

王玮玮,兰瑞,付雪琴,等. 星形胶质细胞外囊泡在缺血性脑卒中的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 116-123.
Wang WW, Lan R, Fu XQ, et al. Protective effect of astrocyte extracellular vesicles against ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 116-123.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.015

星形胶质细胞外囊泡在缺血性脑卒中的保护作用

王玮玮¹, 兰 瑞^{2*}, 付雪琴¹, 王漫漫¹, 邹旭欢¹, 张 勇³

(1.河南中医药大学, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000;
3.郑州大学, 郑州 450000)

【摘要】 缺血性脑卒中是指各种脑血管病变所致脑部血液供应障碍,导致局部脑组织缺血、缺氧性坏死,而迅速出现相应神经功能缺损的一类临床综合征,对病人本身、其家庭和社会造成很大的负担。星形胶质细胞外囊泡中包含有细胞生长因子、蛋白质、miRNAs 等多种成分,通过与内皮细胞受体结合、转移至神经元及被神经元摄取等方式参与脑细胞间通讯,促进脑缺血后神经发生、血管新生,对脑缺血后损伤的神经元有着保护作用,成为中枢神经系统疾病潜在的治疗和预防靶点。本文对星形胶质细胞外囊泡的内容物以及其对缺血性脑卒中的保护作用进行综述,以期为临床研究新的治疗策略提供理论依据。

【关键词】 星形胶质细胞;细胞外囊泡;缺血性脑卒中;保护作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0116-08

Protective effect of astrocyte extracellular vesicles against ischemic stroke

WANG Weiwei¹, LAN Rui^{2*}, FU Xueqin¹, WANG Manman¹, ZOU Xuhuan¹, ZHANG Yong³

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Ischemic cerebral stroke is a clinical syndrome in which various cerebrovascular diseases cause blood supply disorders in the brain, leading to ischemia and hypoxic necrosis of local brain tissue and corresponding neurological deficits rapidly appear. Astrocyte extracellular vesicles contain various growth factors, proteins, and miRNAs. By participating in communication between brain cells by binding to endothelial cell receptors, transferring to neurons, and being taken up by neurons, astrocyte extracellular vesicles promote neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischemia. Thus, astrocyte extracellular vesicles have a protective effect on neurons damaged after cerebral ischemia and are a potential target for treatment and prevention of central nervous system diseases. This article reviews the contents of astrocyte extracellular vesicles and their protective effects against ischemic stroke to provide a theoretical basis for clinical research of novel therapeutic strategies.

【Keywords】 astrocytes; extracellular vesicles; ischemic stroke; protective effect

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑卒中是造成全世界人类死亡和残疾的主要疾病之一,分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中,有研究指出,在 25 岁以后的终生脑卒中风险评估中,

中国的风险最高,意味着中国 25 岁以上人群终生患脑卒中的风险非常高^[1]。临床最常见的是缺血性脑卒中,约占所有脑卒中的 85%^[2],具有极高的病

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81973618,81503422);河南省自然科学基金项目 (202300410399)。

【作者简介】 王玮玮 (1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。E-mail:Wweiwei2121@ 163.com

【通信作者】 兰瑞 (1984—),女,博士,副主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。E-mail:lanrui0312@ 163.com

死率和致残率,不仅影响患者自身的生活质量、并对其家庭和社会发展造成负担。目前治疗缺血性脑卒中的主要方法是溶栓和取栓,但由于时间窗和出血问题,其应用有一定的局限性。星形胶质细胞在大脑中可以释放包含多种成分的细胞外囊泡,通过多种方式参与胶质细胞与神经元间的通讯,对神经元的生理功能以及病理过程有重要作用,是预防和治疗中枢神经系统疾病的潜在靶点。本文主要综述星形胶质细胞外囊泡对缺血性脑卒中的保护作用,以期为研究新的治疗策略提供理论依据。

1 星形胶质细胞外囊泡

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是包括星形胶质细胞在内的多种细胞分泌到细胞外的双膜封闭、纳米大小的囊泡^[3],包括脱落微囊泡(microvesicles, MVs)、外泌体(exosomes, Exos)及凋亡小体,可以跨越血脑屏障,在胶质细胞与神经元间的通讯发挥重要作用^[4]。星形胶质细胞 EVs 平均大小为 150~500 nm^[5],其中 Exos 大小为 30~150 nm, MVs 为 100~1000 nm^[6]。目前大多数研究者的关注集中在 MVs 和 Exos 上。星形胶质细胞释放的细胞外囊泡是星形胶质细胞与神经元、内皮细胞等之间的通讯媒介,其通过转运脑内细胞的核酸、蛋白质、脂质等参与各种生物过程^[7]。在正常/静息情况下,星形胶质细胞释放的 EVs 能够调节突触生长、促进血管生成并保护神经元^[3,8]。缺血性脑卒中发生后,大脑会经历血管新生、神经发生等重塑事件,使有限的自发功能恢复^[9-10],星形胶质细胞来源的细胞外囊泡能够在脑缺血后参与这些生物过程,对细胞产生保护作用,抑制脑细胞凋亡,诱导血管重塑和再生以及神经发生来保护缺血性脑损伤^[11]。

