

• 论 著 •

缺糖缺氧/再灌注对星形胶质细胞外泌体 miRNAs 表达的影响*

韩韦华, 黄庭睿, 文田甜, 沈 耀

温州医科大学检验医学院(生命科学学院)/检验医学教育部重点实验室, 浙江温州 325035

摘要:目的 探讨缺糖缺氧/再灌注(OGD/R)对星形胶质细胞外泌体中微小 RNA(miRNAs)表达的影响。方法 对新生原代培养的 SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞进行缺糖缺氧(OGD)或 OGD/R 处理,采用超高速离心法分别收集培养基上清液和细胞内的外泌体。通过透射电镜和流式细胞术鉴定外泌体。采用 Illumina Hiseq2500 测序平台检测外泌体 miRNAs 的表达谱,从中选取表达受 OGD 及 OGD/R 处理影响的 miRNAs。并用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)对生物信息学分析中差异有统计学意义的 miRNAs 进行实验验证。使用 metascape 和 miRWalk 预测高表达 miRNAs 的靶基因,再将挑选出的共同靶基因在 Webgestalt 中进行 KEGG 富集分析。采用 Western blot(WB)检测 OGD/R 及其星形胶质细胞外泌体对全反式维甲酸(ATRA)诱导分化的 SH-SY5Y 细胞 Erk 磷酸化水平的影响。结果 与对照组相比,OGD 4 h 处理改变了星形胶质细胞外泌体 miRNAs 的表达谱;而再灌注 24 h 后改变的 miRNAs 大部分恢复到对照组水平。qPCR 验证显示:3 种 miRNAs 在外泌体中的分布水平远高于细胞,而且这种富集作用可能不受 OGD 刺激的影响。KEGG 富集分析显示:表达上调 miRNAs 的靶基因信号通路主要为代谢通路,包括 PI3K-AKT、MAPK 和 mTOR 信号通路等。OGD、OGD/R 及正常星形胶质细胞外泌体处理均能上调相应培养条件下 SH-SY5Y 细胞的 p-Erk1 和 p-Erk2 水平。结论 OGD 处理能显著影响星形胶质细胞外泌体 miRNAs 的表达,其外泌体中富集分布的 miRNAs 均靶向作用于代谢通路,如 PI3K-AKT、MAPK 和 mTOR 等信号通路。

关键词:星形胶质细胞; 外泌体; miRNAs; 缺糖缺氧/再灌注

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.010

中图法分类号:R364.4

文章编号:1673-4130(2023)04-0430-06

文献标志码:A

Effects of oxygen-glucose deprivation/recovery on the expression
of miRNAs in the astrocyte exosomes*

HAN Weihua, HUANG Tingrui, WEN Tiantian, SHEN Yao

School of Laboratory Medicine (School of Life Sciences) / Key Laboratory of Ministry
of Education for Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) on the expression of miRNAs in astrocyte exosomes. **Methods** Primary cultured neonatal cortical astrocytes of SD rats were subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD) or OGD/R treatment, and the culture medium supernatant and intracellular exosomes were collected by ultracentrifugation. Exosomes were identified by transmission electron microscopy and flow cytometry. The Illumina Hiseq2500 sequencing platform was used to detect the expression profile of exosomal miRNAs, and the miRNAs whose expression was affected by OGD and OGD/R were selected. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to verify the differentially expressed miRNAs in bioinformatics analysis. Metascape and miRWalk were used to predict the target genes of the highly expressed miRNAs, and then the selected common target genes were analyzed by KEGG enrichment in Webgestalt. Western blot (WB) was used to detect the effect of exosomes derived from OGD/R and astrocytes on the phosphorylation of Erk in SH-SY5Y cells induced by all-trans retinoic acid (ATRA). **Results** Compared with the control group, OGD 4 h treatment changed the expression profile of exosomal miRNAs in astrocytes. However, most of the altered miRNAs after 24 h of reperfusion returned to the control level. qPCR validation showed that the distribution level of the three miRNAs in exosomes was much higher than that in cells, and this enrichment effect may not be affected by OGD stimulation.

