

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003419

M1 表型的小胶质细胞外泌体对血脑屏障功能的影响

蒋 雯¹, 邓琼花¹, 梅 松²

(1. 昆明医科大学第一附属医院神经内科, 昆明 650032; 2. 昆明医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 昆明 650032)

【摘要】目的:研究 M1 表型的小胶质细胞外泌体(M1 microglia-derived exosome, M1-exo)对体外血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)功能及血管内皮细胞间紧密连接蛋白表达的影响。**方法:**用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激小鼠小胶质细胞来源的细胞系 BV2 细胞, 流式技术检测其向 M1 型极化情况, 分离提取外泌体。用小鼠脑微血管内皮细胞系 b.End3 细胞与原代培养的小鼠星形胶质细胞构建体外 BBB 模型, 随机分为 3 组: b.End3 细胞正常培养组(b.End3 组)、b.End3 细胞+25 $\mu\text{g/mL}$ 正常 BV2 细胞来源外泌体(BV2-derived exosome, BV2-exo)组(b.End3+BV2-exo 组)、b.End3 细胞+25 $\mu\text{g/mL}$ M1 表型的小胶质细胞来源外泌体组(b.End3+M1-exo 组)。按实验分组将不同来源外泌体与 BBB 模型共培养, 检测各组的跨膜电阻(trans-endothelial electrical resistance, TEER)、荧光黄通过率, 免疫印迹法(Western blot, WB)检测紧密连接复合物蛋白 Claudin-1、Occludin、ZO-1 及 JAM 蛋白的表达。**结果:**①小胶质细胞向 M1 型极化成功, 其细胞标志物 CD16/32 阳性率较对照组明显升高($P=0.023$); ②与 M1-exo 共培养后, 体外 BBB 模型的 TEER 明显下降($P=0.000$), 对荧光黄的透过率明显增加($P=0.000$); ③与 b.End3 组和 b.End3 + BV2-exo 组相比, b.End3+M1-exo 组的 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 蛋白的表达水平明显下降。**结论:**M1-exo 可以破坏 BBB 的完整性, 影响其功能。

【关键词】M1 表型的小胶质细胞; 外泌体; 体外血脑屏障模型; 缺血性脑卒中

【中图分类号】R743.32

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-05-13

Effects of M1 microglia-derived exosomes on the function of the blood-brain barrier

Jiang Wen¹, Deng Qionghua¹, Mei Song²

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University;

2. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of M1 microglia-derived exosomes (M1-exo) on the function of an in-vitro blood-brain barrier (BBB) model and the expression of tight junction proteins between vascular endothelial cells. **Methods:** Mouse microglia-derived BV2 cells were stimulated with lipopolysaccharide to be polarized towards the M1 phenotype, and exosomes were isolated and extracted after the phenotype was confirmed by flow cytometry. An in-vitro BBB model was constructed using the mouse brain microvascular endothelial cell line b.End3 and primary cultured mouse astrocytes. The BBB model was co-cultured with exosomes of different sources in three groups: normal culture for b.End3 cells (b.End3 group); b.End3 cells + 25 $\mu\text{g/mL}$ exosomes derived from normal BV-2 cells (b.End3+BV2-exo group); and b.End3 cells+25 $\mu\text{g/mL}$ M1-exo (b.End3+M1-exo group). Trans-endothelial electrical resistance (TEER) and Lucifer yellow permeability were examined. The expression of tight junction complex proteins (claudin-1, occludin, zonula occludens-1 [ZO-1], and junctional adhesion molecules) was measured by Western blot. **Results:** Microglia were successfully polarized to the M1 type, and the positivity rate of the M1 marker CD16/32 was significantly increased compared with the control group ($P=0.023$). After co-culture with M1-exo, the TEER of the in-vitro BBB model was significantly decreased ($P<0.001$), and Lucifer yellow permeability was significantly increased ($P<0.001$). Compared with the b.End3 group and b.End3+BV2-exo group, the b.End3+M1-exo group showed significantly decreased expression levels of claudin-1, occludin, and ZO-1. **Conclusion:** M1-exo can disrupt the integrity of BBB and interfere with its normal function.

