

骨髓间充质干细胞源性外泌体促进小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化抑制急性期脑缺血大鼠炎症反应

孙逸梅, 毛诗慧, 李琳, 江伟锋, 储利胜*

(浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053)

摘要 为探究骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)源性外泌体(exosomes, Exos)对急性期脑缺血大鼠小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 极化的影响, 采用超高速离心法分离提取外泌体并鉴定; 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型; 采用 Longa 评分和角实验评价大鼠神经功能, 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazole chloride, TTC)染色检测大鼠脑梗死体积; 采用 CD16/32/Iba1、CD206/Iba1 免疫荧光双标法检测小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 表型; 采用 RT-qPCR 检测大鼠脑缺血周边区 CD86、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)的 mRNA 表达。实验结果表明, BMSC-Exos 减少缺血周边区 CD16/32⁺/Iba1⁺阳性细胞数量($P < 0.01$), 增加 CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞数量($P < 0.01$), 减少 iNOS、CD86 和 TNF- α 的 mRNA 表达, 增加 Arg-1、TGF- β 和 IL-10 的 mRNA 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。本研究提示 BMSC-Exos 调控急性期脑缺血大鼠小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 极化, 减轻神经炎症, 改善脑缺血损伤。

关键词 脑缺血; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 小胶质细胞/巨噬细胞; 极化

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)05-0599-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023041703

引用本文 孙逸梅, 毛诗慧, 李琳, 等. 骨髓间充质干细胞源性外泌体促进小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化抑制急性期脑缺血大鼠炎症反应[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5): 599–606.

Cite this article as: SUN Yimei, MAO Shihui, LI Lin, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote microglia/macrophage M2 polarization in acute cerebral ischemia rats and inhibit inflammatory response[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(5): 599–606.

Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote microglia/macrophage M2 polarization in acute cerebral ischemia rats and inhibit inflammatory response

SUN Yimei, MAO Shihui, LI Lin, JIANG Weifeng, CHU Lisheng*

School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract The aim of the present study was to investigate the effects of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the polarization of M1/M2 microglia/macrophages in rats with acute cerebral ischemia. Ultrahigh-speed centrifugation was employed to isolate and identify exosomes; a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was prepared in rats using the intraluminal filament technique; Longa scoring and corner tests were used to evaluate the neurological function of rats; 2, 3, 5-triphenyltetrazole chloride (TTC) staining was used to assess the infarct volume in rat brains; immunofluorescence double-labeling of CD16/32/Iba1 and CD206/Iba1 was performed to detect M1/M2 phenotypes of microglia/macrophages; RT-qPCR was employed to measure the mRNA expression of CD86, inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), arginase-1 (Arg-1), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor beta (TGF- β) in the ischemic

收稿日期 2023-04-17 * 通信作者 Tel: 0571-86633149 E-mail: cls2004@zcmu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81274113, No. 81873028); 浙江省公益技术应用研究计划资助项目(No. 2016C33185)

penumbra of rat brains. The experimental results showed that BMSC-Exos reduced the number of CD16/32⁺/Iba1⁺ positive cells in the ischemic penumbra ($P < 0.01$) while increasing the number of CD206⁺/Iba1⁺ positive cells ($P < 0.01$), and decreased the mRNA expression of iNOS, CD86, and TNF- α , while increasing the mRNA expression of Arg-1, TGF- β , and IL-10 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). This research suggests that BMSC-Exos can regulate M1/M2 polarization of microglia/macrophages in rats with acute cerebral ischemia, alleviate neuroinflammation, and improve ischemic brain injury.

Key words cerebral ischemia; bone marrow mesenchymal stem cell; exosome; microglia/macrophage; polarization

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81274113, No. 81873028) and the Public Welfare Technology Application Research Project of Zhejiang Province (No. 2016C33185)

脑卒中是中枢神经系统最常见的疾病,严重威胁人类健康。脑卒中包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占所有卒中病例的70%~80%^[1]。脑缺血发病机制非常复杂,其中继发性炎症反应在脑缺血损伤中发挥重要作用^[2-3]。目前,组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)是临床治疗脑缺血的唯一有效药物,但由于治疗时间窗窄和出血转化的风险,其临床应用受到限制^[4]。神经炎症是缺血性脑卒中的发病机制之一,主要涉及外周炎症细胞的浸润、小胶质细胞活化和炎症介质的过度产生。探索炎症的机制,寻求有效治疗靶点,对脑缺血防治具有重要意义。

