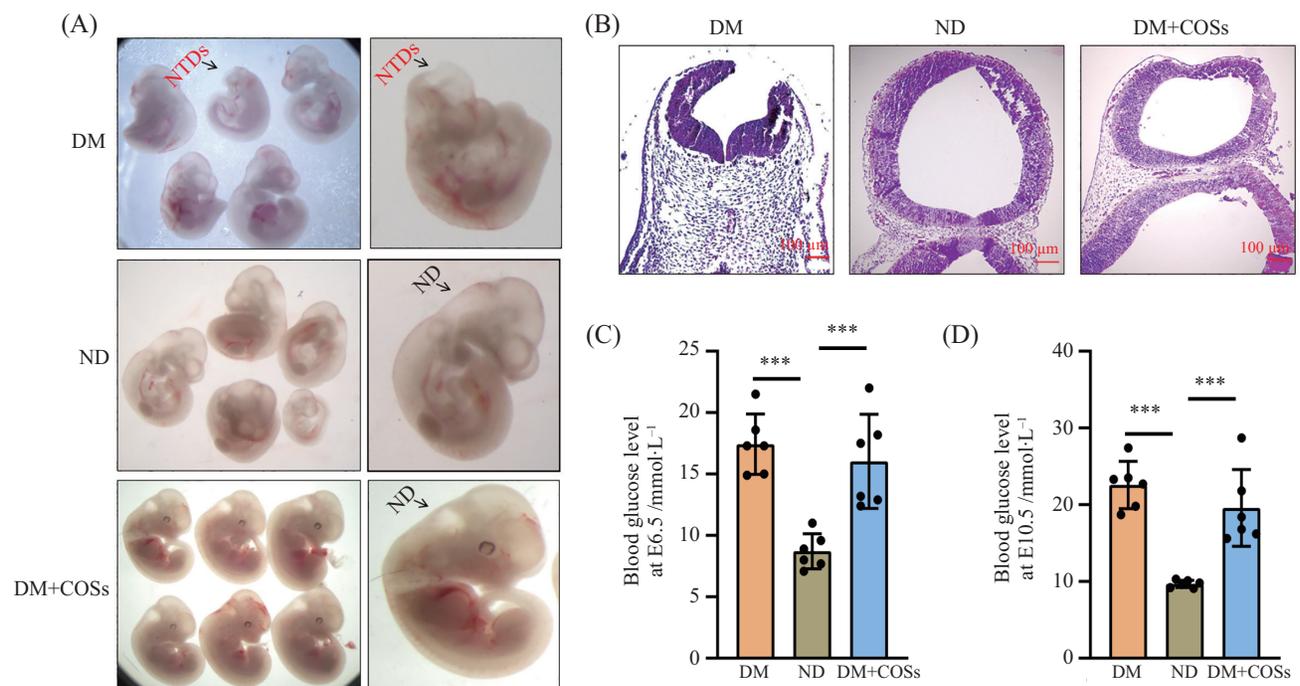
表1 COSs对母体糖尿病诱导的胚胎神经管畸形的影响

Table 1 The effect of COSs on maternal diabetes-induced embryonic NTDs

组别 Group	孕鼠数量 Number of pregnant mice	胚胎总数 Total number of embryos	NTDs发生率/% NTDs rate /%	胚胎重吸收率/% Resorption rate of embryos /%
DM	9	67	11.9*	4.5*
ND	10	76	0	0
DM+COSs	7	56	1.8 [#]	10.7 [#]

ND: 非糖尿病对照组; DM: 糖尿病组; DM+COSs: COSs处理的糖尿病组。* $P < 0.05$, 与ND组相比; [#] $P < 0.05$, 与DM组相比。

ND: non-diabetes group; DM: diabetes mellitus group; DM+COSs: COSs-treated diabetes mellitus group. * $P < 0.05$ compared with ND group; [#] $P < 0.05$ compared with DM group.