【Key words】 M1 microglia; exosome; in-vitro blood-brain barrier model; ischemic stroke

作者介绍: 蒋 雯, Email: arainj@126.com,

研究方向: 脑血管病。

通信作者: 梅 松, Email: meisong123@126.com。

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (编号: 2022J0199)、

云南省科技厅-昆明医科大学联合基金资助项目 (编号:

202201AY070001-049)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.0957.002>

(2024-02-09)

脑卒中是全球仅次于缺血性心脏病的第 2 大死因^[1],其中缺血性卒中的占比高达 80% 以上。目前,临床治疗局限,主要包括静脉溶栓和血管内机械取栓,但这 2 种方法均可能造成脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤,破坏血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),导致脑水肿甚至颅内出血^[2]。因此,寻找早期治疗靶点和药物,预防 IR 后的 BBB 破坏,已成为当前的研究热点。

小胶质细胞是中枢神经系统的常驻免疫细胞,在多种神经系统疾病中发挥重要作用,涉及炎症、细胞毒性、修复、免疫抑制和再生等多个方面^[3]。它有 2 种活化形式:一种是具有促炎作用的 M1 型,另一种是具有保护功能的 M2 型,而在卒中急性期主要以 M1 型为主^[4]。研究证实在大脑中动脉闭塞后的数小时里,缺血边界区的小胶质细胞数量,尤其是 M1 表型迅速增加,导致急性期脑损伤^[5]。众所周知,IR 后可能发生一系列再灌注损伤,炎症及氧化应激是主要原因,神经细胞与血脑屏障的损害会加重组织破坏和功能恶化,小胶质细胞在这一过程中起重要作用^[6],但其机制尚不清楚。近几年,越来越多的研究证明小胶质细胞通过分泌外泌体与周围细胞发生信息传递,外泌体是神经-小胶质细胞信息交流的重要“媒介”,且能与 BBB 发生串扰^[7-9]。

外泌体是一种由细胞分泌的小囊泡,具有与该细胞相同的拓扑结构^[10],能被邻近或是远隔的细胞选择性吸收,其生物活性可为慢性炎症、心血管及神经系统疾病、癌症、肥胖和代谢性疾病等的诊治靶点提供潜在的生物标志物^[11]。

本研究的目的在于通过建立体外 BBB 模型,探明 M1 表型的小胶质细胞外泌体(M1 microglia-derived exosome, M1-exo)对于血脑屏障功能及其相关分子表达的影响,为预防 IR 后 BBB 的破坏,减少再灌注损伤的潜在威胁提供理论依据和实验数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 小鼠小胶质细胞系 BV2 细胞、小鼠脑微血管内皮细胞系 b.End3 细胞均购于北纳生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 MEM 培养基(minimum essential medium, MEM)、DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (servicebio, 武汉);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(SIGMA, 美国);胎牛血清、青链霉素(gibco, 美国);LPS(Solarbio, 北京);蛋白裂解液(Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)(碧云天, 上海);丙酮酸还原酶(Hydroxypyruvate reductase, HPR)标记的羊抗兔 IgG

(Abmart, 上海);小鼠抗 β -actin 单抗(中杉金桥, 北京);Claudin-1、Occludin、ZO-1 抗体(bioss, 北京);JAM-1 抗体(abcam, 英国);Ribo Exosome solation Reagent(RiboBio, 广州);高速冷冻离心机(scilogex, 美国);低速离心机(四川蜀科仪器)。