小胶质细胞是脑内固有的免疫细胞。在生理条件下,小胶质细胞处于静息状态,监测脑内微环境维持中枢神经稳态^[5-6]。脑缺血后小胶质细胞被激活,活化的小胶质细胞主要有M1和M2两种表型。其中M1型小胶质细胞高表达CD16/32,释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)等加剧神经损伤;而M2型小胶质细胞高表达精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、CD206,释放抗炎因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)等,促进炎症消退和神经修复,发挥神经保护作用。因此,促进激活的小胶质细胞从M1型向M2型转化为脑缺血的治疗提供了一个新策略^[7]。

近年来临床和动物实验研究发现,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植治疗脑缺血安全有效,具有很好的临

床应用前景^[8]。早期研究认为干细胞治疗是通过分化替代死亡的神经细胞。然而,最近的研究表明,间充质干细胞旁分泌的外泌体可以到达缺血部位,改善脑缺血损伤并促进神经功能恢复^[9-10]。外泌体(exosomes, Exos)是细胞分泌的重要细胞囊泡,其内含有核酸、蛋白质和脂类等生物活性物质,介导细胞间通讯,在生理和病理过程中发挥重要作用^[11]。大量研究发现,骨髓间充质干细胞源性外泌体(BMSC-Exos)对脑缺血有很好的治疗作用,其作用机制包括调节细胞增殖、迁移、分化、凋亡、炎症和代谢等生理和病理过程^[12]。实验室前期研究发现,BMSC-Exos促进脑缺血后小鼠血管生成减轻脑缺血损伤,然而是否能够调节小胶质细胞/巨噬细胞M2极化尚未清楚^[13]。本研究旨在观察BMSC-Exos对脑缺血后3d小胶质细胞/巨噬细胞M1/M2极化和神经炎症的影响。

1 材料

1.1 试剂

胎牛血清购于(美国Gemini公司);DMEM/F12培养基(浙江吉诺生物医药技术有限公司);BCA蛋白定量试剂盒、CD9抗体(美国Bioworld公司);ALIX,TSG101(美国Abcam公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazole chloride, TTC)染料(上海源叶生物科技有限公司);兔抗Iba1(日本Wako公司);鼠抗CD16/32(美国BD公司);山羊抗CD206(美国RD公司);FITC标记的羊抗兔二抗、Cy3标记的羊抗鼠二抗、FITC标记的驴抗羊二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);Cy3标记的驴抗兔二抗(美国Jackson ImmunoResearch公司);Triton X-100、DIPA、羊血清(上海碧云天生物技术

有限公司);RNAiso总RNA提取试剂、SYBR Green[®]定量PCR预混试剂、PrimeScript反转录预混液、无核酸酶水(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 仪器

HM525NX冰冻切片机(中国赛默飞世尔科技有限公司);H-7650型透射电子显微镜(日本日立公司);DMIL型荧光显微镜(德国Leica公司);NS300型纳米颗粒跟踪分析仪(英国Malvern公司);T100[™]RNA反转录仪、CFX96实时荧光定量PCR仪、ChemiDoc[™]Imaging System型凝胶图像处理系统(美国Bio-Rad公司)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,3~4月龄,体重(280±10)g,4周龄体质量(80±10)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006,饲养于浙江中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2018-0012]。动物饲养环境温度为(22±1)℃,相对湿度为40%~60%,12 h/12 h明暗交替。本研究严格按照动物实验伦理规范进行实验(伦理审查批准号:IACUC-20181126-13)。

2 方法

2.1 BMSCs的分离和培养

参照实验室前期报道的方法^[14-15]。简言之,收集细胞悬液后离心10 min,用DMEM/F12培养基重悬后放入CO₂培养箱中。培养至第3~5代的细胞用于后续实验。

2.2 BMSC-Exos的分离提取

收集骨髓间充质干细胞上清液,在4℃条件下,94 r/min离心10 min,624 r/min离心10 min,3 120 r/min离心30 min,弃沉淀,用0.22 μm微孔滤膜过滤后,4℃,31 200 r/min超高速离心2 h,使用预冷的PBS重悬,放置于-80℃冰箱保存备用。

2.3 BMSC-Exos的鉴定

透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察BMSC-Exos形态:取20 μL BMSCs-Exos悬液滴加到载样网上,滴加1%醋酸双氧铀溶液在室温下负染1 min,干燥后放入样品室内,观察并拍摄照片。免疫印迹法检测CD9、CD63、TSG101、ALIX、GAPDH的蛋白表达:悬液经凝胶电泳后转膜、封闭后,加入一抗CD9、CD63、TSG101、ALIX、