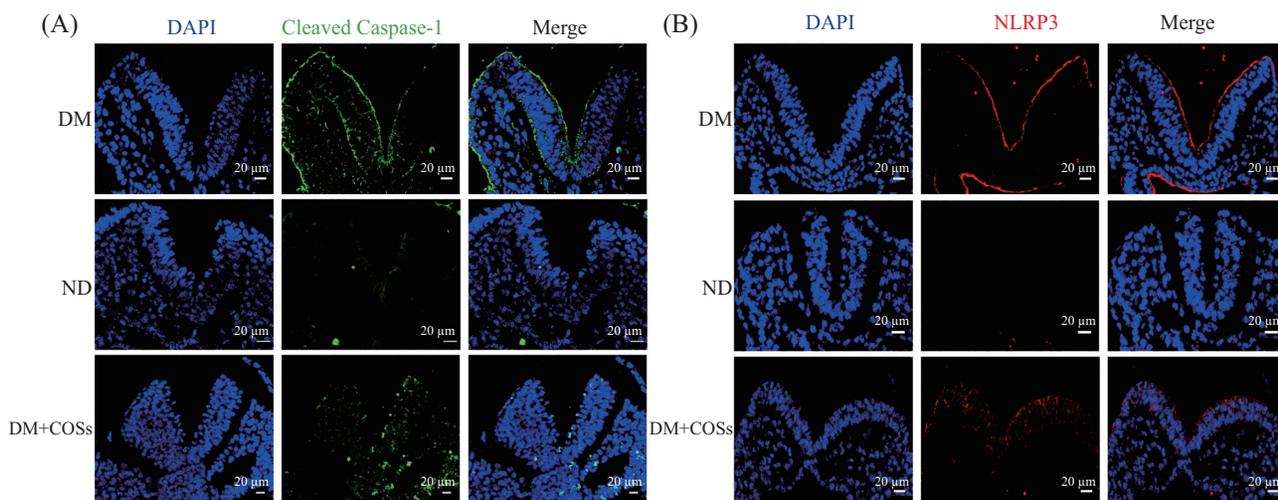


A: E10.5时的各组胚胎形态图, $n=3$; B: E10.5时胚胎神经管截面结构的HE染色结果代表图, $n=3$; C、D: E6.5和E10.5孕鼠的血糖值, $n=6$ 。ND: 非糖尿病对照组; DM: 糖尿病组; DM+COSs: COSs处理的糖尿病组; NTDs: 神经管畸形。*** $P < 0.001$ 。

A: the embryonic morphology at E10.5, $n=3$; B: representative images of HE staining of embryonic neural tube at E10.5, $n=3$; C,D: the blood glucose levels of pregnant mice at E6.5 and E10.5, $n=6$. ND: non-diabetes group; DM: diabetes mellitus group; DM+COSs: COSs-treated diabetes mellitus group; NTDs: neural tube defects. *** $P < 0.001$.

图1 COSs治疗缓解母体糖尿病诱导的胚胎NTDs

Fig.1 COSs treatment alleviates maternal diabetes-mediated embryonic NTDs



A、B: E8.5时, 胚胎神经上皮细胞中cleaved Caspase-1(A, 绿色)和NLRP3(B, 红色)的免疫荧光染色代表图像。DAPI染色的细胞核为蓝色。ND: 非糖尿病对照组; DM: 糖尿病组; DM+COSs: COSs处理的糖尿病组。n=3。

A,B: representative immunofluorescence images of cleaved Caspase-1 (A, green) and NLRP3 (B, red) in the embryos at E8.5. Nuclei were stained with DAPI (blue). ND: non-diabetes group; DM: diabetes mellitus group; DM+COSs: COSs-treated diabetes mellitus group. n=3.

图2 COSs干预逆转母体糖尿病所诱导的胚胎神经上皮细胞焦亡

Fig.2 COSs treatment reverses maternal diabetes-associated pyroptosis of embryonic neuroepithelial cells