* 基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2020R413038);浙江省自然科学基金项目(LY19H090010)。

作者简介:韩韦华,女,在读硕士研究生,主要从事检验医学方面的研究。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230208.1656.003.html> (2023-02-09)

KEGG enrichment analysis showed that the target gene signaling pathways of up-regulated miRNAs were mainly metabolic pathways, including PI3K-AKT, MAPK and mTOR signaling pathways. The levels of p-Erk1 and p-Erk2 in SH-SY5Y cells treated with exosomes from OGD, OGD/R and normal astrocytes were significantly up-regulated under corresponding culture conditions. **Conclusion** OGD treatment can significantly affect the expression of exosome miRNAs in astrocytes. The enriched and distributed miRNAs in exosome of astrocytes target metabolic pathways, such as PI3K-AKT, MAPK, and mTOR signaling pathways.

Key words: astrocyte; exosomes; miRNAs; oxygen-glucose deprivation/recovery

星形胶质细胞是脑组织内数量最多的一类细胞,其通过大量突起或递质的分泌与脑内其他细胞建立密切的信息联系,在正常生理及病理过程中扮演着重要角色^[1]。外泌体是一种直径为 40~100 nm 的囊性小泡,是已发现的众多细胞外微粒体的一种,可由机体多种细胞分泌^[2]。外泌体中具有相当数量的微小 RNA(miRNAs)、信使 RNA(mRNA)、蛋白质,甚至还包括线粒体 DNA,并通过依赖于膜表面信号分子,膜融合后的内容物释放,以及信号分子的胞外释放等途径在细胞间信息的传递中发挥重要作用^[3]。外泌体在多种疾病中发挥着重要调节作用,如间充质干细胞(MSCs)可通过分泌外泌体在心脑血管等疾病的治疗中发挥作用^[4-5],而这种作用又受外泌体的来源细胞和靶细胞所处的环境和状态影响^[6-7]。脑组织内的星形胶质细胞也可分泌外泌体,而且对星形胶质细胞做不同的处理就会刺激其释放出具有不同生物学作用的外泌体^[8-9]。细胞分泌的 miRNAs 通过外泌体的运输可传送到另一个细胞,而 miRNA 通过靶向降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译参与个体的发育、细胞分化、增殖、凋亡等生理调控过程^[10-11]。目前,外泌体 miRNAs 调控作用成为细胞与细胞之间信息传递研究的热点。然而,星形胶质细胞源性外泌体 miRNAs 分泌水平在脑缺血过程中的变化及其在缺血损伤及修复中所发挥的作用尚不清楚。因此,本研究利用新一代高通量 Illumina MiSeq 测序技术对星形胶质细胞源性外泌体 miRNAs 进行生物信息学分析,探讨缺糖缺氧(OGD)和缺糖缺氧/再灌注(OGD/R)对星形胶质细胞外泌体 miRNAs 表达谱的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 新生 24 h 内 SPF 级的 Sprague-Dawley (SD)大鼠由温州医科大学动物实验中心提供。胰酶细胞消化液、多聚-D-赖氨酸溶液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒和青霉素-链霉素溶液购自碧云天生物技术有限公司。高糖 DMEM、无糖 DMEM 培养液及去外泌体血清购自 Gibco 公司。胎牛血清为 Natocor 公司产品。全反式维甲酸诱导(ATRA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。抗-Actin 兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:1 000 稀释使用)购自杭州戴格生物技术有限公司。抗-p-细胞外信号调节激酶(Erk)1、抗-p-Erk2 和抗-Erk1、抗-Erk2 兔单克隆抗体(1:5 000 稀释使用)购自 Abcam 公司。RNAi-

so Plus 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测试剂:HiScript IIQ RT SuperMix、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 均购自诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 参考文献[12]的方法进行细胞培养。采用 24 h 内新生 SD 大鼠的大脑皮层,用手术刀片切碎,再用 0.25%胰酶消化 20 min。而后用玻璃滴管吹打细胞团块直到未见明显絮状组织后停止吹打而获得细胞悬液。将细胞种植于预先用多聚-D-赖氨酸溶液包被的密闭细胞培养瓶中。培养 10 d 左右,细胞长满整个瓶底,将其固定在 37℃恒温摇床中,以 250 r/min 速率振荡摇晃 16 h 左右,以去除小胶质等杂细胞而使星形胶质细胞纯化。SH-SY5Y 细胞(源于人神经母细胞瘤细胞)培养于 DMEM 培养液,待生长到 60%~70%时去掉旧的培养基,用 PBS 洗涤细胞 3 次,而后培养于含 1%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基。在避光条件下,加入 ATRA 溶液,使其终浓度为 15 μmol/L,处理 4 d。