GAPDH(1:1 000)孵育过夜。加入二抗(1:2 000)孵育2 h,洗涤后化学发光显色并置于凝胶图像处理系统下拍摄并使用Image J软件进行灰度分析。纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)测定BMSC-Exos粒径大小:BMSC-Exos悬液置于样本池内,NTA分析仪测定BMSC-Exos粒径。

2.4 大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型制备

参照改良的Longa等^[15]建立MCAO模型。大鼠麻醉后分别将颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉分离,将颈外动脉结扎并剪断,剪一个小口,将4-0单丝尼龙线从颈外动脉缺口处插入并推至颈内动脉中18~20 mm,缺血90 min后将尼龙线拔出。假手术组的尼龙线仅插入5 mm。

2.5 实验分组

大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(MCAO组)、骨髓间充质干细胞源性外泌体组(BMSC-Exos组)每组15只。BMSC-Exos组大鼠在缺血90 min后立即经尾静脉注射BMSC-Exos(100 μg, 500 μL),假手术组和模型组大鼠注射等容积PBS。

2.6 神经功能评分

缺血后第1、2、3天,分别参照Longa评分^[11]和角实验^[12]检测大鼠神经功能缺损。Longa评分标准:0——无缺损;1——悬尾时对侧前肢屈曲;2——向损伤侧转圈;3——向损伤对侧倾倒;4——意识不清,无法正常行走。角实验是将两块(30 cm×20 cm×1 cm)木板以30°夹角相互连接,在交接处留出间隙并将大鼠放在夹角正中央。观察大鼠左右转的次数,重复10次并记录。

2.7 梗死体积检测

大鼠麻醉后断头取脑,将大鼠大脑冷冻,切成6个冠状切片,浸泡在2% TTC染液中孵育20 min,用4%多聚甲醛固定后拍照。使用Image J软件计算梗死面积,并按如下公式校正:梗死体积百分比(%)=[左半脑体积-(右半脑体积-梗死体积)]/左半脑体积×100。

2.8 免疫荧光双标检测M1/M2型小胶质细胞/巨噬细胞

缺血后第3天,各组大鼠经左心室插管注入0.9%氯化钠溶液(400 mL)快速冲洗,用4%多聚甲醛溶液灌流和固定。取脑后将大鼠置于4%多

聚甲醛固定,然后分别经20%和30%的蔗糖溶液脱水。对所需脑区进行冰冻切片制备10 μm 脑片。使用0.3% Triton X-100破膜25 min;5%山羊血清/驴血清室温封闭1 h,分别加入兔抗Iba1/鼠抗CD16/32(1:100),兔抗Iba1/山羊抗CD206(1:100),孵育48 h后加入相对应的荧光二抗(1:100),室温避光孵育1 h,封片,在荧光显微镜下拍照,Image J软件计数双标阳性细胞数。

2.9 RT-qPCR检测M1/M2型小胶质细胞/巨噬细胞相关标志物mRNA表达

Trizol法提取大鼠脑缺血周边区组织的总RNA,按照PrimeScriptTM RT Master Mix试剂盒说明书进行反转录。按照SYBR Premix Ex TaqTM试剂盒进行PCR。反应体系:2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II 5.0 μL 、上下游引物各0.4 μL 、cDNA 1.2 μL 、双蒸水3.0 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15 s,循环40次。内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。引物序列见表1。

2.10 统计学分析

在SPSS 25.0软件中进行数据分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行正态分布及方差齐性检验,Longa评分和角实验数据采用非参数检验中的Kruskal-Wallis检验进行分析,满足正态分布以及方差齐性样本采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用Student-Newman-Keuls检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BMSC-Exos的鉴定

在TEM下观察BMSC-Exos的形态,结果发现BMSC-Exos茶托样或凹半球样,具有双层膜结构,符合外泌体的特征性结构。NTA结果显示,BMSC-Exos的平均粒径大小为107.4 nm。使用Western blot对BMSC-Exos标志性蛋白表达进行检测,结果表明,与BMSCs比较,BMSC-Exos几乎不表达GAPDH,而高表达外泌体标记蛋白CD9、CD63、TSG101和ALIX。超离所得上清液中不含有GAPDH、CD9、CD63、TSG101、ALIX,这些结果表明所提取的BMSC-Exos纯度较高,可用于后续实验(图1)。