1.2 研究方法

1.2.1 小胶质细胞的激活极化 将小鼠小胶质细胞来源的细胞系 BV2 细胞置于含有 10% 热灭活胎牛血清、青链霉素溶液的 MEM 中,于 37 °C、5%CO₂ 条件下进行培养。胰酶消化收集 BV2 细胞,计数后按照每孔 105 细胞量将细胞接种于 6 孔板中,到细胞融合度 70% 左右时,将培养液更换为基础培养基,第 2 组加入 200 ng/mL LPS 24 h,诱导小胶质细胞向 M1 表型极化。用流式细胞仪检测极化情况。

1.2.2 外泌体分离提取及鉴定 收集细胞培养基,在室温下以 2 000 $\times g$ 离心 30 min,以去除残留细胞及碎片,转移上清样本 9 mL 至新管,加入 1/3 体积的 Ribo Exosome solation Reagent(for cell culture media),颠倒混合直至样本完全混匀,放入 4 °C 冰箱静置过夜。将 2 mL 混合液转移至离心管,4 °C 下 1 500 $\times g$ 离心 30 min,弃去上清液,重复该步骤直至全部混合液转移至离心管,再次离心后获得外泌体,以透射电镜观察其形态。

1.2.3 体外 BBB 模型制备及分组处理 将小鼠脑微血管内皮细胞系 b.End3 细胞与原代培养的小鼠星形胶质细胞,采用 Transwell 技术进行共培养,建立体外 BBB 模型,实验分组为:①b.End3 组;②b.End3+BV2 细胞来源外泌体(BV2-derived exosome, BV2-exo)组;3、b.End3+M1-exo 组。在 transwell 上室种植 b.End3 细胞,用 DMEM 完全培养基重悬,吸取 0.5 mL 种植于细胞培养池内,将星形胶质细胞接种到培养池外侧 6 孔培养板内。7 d 左右时,两种细胞分别在多聚酯膜两侧呈单层生长,使用电阻仪检测跨内皮细胞间电阻,电阻检测通过,将 BV2 和 M1 来源的外泌体,按照实验分组分别加入 transwell 小室细胞中,作用 48 h 后,检测跨膜电阻(trans-endothelial electrical resistance, TEER)。计算公式为:TEER=(模型总电阻-Transwell 空白电阻) \times 膜面积。

1.2.4 体外 BBB 通透性测定 在 Transwell 小室顶端腔内加入含有终浓度为 100 $\mu g/mL$ 荧光黄的汉克平衡盐溶液(Hanks Balanced Salt Solution, HBSS) 100 μL , 37 °C 孵育 4 h 后收集腹侧腔液体,荧光分光光度计下测定吸光度,根据标准曲线计算荧光黄浓度。荧光黄透过率(%)=基底侧荧光黄浓度/加入顶端侧的荧光黄浓度(100%)。

1.2.5 WB 方法 体外 BBB 建模成功,按实验分组给予或不予外泌体处理 48 h 后,检测内皮细胞 Claudin-1、Occludin、ZO-1 及 JAM 的表达。PBS 洗涤 2 次,加入 RIPA 裂解液,于 4 °C 下,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。用紫外分光光度计检测蛋白浓度,并据此调整各样本上样体积。蛋白经电泳变性分离后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,室温封闭 1 h,分别加入稀释后的 Claudin-1 抗体(1:1 000)、Occludin 抗体(1:2 000)、ZO-1 抗体(1:2 000)、JAM-1(1:1 000),4 °C 孵育过夜后加入 HPR 标记的羊抗兔 IgG。增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色,采集图像。

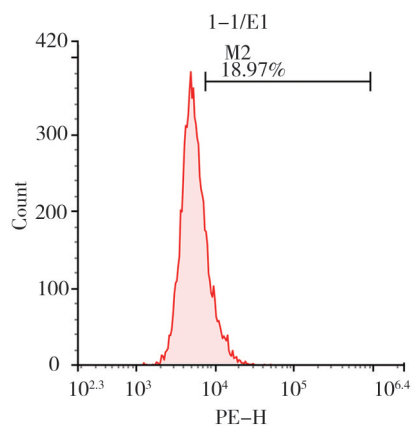
1.3 统计学方法

采用统计软件 GraphPad Prism 7.0 进行分析, 计量资料符合正态分布, 2 组和多组之间的比较分别通过 t 检验和单因素方差分析进行, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