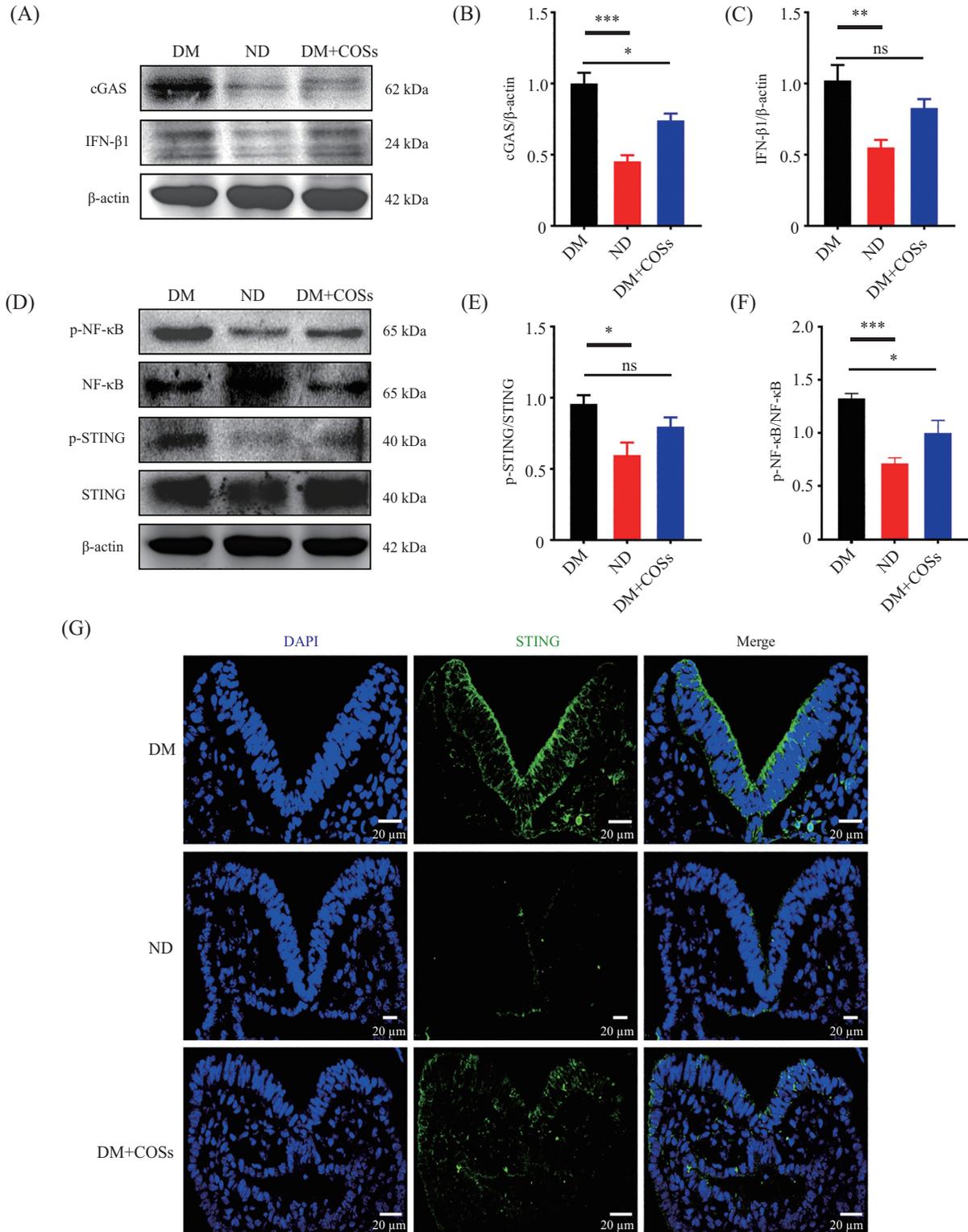
STING通路在糖尿病诱导的胚胎神经上皮细胞焦亡中的作用。我们运用蛋白免疫印迹和免疫荧光染色检测该通路中关键蛋白的表达情况。研究发现, 与ND对照组相比, DM组胚胎组织中cGAS的表达水平以及STING的磷酸化水平均显著提高(图3A、图3B、图3D和图3E)。此外, cGAS-STING通路下游NF- κ B的磷酸化水平和干扰素IFN- β 1的表达水平也相应显著升高(图3A、图3C、图3D和图3F)。COSs干预则抑制糖尿病所致的cGAS、p-STING、p-NF- κ B和IFN- β 1蛋白的异常高表达, 特别是cGAS和p-NF- κ B表达水平显著下调(图3A~图3F)。此外, STING的免疫荧光染色结果进一步证明相比于ND组, DM组的胚胎神经上皮细胞STING荧光强度明显增加; 而COSs干预可有效降低DM组胚胎神经上皮细胞STING通路激活水平(图3G)。以上结果表明, 母体糖尿病显著激活胚胎组织中的cGAS-STING通路, 促进相关免疫反应; 而COSs干预可有效抑制该通路的异常活化。

3 讨论

神经管畸形是CNS发育早期神经胚形成过程异常造成的产前/产后神经发育结构性缺陷。CNS发育从神经板的形成开始, 神经板在人第3孕周时折叠融合成神经管。神经管在闭合过程中会形成一种由多