1.2.2 细胞 OGD/R 模型的构建 待星形胶质细胞长满后,用 PBS 洗涤 3 次,加入无糖 DMEM 溶液,再将细胞置于缺氧罐内(95% N₂、5% CO₂, 37℃)处理 2/4 h(作为 OGD 2/4 h 组)。待 OGD 2/4 h 处理结束后去除无糖 DMEM 并换成正常含糖 DMEM 培养基,并置于 37℃恒温 CO₂ 培养箱内培养,作为 OGD 2 h/R 24 h 或 OGD 4 h/R 24 h 组。

1.2.3 星形胶质细胞外泌体提取 用去外泌体血清培养星形胶质细胞 24 h 后收集培养基上清液,然后用超速离心法收集外泌体。分别收集星形胶质细胞在不同条件下处理后的培养上清液。以 400×g 离心 5 min 后提高转速到 3 000×g 离心 15 min。去除沉淀收集上清液,以 10 000×g 离心 30 min 后用 0.22 μm 注射滤器过滤,以 120 000×g 离心 90 min。收集的沉淀用 PBS 重悬,继续以 120 000×g 离心 90 min,弃净上层 PBS 重悬液后加入 100 μL PBS 后吹打沉淀,收集到预冷过的 EP 管内,-80℃保存。

1.2.4 透射电镜法鉴定外泌体 样品固定在 2.5%的戊二醛溶液内,置于 4℃过夜;倒掉固定液后用 0.1 mol/L, pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min。再用 1%的锇酸溶液固定样品 1~2 h,后用磷酸盐缓冲液漂洗。设置乙醇溶液浓度梯度(包

括 30%、50%、70%、80%、90% 和 95% 这 6 种浓度)对样品进行脱水处理,每种浓度处理 15 min,再用 100% 的乙醇处理 20 min;最后过度到纯丙酮中处理 20 min。用 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液(体积比为 1:1)处理样品 1 h;用 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液(体积比为 3:1)处理样品 3 h;纯包埋剂处理样品过夜;将样品经过渗透处理后包埋置于 70 °C 加热过夜,即得到包埋好的样品。利用莱卡 EM UC7 型超薄切片机将包埋样品切成 70~90 nm 的切片,柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液对切片各染色 5~10 min,即可在日立 H-7650 型透射电镜中观察。

1.2.5 外泌体流式细胞仪表面标记物检测 使用流式细胞术进行外泌体表面标记物 CD81 和 CD63 的检测。经超速离心法收集分离得到的星形胶质细胞源性外泌体沉淀,用 100 μ L 已经过滤的 PBS 复匀外泌体。用不染色的外泌体作为阴性对照;将收集到的外泌体分别进行 CD63 和 CD81 两组抗体染色,标记为 CD63 和 CD81。按照仪器操作规程上机检测(由广州市锐博生物科技有限公司完成)。

1.2.6 外泌体 miRNA 高通量测序 标本提取总 RNA 后,首先使用 T4 RNA 连接酶 2 将一个腺苷化单链 DNA 3' 接头和 5' 接头相继连接到 small RNA 上,其中 3' 端接头的 5 端为 rAPP,3 端有氨基保护,所以能够减少 miRNA 的自连。5' 端接头被设计成可以捕获带有 5' 磷酸基团的 small RNA。带有 5' 与 3' 链接接头的 small RNA 序列,通过与 3 端互补的反转录引物进行反转录反应,最后对反转录产生的 cDNA 序列进行 PCR 扩增。最后,对 140~160 bp 长度范围的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行胶回收,从而完成整个文库的制备工作,对构建好的文库使用 Illumina HiSeq2500 进行测序,测序读长为单端 1 $\times$ 50 bp(由杭州联川生物技术股份有限公司完成)。