Table 1 Primer sequences for real-time

Biological indicator	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
iNOS	ATGGCTCCTTCAAAGAGGCA	CTATTTCTTTTGTACGGCTTCCA
CD86	TAGGGATAACCAGGCTCTAC	CCTGGGTGCTCTTTTGCTGTA
TNF- α	GGTCCCAACAAGGAGGAGAAG	GTCTGGGCCATGGAAGTGA
Arg-1	TCCTTAGAGATTATCGGAGCG	GTCTTTGGCAGATATGCAGG
TGF- β	CTGACTGGCTGTCTTTTGACGTC	AAGCCCTGTATTCCGTCTCCTTG
IL-10	CAAGGCAGTGGAGCAGGTGA	CCGGTGGTTCAATTTTTTCATT
GAPDH	GCCAAGGCTGTGGCAAGGT	TCTCCAGCGCGCACGTCAGA

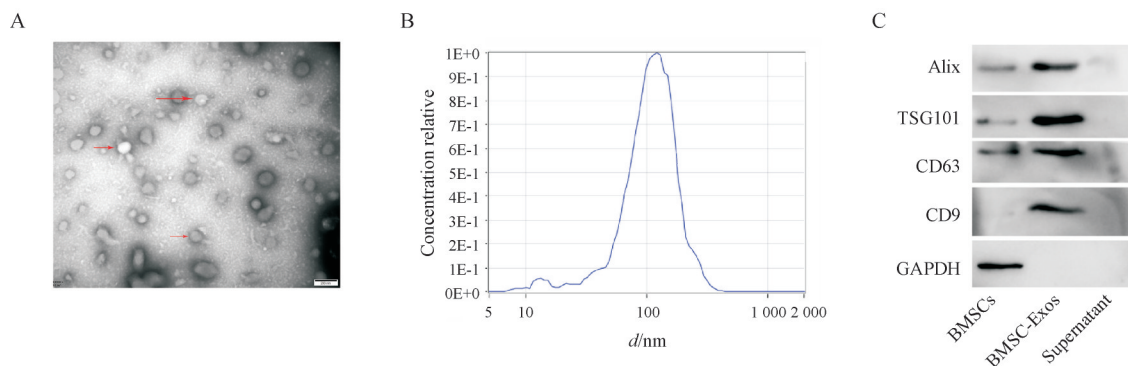


Figure 1 Identification of BMSC-Exos

A: Representative transmission electron microscope (TEM) micrograph of BMSC-Exos (Scale bar = 200 nm); B: Size distribution of BMSC-Exos using nanoparticle tracking analysis (NTA); C: Western blot to determine expressions of CD9, CD63, TSG101, ALIX, GAPDH

3.2 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠神经功能的影响

脑缺血后第 1、2、3 天,模型组大鼠均呈现严重的神经功能缺损,说明脑缺血大鼠模型成功建立;

脑缺血后第 2、3 天,与模型组比较,BMSC-Exos 组大鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),右转次数显著减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 2。

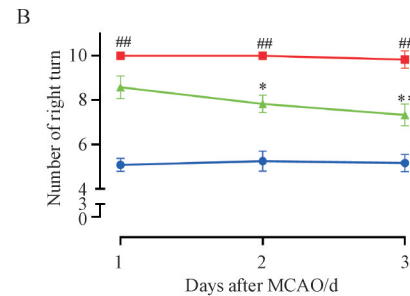
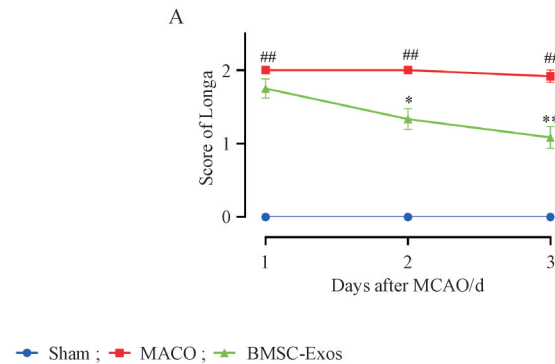


Figure 2 Neurological deficits of the rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

A: Longa scores; B: Number of right turns

$P < 0.01$ vs Sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs middle cerebral artery occlusion (MCAO) group

3.3 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠梗死体积的影响

与假手术组相比,模型组脑缺血大鼠脑梗死体积显著增加 ($P < 0.01$);与模型组相比较,BMSC-Exos 组脑缺血大鼠脑梗死体积显著减小 ($P < 0.05$),见图 3。