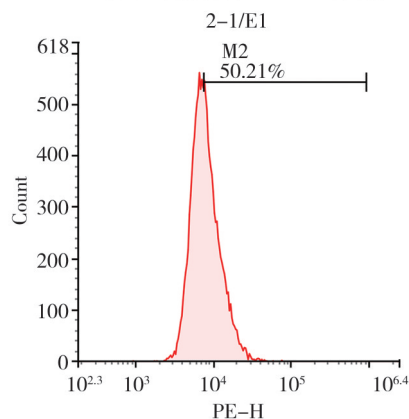
2 结果

2.1 LPS 激活小胶质细胞

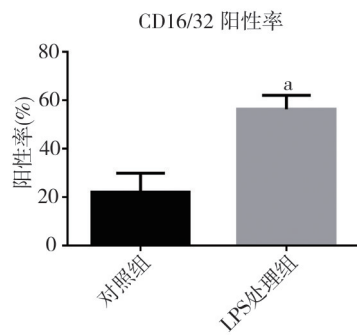
LPS 激活小胶质细胞并促使其向 M1 型极化, 流式细胞检测结果显示: 与正常培养组相比, LPS 处理组的 M1 型标志物 CD16/32 表达阳性率明显升高, 差异有统计学意义, 见图 1。



A. 对照组细胞表面 CD16/32 的表达



B. LPS 处理组细胞表面 CD16/32 的表达



C. LPS 诱导 BV2 细胞表达 CD16/32

注: a, 与对照组相比, $P < 0.05$

图 1 LPS 处理对小胶质细胞表型的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 M1-exo 的形态学观察

分离提取活化的 M1 型的小胶质细胞上清液中的外泌体, 在透射电镜下观察其形态, 呈现出具有双膜性结构的圆形或类圆形囊泡状, 边界清晰, 大小各异, 直径在 40~130 nm, 腔内含有低电子密度物质, 见图 2。

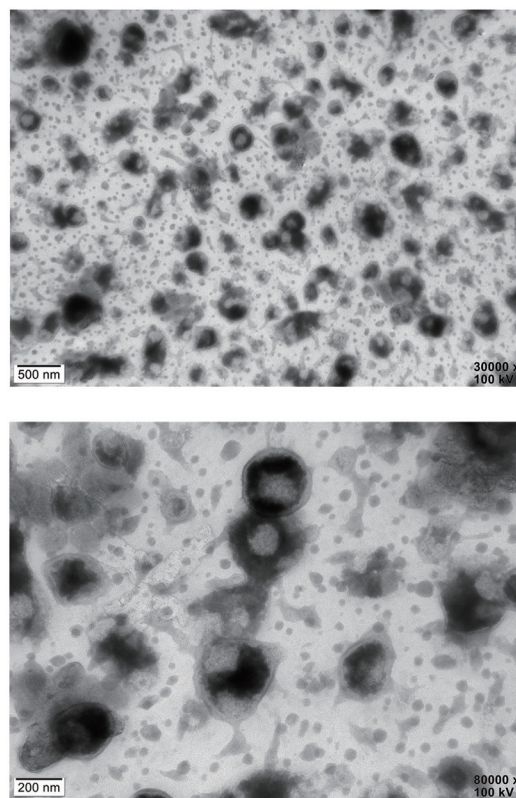
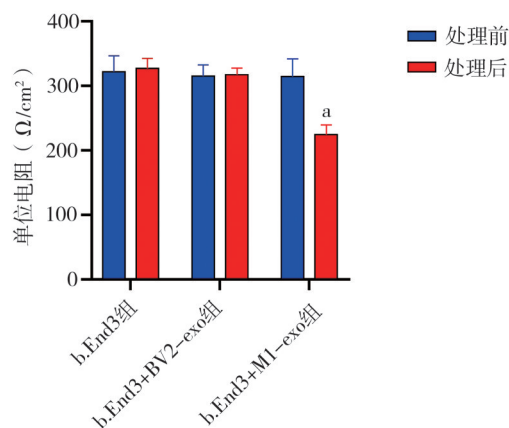