1.2.7 qPCR 验证 检测细胞内及外泌体内 let-7 家族 3 种 miRNAs。使用 RNAiso Plus 试剂提取细胞内及外泌体内总 RNA。使用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒(茎-环法)从 1 μ g 总 RNA 合成 cDNA,然后采用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qPCR,以 U6 作内参对照。相对 miRNA 表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算。引物序列如下,let-7 miRNAs 反转录引物:GTCGTATC-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTAT; let-7f-5p 引物,正向:5'-CGCGCGTGAGGTAGTAGATTGT-3'; let-7e-5p 引物,正向:5'-CGCGTGAGGTAGGAGGTTGT-3'; let-7a-5p 引物,正向:5'-GCGCGTGAGGTAGT AGGT-TGT-3'; let-7 miRNA 引物,反向:5'-AGTG-CAGGGTCCGAGGTATT-3'; U6 引物,正向:5'-CTCGCTTCGGCAGCACAC-3',反向:5'-AACGCT-TCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.8 Western blot(WB)检测 Erk 磷酸化水平 SH-SY5Y 细胞经 OGD/R 及外泌体处理后收集细胞并提取蛋白质,参考文献[12],采用 WB 测定 Erk 总蛋白表达水平及磷酸化水平,以 β -Actin 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。使用 Graph Pad Prism 软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 星形胶质细胞外泌体的鉴定 利用透射电镜观察外泌体的立体结构,显示 30~100 nm 的双膜结合小泡。使用流式细胞术检测外泌体表面标记物 CD81 和 CD63 的表达,均呈阳性,分别为 82.2% 和 67.6%。

2.2 原始数据的筛选分析 在本研究缺氧缺血再灌注组(OGD/R)与正常对照组的总共 3 组标本中,经过高通量 Illumina MiSeq 测序,共获得了原始数据(Raw reads) 2.37×10^7 (对照组), 2.66×10^7 (OGD 4 h 组), 2.54×10^7 (OGD 4 h/R 24 h)。经过数据筛选后,所获取的有效数据量在各组相应的数据总量中占比分别达到了 37.41% (对照组), 35.66% (OGD 4 h 组), 39.77% (OGD 4 h/R 24 h 组)。数据的质与量满足进一步的深度生物学分析质控要求。

2.3 OGD 及 OGD/R 对星形胶质细胞外泌体 miRNAs 表达谱的影响 OGD 4 h 处理,使外泌体中 miR-384-5p、miR-421-3p_R+3、miR-361-5p、miR-16-5p、miR-24-3p、miR-25-3p、miR-92b_R+1、miR-128-3p、miR-151-3p 表达显著下调($P < 0.05$),而 let-7 家族成员,如 let-7f-5p、let-7e-5p、let-7a-5p、let-7d-5p 和 miR-98-5p_R-1,以及 miR-23b_R+1 和 miR-30c-5p_R-1 表达显著上调($P < 0.05$, 差异倍数 ≥ 2 , mapped reads ≥ 1000)。再灌注 24 h 处理后,let-7 家族成员表达开始下调,恢复至与对照组比较差异无统计学意义的水平($P > 0.05$),OGD 4 h 处理导致的表达下调的 miRNAs 也恢复至和对照组比较差异无统计学意义的水平($P > 0.05$)。OGD 4 h/R 24 h 组与对照组比较,在同时满足 $P < 0.05$, 差异倍数 ≥ 2 , mapped reads ≥ 1000 的条件下,只有 miR-122-5p_R-1 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、2。

表 1 OGD 4 h 组和对照组的比较

microRNAs	mapped reads		差异倍数	P
	对照组	OGD 4 h 组		
miR-384-5p	5 674	2 111	0.37	<0.001
miR-421-3p_R+3	1 718	425	0.25	0.004
miR-361-5p	5 371	1 817	0.34	0.01
miR-16-5p	214 025	70 255	0.33	0.003
miR-24-3p	40 990	13 257	0.32	0.019
miR-25-3p	31 602	8 301	0.26	0.024
miR-92b_R+1	42 088	13 282	0.32	0.029
miR-128-3p	1 949	823	0.42	0.043

续表 1 OGD 4 h 组和对照组的比较

microRNAs	mapped reads		差异 倍数	P
	对照组	OGD 4 h 组		
miR-151-3p	2 377	892	0.38	0.036
miR-23b_R+1	106	2 540	24.01	<0.001
let-7f-5p	2 336	30 691	13.14	0.007
let-7e-5p	1 705	14 756	8.65	0.011
miR-98-5p_R-1	1 196	4 253	3.55	0.017
miR-30c-5p_R-1	3 268	11 636	3.56	0.021
let-7a-5p	1 870	20 550	10.99	0.025
let-7d-5p	6 351	29 459	4.64	0.049