2 星形胶质细胞外囊泡内容物及其在缺血性脑卒中的保护作用

2.1 成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子

星形胶质细胞释放的 EVs 中含有成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),两者都是血管生成因子,且属于 MVs 范畴,Proia 等^[5],在缺血性脑卒中后通过与内皮细胞上受体结合促进血管生成和神经发生等,保护缺血性脑损伤。

FGF-2 是一种潜在的血管生成因子^[12],是中枢

神经系统发育的核心^[13]。在缺血性脑卒中发生后,星形胶质细胞来源的 FGF-2 在应激后使海马齿状回亚颗粒带(subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus, SGZ)的神经发生增强^[14]。FGF-2 受体之一的成纤维细胞生长因子受体-1(fibroblast growth factor receptor-1, FGFR-1)在 SGZ 的神经干细胞中也高表达,FGFR-1 通过与 FGF-2 结合相互作用,刺激细胞增殖,促进神经元发育^[15],两者相互作用还可以形成一个转录调控复合体,调控细胞分化^[16],促进缺血后神经发生。

VEGF 在大脑中介导血管生成、神经发生、突触发生和突触可塑性^[17-20],已被确定为缺血后血管生成的中心介质^[21]。在实验性脑缺血后半暗带可以观察到 VEGF 表达显著增加^[21-22],星形胶质细胞来源的 VEGF 与其附近血管内皮细胞上的受体(vascular endothelial growth factor receptors, VEGFR)结合,由于 VEGFR-1 与 VEGF 结合发挥诱饵作用而调节 VEGF,用于激活 VEGFR-2,所以主要由 VEGFR-2 介导激活细胞内酪氨酸激酶并触发促进血管生成的多个下游信号,如 PI3K(phosphatidylinositol-3 kinase)/Akt 和 MEK(mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase)/ERK(extracellular-signal-regulated kinase)通路,直接启动血管生成反应,促进血管新生^[23-24]。

在细胞模型实验中,Proia 等^[5]建立了一个三细胞(神经元、星形胶质细胞、脑毛细血管内皮细胞)共培养系统,在不同类型的细胞之间不允许物理接触的情况下,神经元和星形胶质细胞协同诱导脑毛细血管内皮细胞形成了具有类似于生理血脑屏障的通透性的单层,表明细胞之间没有物理接触时,会释放可溶性因子促进细胞间交流;进而在培养的星形胶质细胞中,发现其释放了含有 FGF-2、VEGF 的胞外囊泡,正是这种可溶性因子影响了内皮细胞。综上所述,星形胶质细胞 EVs 中的生长因子是通过胞外囊泡释放并与内皮细胞上的受体结合促进缺血区的神经发生和血管生成,作用过程见表 1。

2.2 热休克蛋白

星形胶质细胞也可通过 EVs 中的 Exos 向细胞外空间释放细胞保护性热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)^[25]。缺血性脑卒中后,氧化应激反应发生,ERK 和 PI3K/Akt 通路被激活,介导星形胶质细胞释放 HSP70,虽然 JNK(c-jun N-terminal kinase)信号抑制 HSP70 的释放^[25],但最终导致星

形胶质细胞释放的 HSP70 增多,并从 Exos 中释放出来^[26],星形胶质细胞 Exos 通过转移 HSP70 增加缺血区 HSP70 的表达,HSP70 与内皮细胞 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)相互作用,促进 Exos 跨越血脑屏障,与此同时,Exos 介导的 HSP70 通过激活紧密连接蛋白(tight junction protein, TJP)减少氧自由基的积聚,因此能够抑制线粒体介导的神经细胞凋亡,减轻血脑屏障的损伤,从而在缺血性脑卒中后发挥神经保护和功能改善作用^[25,27],作用过程见表 1。