3.4 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠小胶质细胞/巨噬细胞 M1 极化的影响

与假手术组相比,模型组 CD16/32⁺/Iba1⁺阳性细胞数量显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,BMSC-Exos 组 CD16/32⁺/Iba1⁺阳性细胞数量显著减少 ($P < 0.01$)(图 4)。

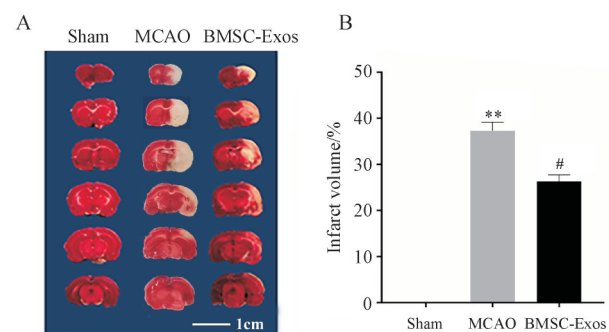


Figure 3 Comparison of cerebral infarct volume in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A: 2, 3, 5-Triphenyltetrazole chloride (TTC) staining (Scale bar = 1 cm);

B: Quantitative analysis of TTC staining

** $P < 0.01$ vs Sham group, # $P < 0.05$ vs MCAO group

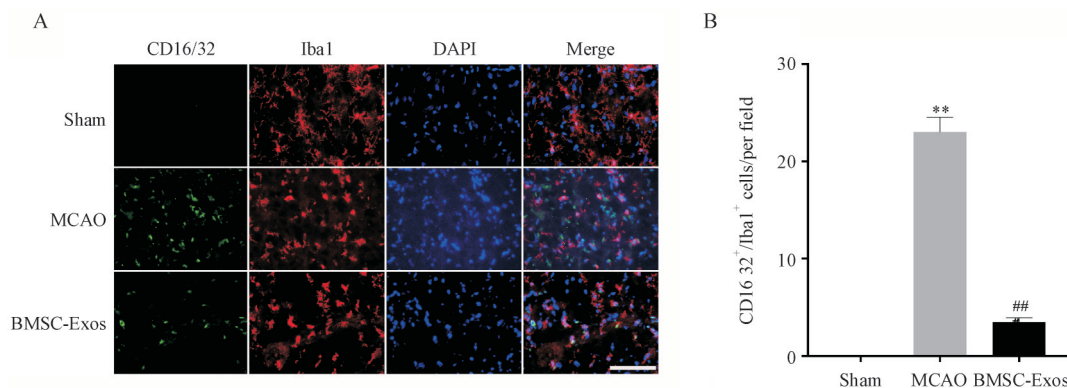


Figure 4 Effect of BMSC-Exos on M1 polarization of microglia/macrophage in rats with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A: Representative CD16/32 (green) and Iba1 (red) co-location staining images of the ischemic peripheral zone (400 $\times$, Scale bar = 100 μ m); B: Quantitative analysis of CD16/32 and Iba1 double-labelling immunofluorescence

** $P < 0.01$ vs Sham group, ## $P < 0.01$ vs MCAO group

3.5 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠小胶质细胞/巨噬细胞 M2 极化的影响

与假手术组相比,模型组小胶质细胞/巨噬细胞

胞分支缩短,胞体增大;与模型组比较,BMSC-Exos 组 CD206⁺/Iba1⁺ 阳性细胞数量显著增加 ($P < 0.01$),见图5。

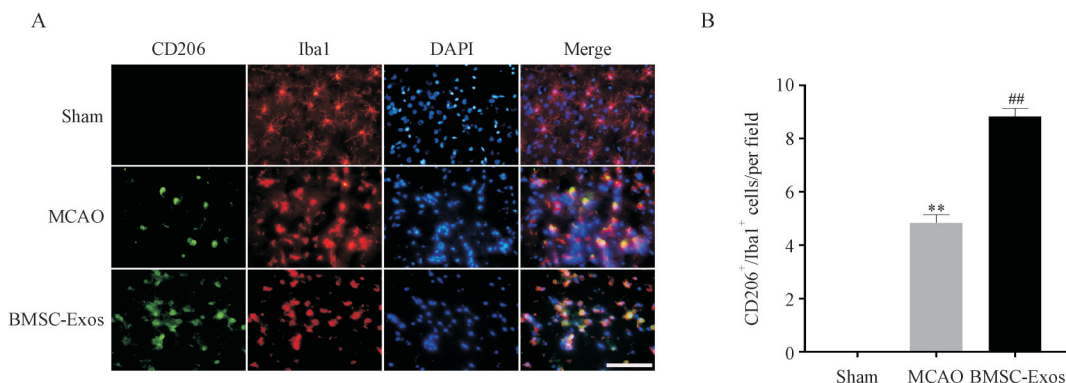


Figure 5 Effect of BMSC-Exos on M2 polarization of microglia/macrophage in rats with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A: Representative CD206 (green) and Iba1 (red) co-location staining images of the ischemic peripheral zone (400 $\times$, Scale bar = 100 μ m); B: Quantitative analysis of CD206 and Iba1 double-labelling immunofluorescence