图 2 M1-exo 的透射电镜分析

2.3 M1-exo 降低 BBB 的跨膜电阻

建模成功的体外 BBB 被随机分为 3 组, 按实验设计给予不同的处理, 48 h 后检测各组 TEER, 结果显示: 经 M1-exo 处理后的体外 BBB 模型, 其单位电阻较之前明显降低, 且差异有统计学意义, 见图 3。

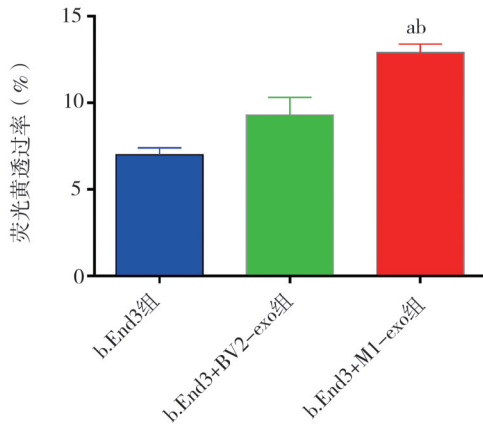


注: a, 与处理前相比, $P < 0.01$

图 3 M1-exo 对血脑屏障 TEER 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4 M1-exo 增加 BBB 的通透性

本研究检测指示剂荧光黄从 Transwell 小室顶端腔透膜到达腹侧腔的透过率。结果显示:经 M1-exo 处理后的体外 BBB 模型,其对于荧光黄的透过率明显增加,差异有统计学意义,见图 4。



注:a,与b.End3组比较, $P<0.01$;b,与b.End3+BV2-exo组比较, $P<0.05$

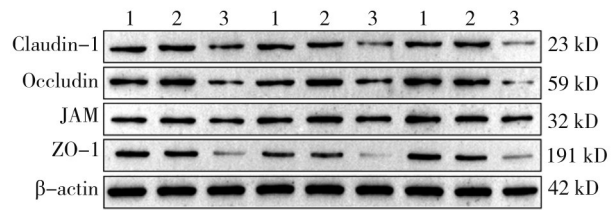
图4 M1-exo对血脑屏障通透性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 M1-exo 降低 BBB 相关连接蛋白的表达

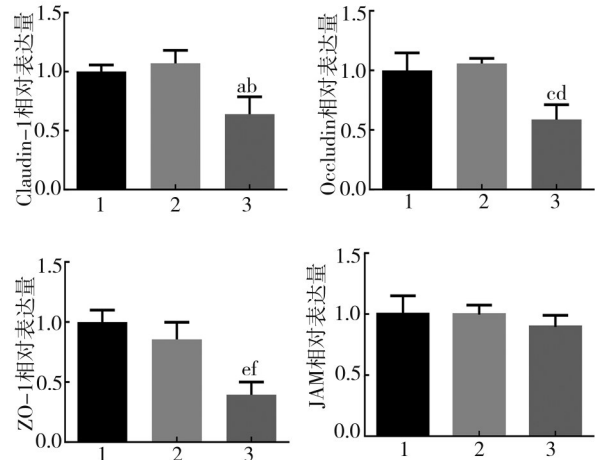
BBB是由脑血管内细胞、星形胶质细胞、周皮细胞、基底膜等共同组成的生理结构。脑微血管内皮细胞间的紧密连接复合物(TightJunctions, TJ)是血脑屏障的主要结构基础以及屏障特性的主要承担者,由闭锁蛋白(Occludin)、闭合蛋白(Claudins)和黏附连接分子家族(junctional adhesion-molecule family, JAM),以及与他们相连的闭合小环蛋白(zona occludens protein, ZO)组成。本研究用 Western blot 检测不同实验组 4 种蛋白的表达水平。结果显示:与其他 2 组相比, b.End3 细胞+25 $\mu\text{g/mL}$ M1 细胞外泌体组的 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 的表达水平明显下降,差异有统计学意义,见图 5, JAM 的表达虽有所降低,但差异无统计学意义。这就说明: M1-exo 降低紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 的表达,而对 JAM 的影响较弱。