Jiang 等^[27]证实,星形胶质细胞 Exos 通过抑制 ROS 介导的线粒体凋亡信号通路,减少了脑缺血再灌注损伤模型小鼠脑梗塞体积和神经功能损伤;随后使用抑制剂 VER155008 阻断胞外体 HSP70 的表达,将经抑制剂 VER155008 预处理的 Exos 注射到 MCAO/R (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)小鼠。结果显示,与经注射预处理 Exos 的 MCAO/R 组小鼠相比,未注入预处理 Exos 的小鼠缺血区 HSP70 的表达显著增加,说明 Exos 介导的 HSP70 特异性转移诱导了缺血区 HSP70 的过度表达。且当阻断 HSP70 时,ROS 产生显著增加,线粒体膜电位降低,表明 HSP70 通过参与 Exos 介导的途径,使氧自由基减少和促进线粒体膜完整性的恢复来保护缺血区神经功能损伤。

2.3 载脂蛋白

载脂蛋白 D (apolipoprotein-D, Apo-D) 是一种神经保护蛋白^[28]。缺血性脑卒中发生时,神经损伤导致自由基的产生增加、清除下降,进而氧化还原失衡,导致氧化应激发生,Apo-D 的保护机制是通过控制脂质过氧化水平来介导的^[29],Apo-D 通过将产生自由基的脂质过氧化物还原为惰性氢氧化物^[30],保护和修复因氧化应激反应受损的膜,使细胞存活。星形胶质细胞来源的 EVs 含有 Apo-D,且主要分布在其 Exos 中^[31]。

Yin 等^[32]通过系统的遗传和生化分析,确定果蝇胶质 Lazarillo (Glial Lazarillo, Glaz) 是一种星形胶质细胞来源的分泌型脂蛋白,与果蝇脂蛋白受体 1 的脑特异性短亚型 (brain-specific short isoforms of drosophila lipophorin receptor 1, LpR1-short) 相结合,其结合支持发育中的幼虫脑树突状细胞发育、促进突触传递并平衡脂质。由于 Glaz 是人类 Apo-D 的同源物,且 Glaz 和 Apo-D 的功能和生化特性具有相似性,而 LpR1-short 是果蝇神经元受体,因此研究者

对果蝇 Glaz-LpR1 相互作用的发现有助于识别人类星形胶质细胞分泌至 Exos 中 Apo-D 与神经元中的脂蛋白受体相结合的过程,进而发挥 Apo-D 在脑缺血后氧化应激反应中的保护作用,减少自由基的产生,使细胞存活,作用过程参见表 1。

2.4 朊蛋白

朊蛋白 (prion protein, PrP) 是一种细胞表面糖蛋白,是氧化应激的感受器^[33]。正常功能的 PrP 与神经元表面神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) 结合,参与 NCAM 介导的信号转导,调节神经元-星形胶质细胞相互作用,参与轴突生长,触发神经发生^[34-36],其对缺血性脑卒中也具有神经保护作用^[37-38]。

星形胶质细胞释放的 EVs 中含有功能性 PrP^[39],在缺血性脑卒中后释放增加,能够促进脑缺血损伤后的神经元存活。Guitart 等^[39]将神经元和星形胶质细胞共同培养在低氧或过氧化氢诱导的氧化应激条件中,结果显示,与单独培养的野生型神经元相比,与星形胶质细胞共培养的神经元在低氧或过氧化氢存在的条件下的存活率均提高;而在与缺乏 PrP 的星形胶质细胞共培养时,神经元的存活率相比其与野生型星形胶质细胞共培养时的存活率降低。这些结果表明,星形胶质细胞源性 PrP 参与神经元对氧化和缺氧应激的保护作用。进而研究者用两种不同的 PrP 抗体与氧/葡萄糖剥夺 (oxygen/glucose deprivation, OGD) 应激野生型星形胶质细胞的 Exos 孵育后,对 PrP 缺乏的小脑神经元进行免疫染色。结果显示,孵育后,PrP 两种抗体在 PrP 缺乏的神经元内都检测到了强烈的点状 PrP 免疫染色,而在模拟处理 PrP 缺失的神经元后,没有检测到 PrP 免疫染色,提示小脑神经元摄取携带 PrP 的 Exos。所以,当星形胶质细胞在缺氧或缺血条件下时,其释放携带 PrP 的 Exos,被神经元摄取后,PrP 触发信号转导通路,调节抗氧化系统和细胞凋亡,提高神经元的存活率,起到对缺血区神经保护作用,作用过程参见表 1。

由于层粘连蛋白受体 (laminin receptor) 在多个实验中证明与 PrP 共定位、与 PrP 相结合,表明层粘连蛋白受体在其他细胞摄取 PrP 时中发挥作用^[40-42],神经元摄取 Exos 中的 PrP 过程可能也与层粘连蛋白受体有关。