** $P < 0.01$ vs Sham group, ## $P < 0.01$ vs MCAO group

3.6 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠 M1 型小胶质细胞/巨噬细胞标志物 mRNA 的影响

与假手术组相比,模型组 M1 型小胶质细胞/巨噬细胞标志物 iNOS、CD86、TNF- α 的 mRNA 表达

显著增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,BMSC-Exos 组 M1 型小胶质细胞/巨噬细胞标志物 iNOS、CD86、TNF- α 的 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图6。

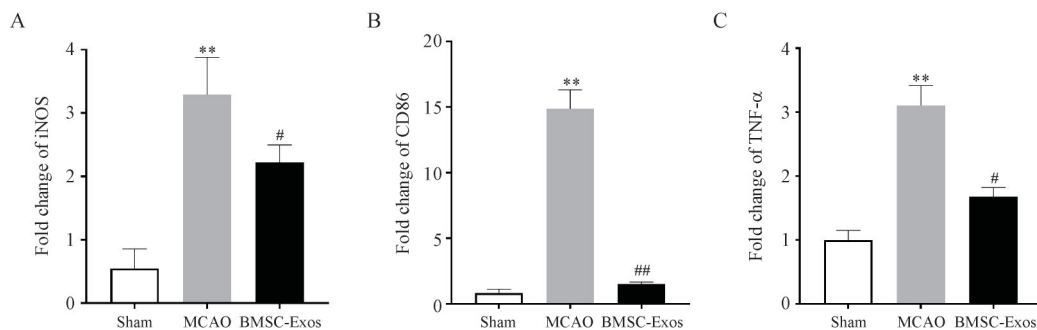


Figure 6 Effect of BMSC-Exos on the mRNA expression of M1 microglia/macrophage markers after cerebral ischemia in rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: mRNA level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) detected by RT-qPCR; B: mRNA level of CD86 detected by RT-qPCR; C: mRNA level of tumor necrosis factor (TNF- α) detected by RT-qPCR

** $P < 0.01$ vs Sham group; ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs MCAO group

3.7 BMSC-Exos 对急性期脑缺血大鼠 M2 型小胶质细胞/巨噬细胞标志物 mRNA 的影响

与模型组相比,BMSC-Exos 组 M2 型小胶质细胞/巨噬细胞标志物 Arg-1、TGF- β 、IL-10 的 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$),见图7。

4 讨论

BMSCs 衍生的外泌体由于其免疫调节和再生特性,是治疗急性中枢神经系统损伤的有前途的

治疗剂,其作用机制包括调节细胞凋亡^[16]、血管生成^[17]以及神经发生^[18]等。然而,BMSC-Exos 是否能够调节脑缺血后第3天小胶质细胞/巨噬细胞从 M1 向 M2 极化来抑制急性神经炎症鲜有文献报道。本研究发现 BMSC-Exos 促进小胶质细胞/巨噬细胞从 M1 表型转化为 M2 表型来抑制脑缺血后神经炎症,改善急性脑缺血损伤。