注: mapped reads 表示某个标本的所有 reads 总和(以百万为单位)。

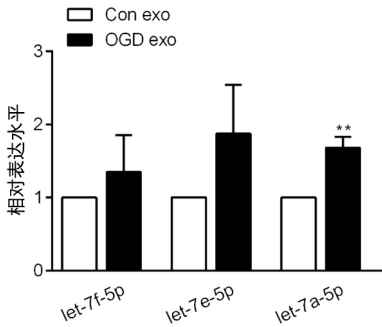
表 2 OGD 4 h/R 24 h 和 OGD 4 h 组的比较

microRNAs	mapped reads		差异 倍数	P
	OGD 4 h 组	OGD 4 h/ R 24 h 组		
let-7f-5p	30 691	2 146	0.07	0.001
miR-30c-5p_R-1	11 636	3 152	0.27	0.002
miR-23b_R+1	2540	63	0.02	0.002
miR-151-5p	4 528	1048	0.23	0.002
let-7e-5p	14 756	1 375	0.09	0.005
miR-98-5p_R-1	4 253	1 195	0.28	0.007
miR-339-5p_R-2	1 112	108	0.1	0.018
let-7a-5p	20 550	1 566	0.08	0.028
miR-129-2-3p	3 946	8 418	2.13	0.003
miR-674-5p_R-1	598	1 464	2.45	0.004
miR-30a-5p_R+2	5 206	13 146	2.52	0.005
miR-1839-5p	1 178	3 501	2.97	0.006
miR-384-5p	2 111	5 426	2.57	0.007
miR-423-5p_R-1	980	5 313	5.42	0.016
miR-20a-5p	16 402	36 703	2.24	0.02
miR-25-3p	8 301	26 366	3.18	0.021
miR-361-5p	1 817	4 995	2.75	0.022
miR-24-3p	13 257	39 668	2.99	0.024
miR-151-3p	892	2 160	2.42	0.028
miR-9a-3p	18 740	60 433	3.22	0.031
miR-128-3p	823	1 688	2.05	0.038
miR-16-5p	70 255	194 315	2.77	0.047
miR-203a-3p	533	1 350	2.53	0.047

注: mapped reads 表示某个标本的所有 reads 总和(以百万为单位)。

2.4 qPCR 验证 为了进一步验证 miRNAs 表达水平的变化。本研究从 2.3 中差异有统计学意义的 miRNAs 中选择了 let-7 家族成员 let-7a-5p、let-7e-5p、let-7f-5p 进行 qPCR 验证。结果发现,这 3 种 miRNAs 在外泌体中的分布水平远高于细胞($P < 0.05$),即 let-7a-5p、let-7e-5p 和 let-7f-5p 主要富集在外泌体中,而这种富集作用不受 OGD 刺激的影响。

此外,OGD 4 h 组外泌体中 let-7a-5p 表达水平高于对照组外泌体中的表达水平($P < 0.05$),而 let-7e-5p 和 let-7f-5p 的表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