2.5 突触素

突触素 I (Synapsin I, 以下简称突触素) 是一种新

的寡聚甘露糖结合凝集素^[43],一种神经元特异性突触囊泡相关蛋白,能够调节神经元突起的延伸,形成和维持突触连接,与神经发育和突触传递有关^[44]。神经元过度活跃或氧化应激增加时,星形胶质细胞通过 Exos 释放突触素,与神经元表面携有寡聚甘露糖的 NCAM 相结合,以一种寡聚甘露糖依赖的方式参与神经元-胶质细胞相互作用,形成和/或维持血脑屏障,促进轴突生长和神经元存活^[43,45-46]。

Wang 等^[43]将孤立的 Exos 暴露在高浓度 K^+ 下,直到在 80 mmol/L KCl 存在的情况下,在上清中发现大量突触素,即高 KCl 浓度可导致神经胶质源 Exos 突触素的释放。当缺血性脑卒中发生时,在大脑扩散抑制 (spreading depression, SD) 波的传播中, KCl 浓度可达到 80 mmol/L^[47],而氧化应激也会导致细胞外 KCl 浓度增加,进而导致星形胶质细胞分泌突触素并通过 Exos 释放至细胞外,介导神经保护功能^[48]。Wang 等^[43]让培养的皮层神经元分别生长在底物包被突触素或对照底物 PLL (poly-L-lysine, 多聚赖氨酸) 上,在过氧化氢存在的条件下测定到两种底物上的神经细胞死亡增加,但突触素涂层上的神经元存活率比对照底物 PLL 上的增加。这一结果表明,细胞外突触素能够在氧化应激时保护神经元。进而将生长在底物包被突触素或对照底物 PLL 上的大脑皮层神经元在没有或存在可溶性突触素的情况下进行 OGD 处理,测定结果显示,生长在底物包被突触素和/或存在可溶性突触素的神经元在 OGD 时的存活率高于生长在 PLL 上的神经元,即在细胞外,星形胶质细胞 Exos 内的突触素 I 能够保护神经元免受氧化应激损伤,在 OGD 情况下,促进神经元存活,作用过程参见表 1。

2.6 谷氨酸转运体

星形胶质细胞释放的 EVs 中,存在功能性谷氨酸转运体兴奋性氨基酸转运体 (excitatory amino-acid transporters, EAAT) 如 EAAT-1、EAAT-2,并存在于 MVs 中,可以促进谷氨酸转运体的跨细胞转移,维持神经稳态^[49]。

缺血性脑卒中发生时,血液供应减少,从而使大脑缺氧和葡萄糖不足,导致 ATP 生成的减少,而造成 Na^+ - K^+ -ATP 酶的活性下降,随后神经元和神经胶质细胞膜上的 Na^+ 和 K^+ 梯度下降。 Na^+ 和 K^+ 梯度的破坏使转运体的浓缩能力降低,进而导致细胞外谷氨酸浓度升高^[50-51]。这时通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活化的调节,反应性星形胶

质细胞释放的 MVs 中 EAAT 含量增加。EAAT 利用 Na^+ - K^+ -ATP 酶产生的 Na^+ 的电化学浆梯度结合并转运谷氨酸至胞内,由谷氨酰胺合成酶将其转化为谷氨酰胺,再次进入突触前神经元进行再循环,而进入胞内的 Na^+ 与 K^+ 置换,维持离子浓度平衡。综上,EAAT 参与谷氨酸浓度调节,保持细胞外谷氨酸低浓度,同时稳定细胞内外 Na^+ 、 K^+ 浓度,维持神经稳态^[34],作用过程参见表 1。

谷氨酸转运功能失调可引起神经毒性,EAAT 在参与清除突触释放的细胞外谷氨酸时,清除速率也影响神经保护功能^[50,52]。在清除突触释放的胞外谷氨酸时,谷氨酸在运输过程中可能与另一个邻近的 EAAT 重新结合,EAAT 充当释放谷氨酸的缓冲器。这一过程确保谷氨酸可以非常迅速地从突触中清除,防止受体长时间激活^[50]。谷氨酸从突触前末端释放后,可与突触前 EAAT 结合,激活转运体固有的氯离子通道,导致了神经元的超极化,并起到负反馈回路的作用,阻止细胞内谷氨酸的向外释放。因此转运体不仅去除谷氨酸,而且还阻止随后的谷氨酸释放^[53],作用过程参见表 1。

2.7 微小核糖核酸 (miRNAs)

星形胶质细胞来源 EVs 及其所含 miRNAs 能够介导星形胶质细胞与神经元之间的通讯^[54]。星形胶质细胞 EVs 携带多种 miRNAs,通过运送细胞间的 miRNA,改变受体细胞的生理功能。星形胶质细胞通过这些 miRNAs 参与监测或改变突触功能以控制突触传递,影响神经元轴突生长^[55-56]。