3 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统的第一免疫应答者,正常时处于静息状态,一旦受到损伤细胞或病原体的刺激,就会被激活分化成不同的表型,发挥神经毒性或神经保护功能,在中枢神经系统中扮演着“双刃剑”的角色,而这种根据刺激、环境和周期呈现出不同表型并发挥不同功能的特性,被称为小胶质细胞的极化^[3]。与巨噬细胞类似,小胶质细胞极化分为经典激活表型 M1 和交替激活表型 M2,前



A. TJ蛋白的表达水平



B. TJ蛋白相对灰度分析

注:1, b.End3 组;2, b.End3+BV2-exo 组;3, b.End3+M1-exo 组;a,与b.End3组相比, $P<0.05$;b,与b.End3+BV2-exo组相比, $P<0.05$;c,与b.End3组相比, $P<0.05$;d,与b.End3+BV2-exo组相比, $P<0.05$;e,与b.End3组相比, $P<0.05$;f,与b.End3+BV2-exo组相比, $P<0.05$

图5 M1-exo对血脑屏障TJs蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

者具有促炎和杀伤作用,而后者则具有抗炎和损伤修复功能^[12]。小胶质细胞激活是多种神经退行性疾病和缺血性卒中的共同特征,活化的小胶质细胞通过诱导凋亡、兴奋性毒性和坏死性死亡导致神经元功能障碍^[13]。Hu X等^[14]发现:小胶质细胞在缺血性卒中发生后的几分钟内即被激活,最初主要表现为M2型,但在较短时间内就逐渐转化为M1型,进一步的体外研究表明,正是这些M1型细胞加剧糖氧剥夺诱导的神经元损害。在大脑中动脉闭塞模型小鼠中,M1表型的小胶质细胞所分泌的TNF- α 可增加血管内皮细胞坏死和BBB渗漏,加重神经炎症和脑水肿,导致不良预后^[15]。Yang S等^[16]认为:活化的NF- κB 能促进M1型小胶质细胞分泌促炎因子,抑制NF- κB 信号传导则可明显减少这些炎症介质的释放,改善脑梗死后的缺血-再灌注损伤。除释放炎性细胞因子外,越来越多的研究表明,小胶质细胞还具有很强的外泌体分泌能力,这被认为在卒中的细胞微环境调控中发挥重要作用^[17]。

外泌体是由各种细胞所释放的胞外微小囊泡,

直径约为 40~160 nm, 内含蛋白质、核酸等大量活性物质, 可被靶细胞摄取后进一步释放信号调节因子, 诱导产生强大的下游生物效应^[18, 19]。Chen XQ 等^[20]发现经脂多糖处理的小胶质细胞, 其所产生的外泌体可被 PC12 细胞摄取, 并诱导和促进神经细胞的凋亡。Zang J 等^[21]在动物中风模型和体外糖氧剥夺 (OGD) 模型中均证实: 抑制小胶质细胞 M1 表型, 改变其外泌体的架构和性能, 可以增强自噬通量, 保护幸存的神经细胞和神经突结构免受缺血性损害。综上所述, M1-exo 在脑缺血再灌注损伤过程中发挥着至关重要的作用, 然而对于其作用机制仍知之甚少。本研究用 LPS 将小胶质细胞激活极化为 M1 表型, 并分离提取 M1-exo。为了探索其对于血脑屏障的影响, 构建体外 BBB 模型, 研究发现: 与 M1-exo 共培养后, 体外 BBB 模型的 TEER 值较处理前明显下降, 对荧光黄的透过率较对照组明显增加, 构成 TJs 的主要蛋白 Claudin-1、Occludin 及 ZO-1 表达明显下降, 这一结果提示 M1-exo 可以破坏 BBB 的完整性, 增加其渗漏, 影响其正常功能。