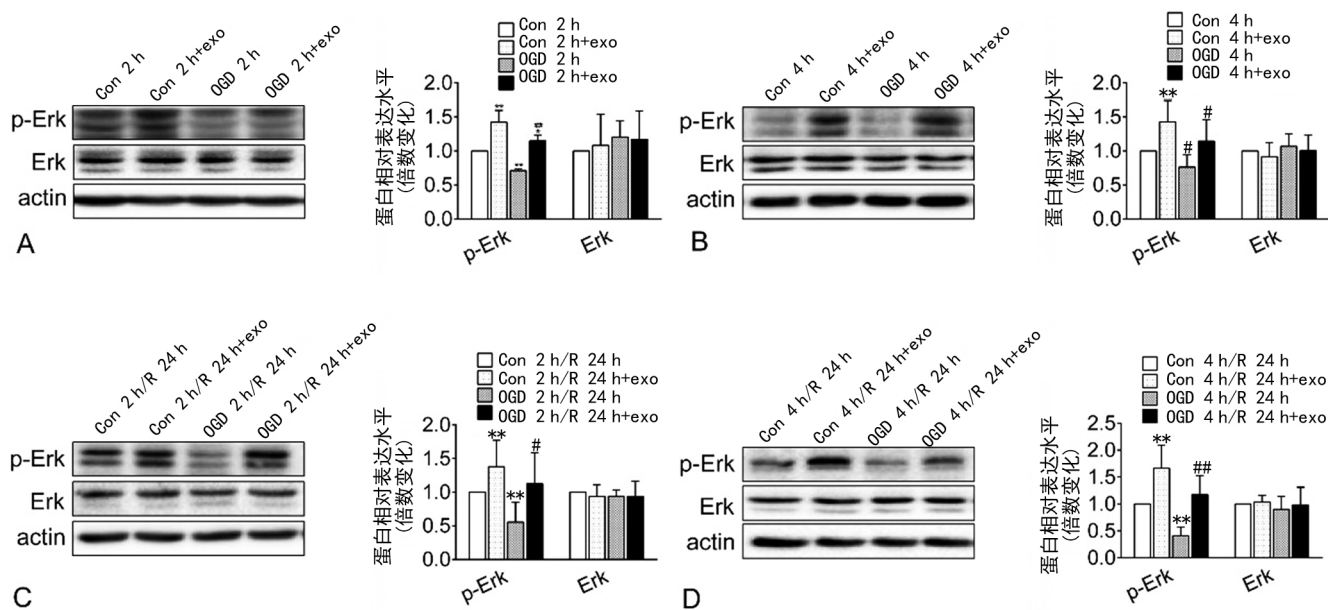


注:与对照组比较,** $P < 0.01$;Con exo 表示对照组外泌体;Con exo 表示 OGD 4 h 组外泌体。

图 1 miRNAs 的 qPCR 验证

2.5 KEGG 富集分析 从对照组、OGD 4 h 组和 OGD 4 h/R 24 h 组中分别挑选出高表达的 miRNAs (高于平均值),用 metascape 和 miRWalk 预测靶基因,挑选出共同的靶基因在 Webgestalt 中进行 KEGG 富集分析。3 组中,外泌体高表达 miRNAs 的靶基因所涉及的信号通路主要为代谢相关通路,如 PI3K-AKT、MAPK 和 mTOR 信号通路。3 组中外泌体 miRNAs 富集的信号通路基本相同,3 组中富集分析排列在第 1 位到第 9 位的信号通路全部相同;而在富集到的前 20 条信号通路中只有两条信号通路有所差别;3 组间存在少许差异,如 OGD 4 h 组中没有富集到 Wnt 信号通路,OGD 4 h/R 24 h 组中没有富集到 AMPK 信号通路。

2.6 星形胶质细胞外泌体和 OGD 处理对 SH-SY5Y 细胞 Erk 信号通路的影响 为了进一步验证外泌体和 OGD 处理对 2.5 中分析得到的信号通路的影响,选择了 MAPK/Erk 信号通路实验验证。分别提取了星形胶质细胞对照组、OGD 2 h 组、OGD 4 h 组、OGD 2 h/R 24 h 组、OGD 4 h/R 24 h 组分泌的外泌体,分别作用于相同处理的 SH-SY5Y 细胞,然后提取细胞总蛋白,对 p-Erk1、p-Erk2 蛋白和 Erk1、Erk2 蛋白表达进行测定。OGD 2 h 和 OGD 4 h 处理使 SH-SY5Y 细胞 p-Erk 水平下调($P < 0.05$),而给予 OGD 2 h 和 4 h 的星形胶质细胞外泌体则能逆转 OGD 2 h 和 4 h 诱导的 SH-SY5Y 细胞 p-Erk 水平的下调($P < 0.05$)。OGD 2 h/R 24 h 和 OGD 4 h/R 24 h 处理促使 SH-SY5Y 细胞 p-Erk 水平下调($P < 0.05$),而给予 OGD 2 h/R 24 h 和 OGD 4 h/R 24 h 处理的星形胶质细胞外泌体则能逆转 OGD 2 h/R 24 h 和 OGD 4 h/R 24 h 诱导的 SH-SY5Y 细胞 p-Erk 水平的下调($P < 0.05$)。此外,给予正常状态星形胶质细胞分泌的外泌体进行处理也能显著上调正常条件下培养的 SH-SY5Y 细胞的 p-Erk1、p-Erk2 水平($P < 0.05$)。见图 2。



注: Con 表示对照; exo 表示外泌体; 与对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OGD 或 CGD/R 处理组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; A、B 分别表示对细胞进行 OGD 2、4 h 处理; C、D 分别表示对细胞进行 OGD 2 h/R 24 h、OGD 4 h/R 24 h 处理。