许多 miRNAs 可能在多种神经系统疾病中也发挥重要作用^[57-58],例如星形胶质细胞 EVs 携带的 miRNAs 可抑制缺血性脑卒中后的神经元凋亡。氧化应激是缺氧缺血性脑损伤的关键因素^[59]。在缺血性脑卒中发生时,伴随着氧化应激反应,炎症因子被激活且水平上升,如 IL-1 β 和 TNF- α 。进而在 IL-1 β 或 TNF- α 刺激的星形胶质细胞释放的 EVs 中发现两种富集的 miRNAs,即 miR-125a-5p 和 miR-16-5p,其可以下调神经元中的神经营养受体酪氨酸激酶 3 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 3, NTRK3) 和 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2),作为神经元靶标,NTRK3 和 Bcl-2 表达的减少减缓了发育中神经元的树突生长,简化了成熟神经元的树突复杂性,并降低了神经元的兴奋性。而抑制神经元的兴奋性,是对脑部炎症的一种保护性反应^[34,56],作用过程参见表 1。

表 1 星形胶质细胞外囊泡内容物参与保护缺血性脑卒中的作用过程

内容物 Contents	与受体细胞结合方式 Mode of binding to recipient cells	脑缺血损伤后作用过程 Process of action after cerebral ischemic injury
成纤维细胞生长因子-2 FGF-2	与内皮细胞表面受体结合 Binds to endothelial cell surface receptors	在可溶性 EVs 中与 FGFR1 结合刺激细胞增殖,促进神经元发育;调控细胞分化,促进缺血后神经发生。 Binding to FGFR1 in soluble EVs stimulates cell proliferation and promotes neuronal development; Regulates cell differentiation and promotes neurogenesis after ischemia.
血管内皮生长因子 VEGF		在可溶性 EVs 中与 VEGFR-1-2 结合,触发促血管生成的 PI3K/Akt 和 MEK / ERK 通路,促进血管新生。 Binding to VEGFR-1-2 in soluble EVs, triggering the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways that promote angiogenesis, promoting angiogenesis.
热休克蛋白 70 HSP70	特异性转移 Specific metastases	脑缺血后转移至缺血区与内皮细胞 TLR4 相互作用激活 TJP 减少活性氧的积累。 After cerebral ischemia, it metastasizes to the ischemic area, interacts with endothelial cells TLR4 to activate TJP, reduces the accumulation of reactive oxygen species.
载脂蛋白 D Apo-D	与神经元中的脂蛋白受体结合 Binds to lipoprotein receptors in neurons	与受体结合将产生自由基的脂质过氧化物还原为惰性氢氧化物,保护和修复因氧化应激反应受损的膜。 Binding to the receptor reduces free radical-producing lipid peroxides to inert hydroxides, protecting and repairing membranes damaged by oxidative stress.
朊蛋白 PrP	被神经元摄取(可能与层粘连蛋白受体有关) Uptake by neurons (may be related to laminin receptors)	PrP 触发信号转导通路,调节抗氧化系统和细胞凋亡,提高神经元的存活率(具体信号通路尚不明确)。 PrP triggers signal transduction pathways, regulates antioxidant systems and apoptosis, and improves neuronal survival (the specific signaling pathway is not yet clear).
突触素 I Synapsin I	与 NCAM 结合 Combined with NCAM	脑缺血后参与神经元-胶质细胞相互作用,形成和/或维持血脑屏障,促进轴突的生长;且实验证明在突触素包被下神经元存活率升高(机制尚不明确)。 After cerebral ischemia, it participates in neuron-glial cell interactions, forms and / or maintains the blood-brain barrier, promotes the growth of axons. And experiments have shown that the survival rate of neurons is increased under synaptophytin coating (the mechanism is not clear).
兴奋性氨基酸转运体 EAAT	与胞外谷氨酸结合 Binds to extracellular glutamic acid	①EAAT 利用 Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶产生 Na ⁺ 的电化学浆梯度结合并转运谷氨酸至胞内,维持离子稳态;②EAAT 能够提高胞外谷氨酸清除速率,减少神经毒性。 ① EAAT uses the electrochemical plasma gradient of Na ⁺ produced by Na ⁺ -K ⁺ -ATPase to bind and transport glutamate to the cell to maintain ion homeostasis; ② EAAT can increase the clearance rate of extracellular glutamate and reduce neurotoxicity.
微小核糖核酸 miRNAs	转移至神经元或被神经元内化 Transfer to neurons or internalized by neurons	miR-125a-5p 和 miR-16-5p 下调神经元中的 NTRK 和 Bcl-2 的表达减缓发育中神经元的树突生长,降低了神经元的兴奋性。 miR-125a-5p and miR-16-5p downregulate the expression of NTRK and Bcl-2 in neurons to slow down dendritic growth in developing neurons and reduce the excitability of neurons. miR-190b 通过调节 HT-22 自噬、miR-17-5p 通过下调 BNIP2 的表达,来抑制 OGD 诱导的神经元凋亡。 miR-190b inhibits OGD-induced apoptosis by regulating HT-22 autophagy and miR-17-5p by downregulating BNIP2 expression. miR-34c 通过下调 NF-κB/MAPK 通路和靶向 TLR7 来抑制 I/R 所致的炎症反应,对缺血性脑损伤具有神经保护作用。 miR-34c inhibits the I/R-induced inflammatory response by downregulating the NF-κB/MAPK pathway and targeting TLR7, and has a neuroprotective effect on ischemic brain injury.