以往关于缺血性脑卒中后小胶质细胞作用机制的研究多集中在神经炎症的调控功能上, 而本课题创新性地聚焦于 M1 表型的小胶质细胞外泌体对于血脑屏障功能的影响, 这也为降低中风后的脑缺血再灌注损伤提供了新的思路。当然, 本实验尚有局限性, 目前本研究仅在细胞层面证实了 M1-exo 对于体外血脑屏障模型的破坏作用, 后续课题组将进一步在动物实验中对此进行验证。

参 考 文 献

- [1] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795–820.
- [2] Howell JA, Bidwell GL 3rd. Targeting the NF- κ B pathway for therapy of ischemic stroke[J]. *Ther Deliv*, 2020, 11(2): 113–123.
- [3] Xue YM, Nie D, Wang LJ, et al. Microglial polarization: novel therapeutic strategy against ischemic stroke[J]. *Aging Dis*, 2021, 12(2): 466–479.
- [4] Castillo C, Saez-Orellana F, Godoy PA, et al. Microglial activation modulated by P2X4R in ischemia and repercussions in Alzheimer's disease[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 814999.
- [5] Gaire BP, Song MR, Choi JW. Sphingosine 1-phosphate receptor subtype 3(S1P₃) contributes to brain injury after transient focal cerebral ischemia via modulating microglial activation and their M1 polarization[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 284.
- [6] Jiang CT, Wu WF, Deng YH, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2006–2018.
- [7] Panaro MA, Benamer T, Porro C. Extracellular vesicles miRNA cargo for microglia polarization in traumatic brain injury [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 901.
- [8] Reynolds JL, Mahajan SD. Transmigration of tetraspanin 2 (Tspan2) siRNA via microglia derived exosomes across the blood brain barrier modifies the production of immune mediators by microglia cells [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(3): 554–563.
- [9] 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.
- [10] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514.
- [11] Cione E, Cannataro R, Gallelli L, et al. Exosome microRNAs in metabolic syndrome as tools for the early monitoring of diabetes and possible therapeutic options[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(12): 1257.
- [12] Isik S, Yeman Kiyak B, Akbayir R, et al. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. *Cells*, 2023, 12(7): 1012.
- [13] Hickman S, Izzy S, Sen P, et al. Microglia in neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(10): 1359–1369.
- [14] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063–3070.
- [15] Chen AQ, Fang Z, Chen XL, et al. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 487.
- [16] Yang S, Wang H, Yang Y, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109102.
- [17] Zagrean AM, Hermann DM, Opris I, et al. Multicellular crosstalk between exosomes and the neurovascular unit after cerebral ischemia. therapeutic implications[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 811.
- [18] Mathieu M, Martin-Jaulat L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9–17.
- [19] Pluchinos S, Smith JA. Explicating Exosomes: Reclassifying the Rising Stars of Intercellular Communication[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 225–227.
- [20] Chen XQ, Qian BY, Kong XL, et al. A20 protects neuronal apoptosis stimulated by lipopolysaccharide-induced microglial exosomes[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 712: 134480.
- [21] Zang J, Wu Y, Su X, et al. Inhibition of PDE1-B by vinpocetine regulates microglial exosomes and polarization through enhancing autophagic flux for neuroprotection against ischemic stroke [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 616590.

(责任编辑: 李青颖)