能干细胞构成的单细胞层, 即神经上皮。不同外界刺激信号会在神经管的背部、腹侧、前段和后段产生不同的神经上皮微环境。在这一阶段, 糖尿病导致母体整体葡萄糖代谢状况或免疫状态显著改变, 影响宫内环境稳态, 通过诱导神经上皮细胞应激、增加卵黄囊血管病变和降低巨噬细胞或前巨噬细胞的抗炎活性等机制, 最终阻碍神经管正常闭合^[19-20]。因此, 孕前或者怀孕早期控制血糖水平对于降低胚胎畸形率具有重大意义。但是, 即使采用优化的临床干预措施, 将孕妇血糖维持至正常水平仍较为困难; 并且即使短暂的暴露于高血糖环境, 器官形成也会受到一定影响。因此, 开发可行性高的干扰策略以预防母体糖尿病诱导的胚胎先天畸形迫在眉睫。

正常的神经上皮细胞数量和功能对神经管正常发育至关重要。神经上皮细胞的增殖和死亡失衡与NTDs发生息息相关。研究表明, 在母体糖尿病条件下胚胎组织中存在神经上皮细胞显著凋亡的现象^[21], 这提示神经上皮细胞过度凋亡与糖尿病所介导的胚胎NTDs形成具有重大相关性。与凋亡不同, 细胞焦亡是一种炎性因子介导的程序性细胞死亡方式, 其激活可进一步放大炎症反应。细胞焦亡参与糖尿病肾病、心肌病和周围神经病变等诸多疾病的发生发展。当前, 细胞焦亡在母体糖尿病所介导的神经上皮细胞死亡和NTDs发生中的作用及机制仍然不清楚。



A~F: E8.5胚胎组织中cGAS、IFN-β1、p-STING、STING、p-NF-κB和NF-κB蛋白表达水平和定量分析结果; G: E8.5胚胎组织STING蛋白(绿色)免疫荧光染色代表图像, DAPI染细胞核(蓝色)。ND: 非糖尿病对照组; DM: 糖尿病组; DM+COSSs: COSSs处理的糖尿病组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 无显著性差异。n=3。

A~F: the expressions and quantitative analysis of cGAS, IFN-β1, p-STING, STING, p-NF-κB and NF-κB of embryos at E8.5; G: representative immunofluorescence images of STING (green) in embryos at E8.5, nuclei were stained with DAPI (blue). ND: non-diabetes group; DM: diabetes mellitus group; DM+COSSs: COSSs-treated diabetes mellitus group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: no significant difference. n=3.

图3 COSSs干预降低母体糖尿病诱导的胚胎cGAS-STING信号通路激活水平

Fig.3 COSSs treatment reduces maternal diabetes-induced activation of the cGAS-STING pathway in the embryos

本研究通过对胚胎组织中细胞焦亡关键分子(cleaved Caspase-1和NLRP3)进行免疫荧光染色,证实母体糖尿病可显著诱导胚胎神经上皮细胞焦亡。因此,进一步探究母体糖尿病环境下神经上皮细胞焦亡的调控机制对于维持神经上皮细胞正常增殖和功能至关重要。