自噬是一种重要的拯救机制,负责持续清除溶酶体中不必要的细胞器或错误折叠的蛋白质,并维持分化、重塑和细胞内稳态^[60],在缺血性脑卒中后病理中有重要作用。有实验表明,在 OGD 的模拟缺血损伤条件下,星形胶质细胞来源的 Exos 含有 miR-190b,能够通过调节自噬来抑制 OGD 诱导的神经元凋亡^[61]。自噬相关基因 7 (autophagy-related gene 7, Atg7) 是 miR-190b 的假定靶点。星形胶质细胞 Exos 介导的 miR-190b 的转移通过靶向 Atg7 调节 HT-22(小鼠海马神经元细胞)细胞自噬,显著降低了 OGD 诱导的促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 的表达水平,而上调 OGD 抑制的抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,从而减少 OGD 诱导的神经元凋亡^[62],减小缺血性脑损伤。Du 等^[63]研究显示,星形胶质细胞来源的 Exos 含有 miR-17-5p, BNIP2 是促凋亡 BNIP 家族的成员,星形胶质细胞 Exos 中的 miR-17-5p 被神经元内化后,通过下调 BNIP2 的表达,抑制 OGD 诱导的神经细胞凋亡和炎症,保护缺血性脑损伤,作用过程参见表 1。

星形胶质细胞来源的 Exos 中还含有 miR-34c, miR-34c 具有神经保护作用,miR-34c 表达的显著降低使 Exos+miR-34c 抑制剂组大鼠神经功能缺失程度高于 Exos+空白组,且 Exos+miR-34c 抑制剂组大鼠脑内炎症细胞因子水平显著升高。miR-34c 与 TLR7(Toll-like receptor 7, TLR7) 之间存在靶向关系,星形胶质细胞来源的 Exos 转运 miR-34c,通过下调 NF- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/MAPK (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路和靶向 TLR7 来抑制 I/R(ischemia/reperfusion, I/R) 所致的炎症反应,对缺血性脑损伤具有神经保护作用^[64],作用过程参见表 1。

3 小结及展望

EVs 因其可透过血脑屏障,故在脑部疾病的诊疗中具有重要的潜在价值。在缺血性脑卒中发生后,星形胶质细胞释放的外囊泡内含大量神经保护物质,促进脑缺血后的血管再生,保护神经元,减少神经元死亡。细胞外囊泡可以通过受体-配体的相互作用诱导信号传递,或通过内吞和/或吞噬作用内化,或通过靶向细胞膜融合将内容物传递到靶细胞的胞浆^[65]而产生作用。星形胶质来源的细胞外囊泡也可通过这些方式将装载的神经保护物质运输至受体细胞,发挥递送生物分子的作用,改变受

体细胞的生理状态。

近些年来,研究者们致力在细胞外囊泡中装载外源生物分子,特别是 miRNAs^[66]。由于内源性 miRNAs 在人体内容易受到内环境退化的影响,失去生物活性,限制了其临床应用^[67]。而细胞外囊泡作为一种很有前途的治疗性 miRNA 输送载体,它们的优势在于体积小,易于包装,并且可以防止酶降解^[68],充分发挥细胞外囊泡的治疗潜力,有实验也证实了其可行性^[66,69-70]。为临床上利用细胞外囊泡作为药物载体,外源调控其组成,向人体输送药物治疗神经系统疾病提供了新的思路。但目前对星形胶质细胞外囊泡中神经保护物质的调节机制,以及其在体内的分子机制尚未完全明确,缺乏对其调节及作用机制的阐述,所以目前将其作为药物载体,人为调控其组成发挥其治疗作用仍存在局限性,需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016 [J]. N Engl J Med, 2018, 379(25): 2429-2437.
- [2] Sarvari S, Moakedi F, Hone E, et al. Mechanisms in blood-brain barrier opening and metabolism-challenged cerebrovascular ischemia with emphasis on ischemic stroke [J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(6): 851-868.
- [3] Holm MM, Kaiser J, Schwab ME. Extracellular vesicles: multimodal envoys in neural maintenance and repair [J]. Trends Neurosci, 2018, 41(6): 360-372.
- [4] Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication [J]. Front Cell Neurosci, 2013, 7: 182.
- [5] Proia P, Schiera G, Mineo M, et al. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor [J]. Int J Mol Med, 2008, 21(1): 63-67.
- [6] Vidal M. Exosomes: revisiting their role as “garbage bags” [J]. Traffic, 2019, 20(11): 815-828.
- [7] Xia X, Wang Y, Huang Y, et al. Exosomal miRNAs in central nervous system diseases: biomarkers, pathological mediators, protective factors and therapeutic agents [J]. Prog Neurobiol, 2019, 183: 101694.
- [8] You Y, Borgmann K, Edara VV, et al. Activated human astrocyte-derived extracellular vesicles modulate neuronal uptake, differentiation and firing [J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1): 1706801.
- [9] Nudo RJ. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery [J]. Stroke, 2007, 38(2): 840-845.
- [10] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments [J]. Neuron, 2010, 67(2): 181-198.