图 2 OGD、OGD/R 及星形胶质细胞外泌体处理对 SH-SY5Y 细胞 MAPK/Erk 信号通路的影响

3 讨论

星形胶质细胞在缺血性脑卒中的发生、发展及后期的恢复过程中均发挥重要的调节作用。脑缺血后,在受影响脑区的星形胶质细胞是最早对缺血作出反应的细胞,形成反应性星形胶质细胞,通过大量突起、分泌胶质细胞来源递质及外泌体等与脑内其他细胞建立密切的信息联系^[13-15]。有文献报道,对星形胶质细胞做不同的处理会刺激细胞释放出具有不同生物学作用的外泌体。如使用 β -淀粉样蛋白作用于小鼠大脑皮层星形胶质细胞,会引起星形胶质细胞分泌富含神经酰胺和前列腺凋亡反应蛋白 4 的外泌体,这些外泌体可作用于星形胶质细胞自身及其周围神经元,促进星形胶质细胞和神经元的凋亡^[16]。而热应激则引起星形胶质细胞释放含有大量 Hsp/c70 的外泌体,该外泌体可能对星形胶质细胞周围神经元的存活起关键作用^[17]。

不同程度的 OGD 处理会造成不同程度的星形胶质细胞损伤,也可能导致星形胶质细胞增殖^[18-19]。OGD 处理不同时间导致的星形胶质细胞状态改变也对神经元产生保护或损伤的不同作用。这可能与不同时间 OGD 处理会促使星形胶质细胞递质、外泌体等释放的改变有关。在研究采用 OGD 4 h 处理星形胶质细胞后,其外泌体 miRNAs 表达谱发生了明显改变。其中 miRNAs let-7 家族成员,包括 let-7f-5p、let-7e-5p、let-7a-5p、let-7d-5p,以及 miR-98-5p 表达水平在 OGD 处理后上调。选取 let-7a-5p、let-7e-5p 和 let-7f-5p 进行 qPCR 验证,结果显示 OGD 处理上调了外泌体中 let-7a-5p 的表达水平。miRNAs let-7 家族是最早被研究的 miRNAs 之一,参与多种疾病的发生、发展,如癌症、炎症、免疫性疾病等^[20]。最近,有研究

发现 let-7 家族成员也参与了脑卒中的发生、发展,如 JIANG 等^[21]发现 miRNA let-7 参与调节酸敏感离子通道 1 α 的表达,继而可能影响脑卒中等疾病后脑神经功能的损伤和修复。有学者在 SD 大鼠短暂性大脑中动脉阻塞模型(tMCAO)和 tMCAO 加短暂性股动脉闭塞处理模型中发现 tMCAO 可诱导 let-7a 等 11 个 miRNAs 的上调;短暂性股动脉闭塞可能通过抑制 let-7a 等 miRNAs 的上调,发挥对 tMCAO 后脑组织的保护作用;而侧脑室注射 let-7a 模拟物可逆转短暂性股动脉闭塞对 tMCAO 后脑组织的保护作用^[22]。此外,有研究在 72 例急性期缺血性卒中患者中发现血清和脑脊液中 let-7e 表达水平显著升高,且具有高度一致性;血清 let-7e 作为缺血性脑卒中急性期生物标志物的特异度高达 73.4%,灵敏度为 82.8%^[23]。结合本研究的结果,笔者认为缺血可促进星形胶质细胞等神经细胞释放外泌体,而外泌体内含有的大量 miRNAs,包括 let-7 家族成员等释放进入循环系统。这也符合本研究的另一个发现,miRNAs 在星形胶质细胞内主要分布于外泌体中,而缺血后外泌体的释放会显著影响血清或脑脊液内 miRNAs 的水平。

处理结果中所列出的表达受影响的 miRNAs 外,绝大部分 miRNAs 表达水平均没有受 OGD 处理的影响。本研究将 3 组中高表达的 miRNAs 进行靶基因预测再进行 KEGG 富集分析,结果提示 OGD 4 h 处理对大部分星形胶质细胞外泌体 miRNAs 靶基因信号通路的影响不大,3 组间仅存在少许差异,如 OGD 4 h 组中没有富集到 Wnt 信号通路,OGD 4 h/R 24 h 组中没有富集到 AMPK 信号通路。选取 MAPK/Erk 信号通路做进一步的实验验证,发现来自对照组星形胶质细胞的外泌体处理对照组 SH-