已知,cGAS-STING信号通路是先天免疫系统中的关键通路之一,主要感知胞内异常DNA[如病原体DNA和线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)],触发相应的免疫反应。cGAS-STING通路被激活后,可通过NF- κ B依赖途径促进炎症细胞因子表达,并通过IRF3依赖途径诱导I型干扰素生成,进而触发抗病毒状态。cGAS-STING通路激活与细胞焦亡发生发展具有重大相关性。研究表明,STING信号通路可通过调控NLRP3炎症小体的活化,促进细胞焦亡及后续炎症反应^[10,12]。本文对cGAS-STING通路在母体糖尿病诱导的胚胎NTDs发生中的角色进行探究。结果显示,DM组胚胎中cGAS-STING通路被显著激活,且这一激活状态与神经上皮细胞焦亡水平升高趋势相一致,表明该通路可能通过驱动细胞焦亡促进胚胎NTDs发生。但是,本研究对母体糖尿病如何激活cGAS-STING信号通路并未深入探究。GAS可被胞质中异常存在的双链DNA激活,无论其来源于细胞自身还是外源病原体。研究已证实,分枝杆菌、李斯特菌、志贺菌及弗朗西斯菌等胞内细菌可通过释放dsDNA激活cGAS-STING通路^[22-24]。这也为后续进一步探究母体糖尿病影响体内菌群稳态,从而介导cGAS-STING通路激活的作用机制提供了思路。当然,胚胎细胞内的双链DNA也可能来自细胞自身。高血糖和氧化应激会损伤细胞线粒体,导致线粒体膜电位下调,mtDNA被释放到细胞质中;此外,严重的氧化应激直接造成胚胎细胞核DNA损伤,若细胞核DNA的损伤程度超过其修复能力,则会导致基因组片段化的核DNA泄漏至细胞质。例如,在肌萎缩侧索硬化症的研究中,病理蛋白TDP-43可侵入细胞线粒体,并触发mtDNA释放,通过激活cGAS和驱动STING构象变化,最终促进NF- κ B和IFN-I水平上调,干扰正常的细胞生长^[25]。因此,我们也将将在下一步研究中深入探究母体糖尿病介导的cGAS-STING通路激活的调控机制。

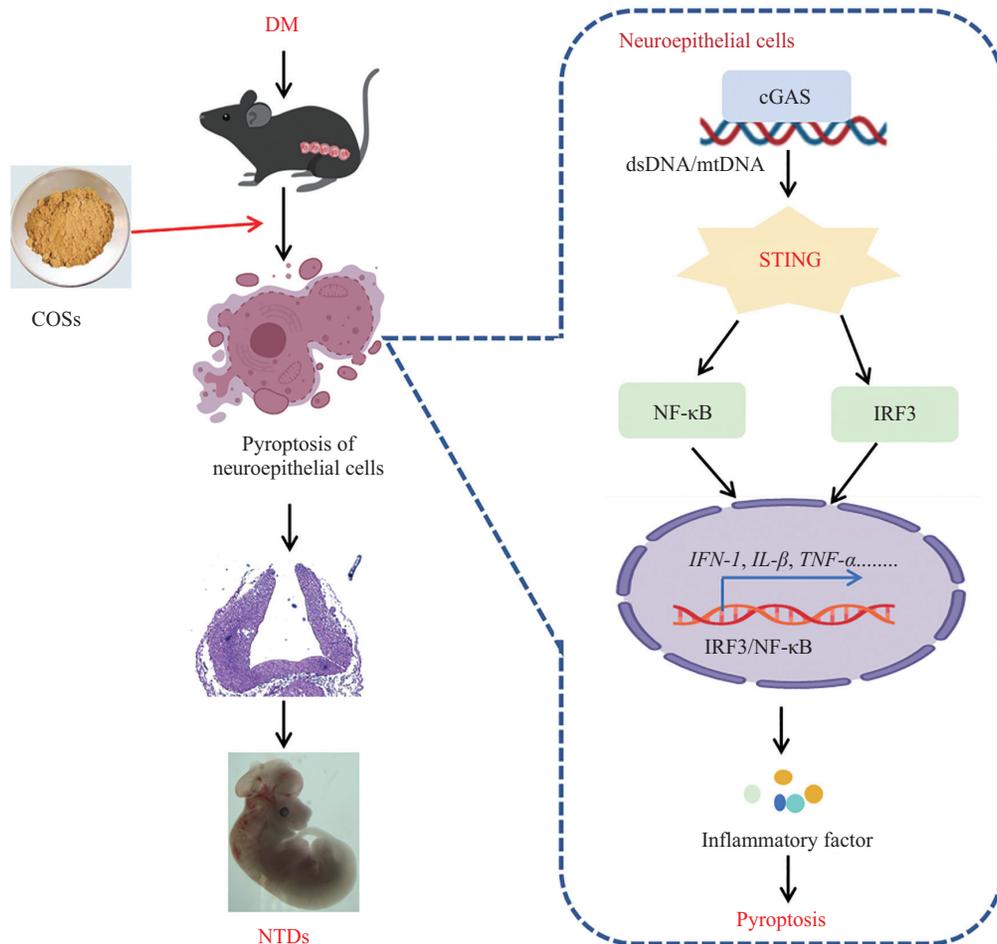
COSs是一种可生物降解的壳聚糖衍生物,由天然多糖几丁质经脱乙酰化及进一步降解获得。COSs