- [11] Khan H, Pan JJ, Li Y, et al. Native and bioengineered exosomes for ischemic stroke therapy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 619565.
- [12] Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes [J]. *Adv Cancer Res*, 1992, 59: 115-165.
- [13] Woodbury ME, Ikezu T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, 9(2): 92-101.
- [14] Kirby ED, Murry SE, Sun WG, et al. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2 [J]. *Elife*, 2013, 2: e00362.
- [15] Stachowiak EK, Fang X, Myers J, et al. CAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) [J]. *J Neurochem*, 2003, 84(6): 1296-1312.
- [16] Fang X, Stachowiak EK, Dunham-Ems SM, et al. Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: a novel mechanism of gene regulation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(31): 28451-28462.
- [17] Tillo M, Ruhrberg C, Mackenzie F. Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(6): 541-546.
- [18] Newton SS, Duman RS. Regulation of neurogenesis and angiogenesis in depression [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2004, 1(3): 261-267.
- [19] Fournier NM, Duman RS. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(2): 440-449.
- [20] Shim JW, Madsen JR. VEGF signaling in neurological disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 275.
- [21] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(3): 965-976.
- [22] Hayashi T, Abe K, Suzuki H, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 1997, 28(10): 2039-2044.
- [23] Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5): 481-496.
- [24] Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 954-959.
- [25] Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, et al. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases [J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 67(13): 1815-1829.
- [26] Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, et al. Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(42): 9735-9745.
- [27] Jiang Y, He R, Shi Y, et al. Plasma exosomes protect against cerebral ischemia/reperfusion injury via exosomal HSP70 mediated suppression of ROS [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117987.
- [28] Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress [J]. *Aging Cell*, 2008, 7(4): 506-515.
- [29] Bajo-Graneras R, Ganfornina MD, Martin-Tejedor E, et al. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems [J]. *Glia*, 2011, 59(10): 1551-1566.
- [30] Bhatia S, Knoch B, Wong J, et al. Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease [J]. *Biochem J*, 2012, 442(3): 713-721.
- [31] Pascua-Maestro R, González E, Lillo C, et al. Extracellular vesicles secreted by astroglial cells transport apolipoprotein D to neurons and mediate neuronal survival upon oxidative stress [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 526.
- [32] Yin J, Spillman E, Cheng ES, et al. Brain-specific lipoprotein receptors interact with astrocyte derived apolipoprotein and mediate neuron-glia lipid shuttling [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2408.
- [33] Onodera T, Sakudo A, Tsubone H, et al. Review of studies that have used knockout mice to assess normal function of prion protein under immunological or pathophysiological stress [J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(7): 361-374.
- [34] Upadhyay R, Zingg W, Shetty S, et al. Astrocyte-derived extracellular vesicles: neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders [J]. *J Control Release*, 2020, 323: 225-239.
- [35] Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, et al. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein [J]. *J Mol Biol*, 2001, 314(5): 1209-1225.
- [36] Santucci A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, et al. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(2): 341-354.
- [37] Weise J, Doeppner TR, Müller T, et al. Overexpression of cellular prion protein alters postischemic Erk1/2 phosphorylation but not Akt phosphorylation and protects against focal cerebral ischemia [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2008, 26(1): 57-64.
- [38] Weise J, Sandau R, Schwarting S, et al. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury [J]. *Stroke*, 2006, 37(5): 1296-1300.
- [39] Guitart K, Loers G, Buck F, et al. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein [J]. *Glia*, 2016, 64(6): 896-910.
- [40] Vana K, Weiss S. A trans-dominant negative 37 kDa/67 kDa laminin receptor mutant impairs PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells [J]. *J Mol Biol*, 2006, 358(1): 57-66.
- [41] Zuber C, Mitteregger G, Pace C, et al. Anti-LRP/LR antibody W3 hampers peripheral PrPSc propagation in scrapie infected