在生理状态下,小胶质细胞通过监测病原体与与损伤相关的分子模式,吞噬凋亡神经元维持

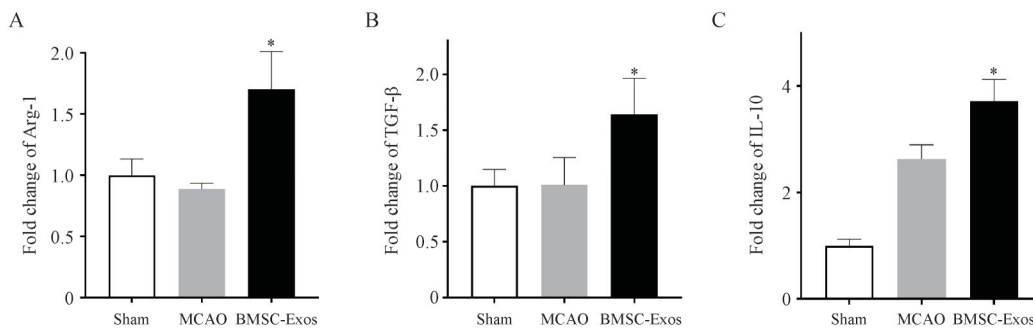


Figure 7 Effect of BMSC-Exos on the mRNA expression of M2 microglia/macrophage markers after cerebral ischemia in rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: mRNA level of Arginase-1 (Arg-1) detected by RT-qPCR; B: mRNA level of transforming growth factor beta (TGF-β) detected by RT-qPCR;

C: mRNA level of Interleukin-10 (IL-10) detected by RT-qPCR

* $P < 0.05$ vs MCAO group

体内平衡。小胶质细胞根据微环境信号不同调整其表型,包括经典激活的M1型和替代激活的M2型^[19]。M1型小胶质细胞膜上高表达CD16/32,释放大量促炎因子如TNF-α、iNOS等对神经元产生毒性加剧脑损伤。M2型小胶质细胞膜上高表达CD206,分泌抗炎因子,如TGF-β、Arg-1等,同时释放IGF-1和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)等神经营养因子,促进炎症消退和神经修复。因此,本研究选取了CD16/32、CD86、iNOS、TNF-α、CD206、Arg-1、IL-10和TGF-β等作为M1型/M2型小胶质细胞/巨噬细胞标志物。

在脑缺血急性期,缺血核心区和梗死周围区均可检测到激活的小胶质细胞^[20-21]。Hu等^[22]在小鼠局灶性脑缺血模型中发现,在缺血后3d M1型小胶质细胞/巨噬细胞数量逐渐增加,持续增加到缺血后14d;而M2型小胶质细胞/巨噬细胞在缺血后1~3d开始增加,3~5d达到高峰。因此,本实验选择脑缺血后第3天检测BMSC-Exos对小胶质细胞/巨噬细胞M1/M2极化的影响。

BMSCs被证实可调控脑内小胶质细胞/巨噬细胞激活以及炎症反应。Bai等^[23]发现将BMSCs移植到MCAO大鼠脑组织中能够显著增加CD206阳性细胞数,降低TNF-α阳性细胞数。实验室前期研究发现,BMSCs移植能够调节MCAO大鼠模型中小胶质细胞从M1型转化为M2型,减轻神经炎症,促进神经功能恢复^[24]。早期研究认为干细胞治疗是通过分化替代死亡的神经细胞,发挥神经修复作用。然而,最近的研究表明,干细胞主要通过旁分泌作用发挥作用。

外泌体是BMSCs旁分泌的活性成分之一。BMSC-Exos被证实能够调节小胶质细胞/巨噬细胞表型从而在急性中枢神经损伤中发挥抗炎作用^[25]。Wang等^[26]证实骨髓间充质干细胞条件培养基通过抑制M1小胶质细胞/巨噬细胞缓解脊髓损伤。Wen等^[27]提出BMSC-Exos调节小胶质细胞表型来抑制创伤性脑损伤后的神经炎症。实验室前期研究发现,BMSC-Exos促进脑缺血小鼠血管生成发挥神经保护作用^[13]。这些结果提示BMSC-Exos可能对小胶质细胞/巨噬细胞M2极化同样存在调节作用。本研究通过免疫荧光双标实验发现,大鼠脑缺血后第3天,与假手术组相比,模型组小胶质细胞/巨噬细胞分支缩短,胞体变大,出现典型的阿米巴样巨噬细胞形态特征。BMSC-Exos治疗后小胶质细胞/巨噬细胞M1型标志物CD16/32减少,M2型标志物CD206增多。RT-qPCR结果进一步发现,BMSC-Exos减少iNOS、CD86、TNF-α释放,促进Arg-1、TGF-β、IL-10释放。上述结果提示,BMSC-Exos促进大鼠脑缺血后第3天小胶质细胞/巨噬细胞从M1型向M2型转化,抑制脑缺血后急性炎症反应。

综上所述,本研究结果提示BMSC-Exos促进脑缺血后小胶质细胞/巨噬细胞M2型极化,从而抑制脑缺血再灌注损伤引起的急性炎症反应,然而BMSC-Exos对急性期脑缺血后小胶质细胞/巨噬细胞极化的分子机制的调控尚待进一步研究。