作为壳聚糖的重要衍生物,具有重要的抗菌、抗炎和抗氧化生物活性。目前,COSs广泛应用于食品、医药和农业领域。已有研究表明COSs干预能够抑制神经炎症,促进神经发育和缓解神经病变^[18,26]。已知,胎盘在母体-胎儿之间发挥物质交换和免疫防御等功能。研究发现孕产妇糖尿病可诱导胎盘氧化应激,促进胎盘细胞凋亡,并扰乱胎盘内皮细胞和血管功能^[27]。此外,母体糖尿病可通过抑制胎儿肝激酶-1(fetal liver kinase-1, Flk-1)阳性祖细胞中骨形态蛋白4表达,从而促进Flk-1阳性祖细胞凋亡,使得血岛形成受损和血管密度降低,最终导致卵黄囊病变^[19]。一项动物研究也显示,COSs补充剂可提高胎盘抗氧化基因的表达水平,降低氧化应激水平,进而激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路,提高胎盘中氨基酸转运水平,这对于缓解胎儿生长受限具有重要作用^[28]。鉴于COSs对胎盘细胞的保护效应,COSs可能通过抑制糖尿病诱导的氧化应激和炎症反应,减少母体糖尿病对胎盘发育和功能的干扰,从而将胎盘对胚胎/胎儿的营养支持和免疫调节功能恢复至正常水平。因此,我们推测COSs可能通过缓解氧化应激,减少线粒体DNA的异常释放,进而从上游抑制cGAS-STING通路的过度激活,从而有效减少母体糖尿病介导的胚胎神经上皮细胞焦亡和NTDs的发生。该结果提示抑制cGAS-STING通路激活是COSs发挥抗氧化作用和减少NTDs发生的另一途径。

综上所述,母体糖尿病通过介导cGAS-STING通路激活,促进神经上皮细胞焦亡以触发胚胎NTDs发生;该研究揭示干预cGAS-STING通路可能成为母体糖尿病诱导的胚胎神经发育畸形的新治疗靶点。基于良好的抗炎抗氧化活性,COSs能够降低cGAS-STING信号通路中cGAS和p-STING等关键蛋白的表达水平,进一步抑制糖尿病所致神经上皮细胞焦亡,降低NTDs的发生率(图4)。本研究发现COSs能够抑制母体糖尿病介导的胚胎组织中cGAS-STING信号通路的异常激活。在未来的研究中我们将通过Cgas基因敲除模型或特异性抑制剂等方式,进一步证实该通路在COSs保护作用中的必要性,从而为COSs的临床转化提供更直接的理论证据。

参考文献 (References)

- [1] MARTINEZ H, WEAKLAND A P, BAILEY L B, et al. Improving maternal folate status to prevent infant neural tube defects: working group conclusions and a framework for action [J]. Ann



母体糖尿病通过介导cGAS-STING通路的激活,进而促进神经上皮细胞焦亡以诱导胚胎NTDs发生;COSs治疗可以抑制这一过程。

Maternal diabetes induces the embryonic NTDs by activating the cGAS-STING pathway and then triggering the pyroptosis of neuroepithelial cells; COSs-treatment inhibits this process.

图4 COSs在母体糖尿病诱导的胚胎神经管缺陷中的作用机制示意图

Fig.4 A diagram depicting the role and mechanism of COSs on maternal diabetes-induced embryonic neural tube defects