- mice [J]. *Prion*, 2007, 1(3): 207–212.
- [42] Kolodziejczak D, Da Costa Dias B, Zuber C, et al. Prion interaction with the 37-kDa/67-kDa laminin receptor on enterocytes as a cellular model for intestinal uptake of prions [J]. *J Mol Biol*, 2010, 402(2): 293–300.
- [43] Wang S, Cesca F, Loers G, et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(20): 7275–7290.
- [44] Fornasiero EF, Bonanomi D, Benfenati F, et al. The role of synapsins in neuronal development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(9): 1383–1396.
- [45] Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(3): 195–208.
- [46] Heller M, von der Ohe M, Kleene R, et al. The immunoglobulin-superfamily molecule basigin is a binding protein for oligomannosidic carbohydrates: an anti-idiotypic approach [J]. *J Neurochem*, 2003, 84(3): 557–565.
- [47] Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, et al. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(1): 17–35.
- [48] Enger R, Dukefoss DB, Tang W, et al. Deletion of Aquaporin-4 curtails extracellular glutamate elevation in cortical spreading depression in awake mice [J]. *Cereb Cortex*, 2017, 27(1): 24–33.
- [49] Gosselin RD, Meylan P, Decosterd I. Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 251.
- [50] Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(4): 1621–1657.
- [51] Allen NJ, Kárádóttir R, Attwell D. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 449(2): 132–142.
- [52] Fontana AC. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression [J]. *J Neurochem*, 2015, 134(6): 982–1007.
- [53] Veruki ML, Mørkve SH, Hartveit E. Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(11): 1388–1396.
- [54] Duarte A, Henzi R, Fernández A, et al. Astrocyte-derived small extracellular vesicles regulate dendritic complexity through miR-26a-5p activity [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 930.
- [55] Datta Chaudhuri A, Dasgheyb RM, DeVine LR, et al. Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability [J]. *Glia*, 2020, 68(1): 128–144.
- [56] Chaudhuri AD, Dastgheyb RM, Yoo SW, et al. TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 363.
- [57] Sun Z, Yu JT, Jiang T, et al. Genome-wide microRNA profiling of rat hippocampus after status epilepticus induced by amygdala stimulation identifies modulators of neuronal apoptosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78375.
- [58] Ma F, Zhang X, Yin KJ. MicroRNAs in central nervous system diseases: a prospective role in regulating blood-brain barrier integrity [J]. *Exp Neurol*, 2020, 323: 113094.
- [59] Mafeld S, Littler P, Hayhurst H, et al. Liver resection after selective internal radiation therapy with yttrium-90: safety and outcomes [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(1): 152–158.
- [60] Dohi E, Tanaka S, Seki T, et al. Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(4): 431–442.
- [61] Pei X, Li Y, Zhu L, et al. Astrocyte-derived exosomes suppress autophagy and ameliorate neuronal damage in experimental ischemic stroke [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(2): 111474.
- [62] Pei X, Li Y, Zhu L, et al. Astrocyte-derived exosomes transfer miR-190b to inhibit oxygen and glucose deprivation-induced autophagy and neuronal apoptosis [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(8): 906–917.
- [63] Du L, Jiang Y, Sun Y. Astrocyte-derived exosomes carry microRNA-17-5p to protect neonatal rats from hypoxic-ischemic brain damage via inhibiting BNIP-2 expression [J]. *Neurotoxicology*, 2021, 83: 28–39.
- [64] Wu W, Liu J, Yang C, et al. Astrocyte-derived exosome-transported microRNA-34c is neuroprotective against cerebral ischemia/reperfusion injury via TLR7 and the NF- κ B/MAPK pathways [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 163: 84–94.
- [65] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226–1232.
- [66] Pomatto MAC, Bussolati B, D'Antico S, et al. Improved loading of plasma-derived extracellular vesicles to encapsulate antitumor miRNAs [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13: 133–144.
- [67] Qian H, Tay CY, Setyawati MI, et al. Protecting microRNAs from RNase degradation with steric DNA nanostructures [J]. *Chem Sci*, 2017, 8(2): 1062–1067.
- [68] Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, et al. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 10.
- [69] de Abreu RC, Ramos CV, Becher C, et al. Exogenous loading of miRNAs into small extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10): e12111.
- [70] Castaño C, Kalko S, Novials A, et al. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(48): 12158–12163.