References

- [1] Wang LD, Peng Bin, Zhang Hongqi, et al. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020[J]. *Chin J Cerebrovasc*

- Dis (中国脑血管病杂志), 2022, **19**(2): 136-144.
- [2] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments[J]. *Neuron*, 2010, **67**(2): 181-198.
 - [3] Fan WX. Research progress on the mechanism of ischemic stroke[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(6): 751-759.
 - [4] Venkat P, Shen Y, Chopp M, *et al.* Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke[J]. *Neuropharmacology*, 2018, **134**(Pt B): 310-322.
 - [5] Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, **32**: 367-402.
 - [6] Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia biology: one century of evolving concepts[J]. *Cell*, 2019, **179**(2): 292-311.
 - [7] Wang ML, Pan W, Xu Y, *et al.* Microglia-mediated neuroinflammation: a potential target for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *J Inflamm Res*, 2022, **15**: 3083-3094.
 - [8] Kuroda S. Current opinion of bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke[J]. *Neurol Med Chir*, 2016, **56**(6): 293-301.
 - [9] Liu ZQ, Li X, Ye ZX, *et al.* Neuroprotective effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells via activating TGR5 and suppressing apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, **593**: 13-19.
 - [10] Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, **7**(1): 125.
 - [11] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, *et al.* Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1820**(7): 940-948.
 - [12] Oveili E, Vafaei S, Bazavar H, *et al.* The potential use of mesenchymal stem cells-derived exosomes as microRNAs delivery systems in different diseases[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, **21**(1): 20.
 - [13] Hu H, Hu XW, Li L, *et al.* Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in ischemic stroke mice via upregulation of miR-21-5p[J]. *Biomolecules*, 2022, **12**(7): 883.
 - [14] Li L, Chu LS, Fang Y, *et al.* Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by tetramethylpyrazine enhances cell migration and improves functional recovery after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, **8**(1): 112.
 - [15] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20**(1): 84-91.
 - [16] Niu QF, Yang Y, Li DL, *et al.* Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells alleviate ischemia-reperfusion injury and promote survival of skin flaps in rats[J]. *Life*, 2022, **12**(10): 1567.
 - [17] Zheng JL, Zhang XJ, Cai WF, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-29b-3p promotes angiogenesis and ventricular remodeling in rats with myocardial infarction by targeting ADAMTS16[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, **22**(8): 689-700.
 - [18] Liu XY, Wu CH, Zhang YS, *et al.* Hyaluronan-based hydrogel integrating exosomes for traumatic brain injury repair by promoting angiogenesis and neurogenesis[J]. *Carbohydr Polym*, 2023, **306**: 120578.
 - [19] Gaire BP. Microglia as the critical regulators of neuroprotection and functional recovery in cerebral ischemia[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, **42**(8): 2505-2525.
 - [20] Price CJ, Wang DC, Menon DK, *et al.* Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2006, **37**(7): 1749-1753.
 - [21] Gulyás B, Tóth M, Schain M, *et al.* Evolution of microglial activation in ischaemic core and peri-infarct regions after stroke: a PET study with the TSPO molecular imaging biomarker [(11)C]vinpocetine[J]. *J Neurol Sci*, 2012, **320**(1/2): 110-117.
 - [22] Hu XM, Li PY, Guo YL, *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2012, **43**(11): 3063-3070.
 - [23] Bai XJ, Hao L, Guo YE, *et al.* Bone marrow stromal cells reverse the microglia type from pro-inflammatory tumour necrosis factor a microglia to anti-inflammatory CD206 microglia of middle cerebral artery occlusion rats through triggering secretion of CX3CL1[J]. *Folia Neuropathol*, 2021, **59**(1): 20-31.
 - [24] Yang Y, Bao HY, Jin HQ, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote microglia/macrophage M2 polarization and enhance neurogenesis in the acute and chronic stages after ischemic stroke[J]. *Clin Complementary Med Pharmacol*, 2022, **2**(4): 100040.
 - [25] Liu YY, Li Y, Wang L, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate microglia phenotypes: a promising treatment for acute central nervous system injury[J]. *Neural Regen Res*, 2023, **18**(8): 1657-1665.
 - [26] Wang YW, Wang XY, Zou ZH, *et al.* Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells relieves spinal cord injury through suppression of Gal-3/NLRP3 and M1 microglia/macrophage polarization[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, **243**: 154331.
 - [27] Wen L, Wang YD, Shen DF, *et al.* Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells inhibit neuroinflammation after traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2022, **17**(12): 2717-2724.