SY5Y 细胞,或者来自 OGD 处理组和 OGD/R 处理组星形胶质细胞的外泌体均可以使对应处理的 SH-SY5Y 细胞的 p-Erk1、p-Erk2 水平上调,提示星形胶质细胞外泌体对 Erk 信号通路的调节可能是通过其 miRNAs 发挥作用的。此外,有文献报道 Erk 信号通路在突触形成和神经元可塑性中起重要作用^[24]。因此,笔者猜测,星形胶质细胞外泌体可能通过 miRNAs 介导的 Erk 信号通路调节神经元的可塑性。

综上所述,OGD 处理显著影响星形胶质细胞外泌体 miRNAs 的表达。正常对照组、OGD 和 OGD/R 处理组外泌体中高浓度分布的 miRNAs 均靶向作用于代谢相关通路,如 PI3K-AKT、MAPK 和 mTOR 等信号通路。

参考文献

- [1] LEE H G, WHEELER M A, QUINTANA F J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(5): 339-358.
- [2] VAUGHN M N, WINSTON C N, LEVIN N, et al. Developing biomarkers of mild traumatic brain injury: promise and progress of CNS-derived exosomes[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 698206.
- [3] HAJRASOULIHA A R, JIANG G, LU Q, et al. Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(39): 28058-28067.
- [4] BRACCIOLI L, VELTHOVEN C V, HEIJNEN C J. Exosomes: a new weapon to treat the central nervous system[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 113-119.
- [5] XIN H, LI Y, LIU Z, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2737-2746.
- [6] LI Y, LIU Z, XIN H, et al. The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke[J]. *Glia*, 2014, 62(1): 1-16.
- [7] CHEN J, YE X, YAN T, et al. Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats[J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3551-3558.
- [8] ZAGREAN A M, HERMANN D M, OPRIS I, et al. Multicellular crosstalk between exosomes and the neurovascular unit after cerebral ischemia: therapeutic implications[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 811.
- [9] GOETZL E J, SCHWAARTZ J B, ABNER E L, et al. High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease[J]. *Ann Neurol*, 2018, 83(3): 544-552.
- [10] LONG X, YAO X, JIANG Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 89.
- [11] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [12] CAO P, ZHANG J J, HUANG Y Y, et al. The age-related changes and differences in energy metabolism and glutamate-glutamine recycling in the D-gal-induced and naturally occurring senescent astrocytes in vitro[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 118: 9-18.
- [13] PEKNY M, WILHELMSSON U, TATLISUMAK T, et al. Astrocyte activation and reactive gliosis: a new target in stroke[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 689: 45-55.
- [14] PATABENDIGE A, SINGH A, JENKINS S, et al. Astrocyte activation in neurovascular damage and repair following ischaemic stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4280.
- [15] HIRA K, UENO Y, TANAKA R, et al. Astrocyte-derived exosomes treated with a semaphorin 3A inhibitor enhance stroke recovery via prostaglandin D2 synthase[J]. *Stroke*, 2018, 49(10): 2483-2494.
- [16] WANG G, DINKINS M, HE Q, et al. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD)[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 21384-21395.
- [17] TAYLOR A R, ROBINSON M B, GIFFORDORWA D J, et al. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases[J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 67(13): 1815-1829.
- [18] FERRER-ACOSTA Y, GONZALEZ-VEGA M N, RIVERA-APONTE D E, et al. Monitoring astrocyte reactivity and proliferation in vitro under ischemic-like conditions[J]. *J Vis Exp*, 2017, (128): 55108.
- [19] OU-YANG L, LIU Y, WANG B Y, et al. Carnosine suppresses oxygen-glucose deprivation/recovery-induced proliferation and migration of reactive astrocytes of rats in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(1): 24-34.
- [20] BERNSTEIN D L, JIANG X P, ROM S. Let-7 microRNAs: their role in cerebral and cardiovascular diseases, inflammation, cancer, and their regulation[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(6): 606.
- [21] JIANG Y Q, ZHA X M. MiR-149 reduces while let-7 elevates ASIC1a expression in vitro[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2017, 9(5): 147-152.
- [22] VINCIGUERRA A, CEPARULO P, ANZILOTTI S, et al. Remote postconditioning ameliorates stroke damage by preventing let-7a and miR-143 up-regulation[J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12174-12188.
- [23] PENG G P, YUAN Y, WU S S, et al. MicroRNA let-7e is a potential circulating biomarker of acute stage ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(6): 437-445.
- [24] TANG S, YASUDA R. Imaging ERK and PKA activation in single dendritic spines during structural plasticity[J]. *Neuron*, 2017, 93(6): 1315-1324.