- N Y Acad Sci, 2018, 1414(1): 5-19.
- [2] SALAZAR-REVIKINA A, SIERRA-BRETÓN M, RUMBO J, et al. Characterization of risk factors for neural tube defects: a case-control study in Bogota and Cali, Colombia, 2001-2018 [J]. J Child Neurol, 2021, 36(7): 509-16.
 - [3] CHENG X, SHEN W B, REECE E A, et al. Maternal diabetes induces senescence and neural tube defects sensitive to the senomorphic rapamycin [J]. Sci Adv, 2021, 7(27): eabf5089.
 - [4] WANG G L, SONG S C, SHEN W B, et al. MicroRNA-322 overexpression reduces neural tube defects in diabetic pregnancies [J]. Am J Obstet Gynecol, 2024, 230(2): 254.e1-254.e13.
 - [5] MA X X, HAO J N, WU J R, et al. Prussian blue nanozyme as a pyroptosis inhibitor alleviates neurodegeneration [J]. Adv Mater, 2022, 34(15): e2106723.
 - [6] LI Z L, LIU W, FU J Q, et al. Shigella evades pyroptosis by arginine ADP-ribosylation of caspase-11 [J]. Nature, 2021, 599(7884): 290-5.
 - [7] KIM H, SEO J S, LEE S Y, et al. AIM2 inflammasome contributes to brain injury and chronic post-stroke cognitive impairment in mice [J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 765-76.
 - [8] PLATNICH J M, CHUNG H, LAU A, et al. Shiga toxin/lipopolysaccharide activates caspase-4 and gasdermin D to trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome [J]. Cell Rep, 2018, 25(6): 1525-36.e7.
 - [9] ZHOU M, WANG B B, CAI S F, et al. Chitosan oligosaccharides ameliorates maternal diabetes-induced embryonic neural tube defects via inhibiting excessive pyroptosis of neuroepithelial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2025, 148: 114074.
 - [10] LI N, ZHOU H, WU H M, et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3 [J]. Redox Biol, 2019, 24: 101215.
 - [11] XIAO L, AI Y L, MI X Y, et al. cGAS activation converges with intracellular acidification to promote STING aggregation and pyroptosis in tumor models [J]. J Clin Invest, 2025, 135(18): e188872.
 - [12] FANG G Y, LI X C, YANG F Y, et al. Amentoflavone mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cardiomyocyte pyroptosis and inflammation through inhibition of the STING/NLRP3 signalling pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 117: 154922.

- [13] DONG L J, CHENG R, MA X, et al. Regulation of monocyte activation by PPAR α through interaction with the cGAS-STING pathway [J]. *Diabetes*, 2023, 72(7): 958-72.
- [14] SHI L, FANG B, YONG Y H, et al. Chitosan oligosaccharide-mediated attenuation of LPS-induced inflammation in IPEC-J2 cells is related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219: 269-79.
- [15] CHUNG M J, PARK J K, PARK Y I. Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(2): 453-9.
- [16] LI S L, LIU J, LIU S Y, et al. Chitosan oligosaccharides packaged into rat adipose mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles facilitating cartilage injury repair and alleviating osteoarthritis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 343.
- [17] YOUSEF M, PICHYANGKURA R, SOODVILAI S, et al. Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(1): 66-79.
- [18] JIA S L, LU Z, GAO Z L, et al. Chitosan oligosaccharides alleviate cognitive deficits in an amyloid- β 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 83: 416-25.
- [19] CAO S Y, REECE E A, SHEN W B, et al. Restoring BMP4 expression in vascular endothelial progenitors ameliorates maternal diabetes-induced apoptosis and neural tube defects [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 859.
- [20] BLOCK J. M2-like cells from the macrophage lineage might play a central role in closure of the embryonic neural tube [J]. *Med Hypotheses*, 2019, 129: 109264.
- [21] LI K L, SHI Y, ZHU S Q, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids effectively protect against neural tube defects in diabetic mice induced by streptozotocin [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 9188-96.
- [22] WATSON R O, BELL S L, MACDUFF D A, et al. The cytosolic sensor cGAS detects *Mycobacterium tuberculosis* DNA to induce type I interferons and activate autophagy [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(6): 811-9.
- [23] COLLINS A C, CAI H C, LI T, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune DNA sensor for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(6): 820-8.
- [24] HANSEN K, PRABAKARAN T, LAUSTSEN A, et al. *Listeria monocytogenes* induces IFN β expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway [J]. *EMBO J*, 2014, 33(15): 1654-66.
- [25] YU C H, DAVIDSON S, HARAPAS C R, et al. TDP-43 triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS [J]. *Cell*, 2020, 183(3): 636-49, e18.
- [26] CAI M Y, ZHANG X X, GAO X H, et al. Chitooligosaccharide ameliorates cognitive deficits and neuroinflammation in APP/PS1 mice associated with the regulation of Nrf2/NF- κ B axis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 303: 140683.
- [27] SAAD M I, ABDELKHALEK T M, SALEH M M, et al. Maternal diabetes impairs oxidative and inflammatory response in murine placenta [J]. *SpringerPlus*, 2016, 5: 532.
- [28] XIE C, WU X, LONG C, et al. Chitosan oligosaccharide affects antioxidant defense capacity and placental amino acids transport of sows [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(1): 243.