

乳脂球-表皮生长因子 8 对脑缺血后小胶质细胞极化的调控作用机制研究

方莹莹¹ 张靖慧^{2,3}

¹南方医科大学基础医学院, 广州 510515; ²广东省康复医学会, 广州 510000; ³中山大学附属第三医院康复医学科, 广州 510630

通信作者: 张靖慧, Email: cathychuang@sina.com

【摘要】 目的 探寻乳脂球-表皮生长因子 8(MFG-E8)在脑缺血后小胶质细胞极化的调控作用和作用机制。方法 选取 C57BL/6 小鼠 40 只, 采用随机数字表法将其分为假手术组、缺血组、重组小鼠乳脂球-表皮生长因子 8(rmMFG-E8)组和 rmMFG-E8+科利维林(Colivelin TFA)组, 每组 10 只小鼠。缺血组、重组小鼠乳脂球-表皮生长因子 8(rmMFG-E8)组和 rmMFG-E8+科利维林(Colivelin TFA)组制作大脑中动脉梗死再灌注模型(tMCAO), 其中 rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组小鼠在造模成功后立即进行脑梗侧侧脑室立体定位注射, 分别给予总量 2 μ l, 浓度 0.4 μ g/ μ l 的 rmMFG-E8 和总量 2 μ l, 浓度 0.4 μ g/ μ l 的 rmMFG-E8+总量 2 μ l, 浓度 5 pmol/ μ l 的 Colivelin TFA 干预。造模成功 1、3、5、7 d 后采用行为学实验检测神经功能恢复情况, 造模成功 7 d 后采用组织染色观察脑梗死灶体积比例, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应检测小胶质细胞 M1 极化标记物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、M2 极化标记物精氨酸酶 1(Arg1)和小鼠类几丁质酶 3 样分子(Ym1)、MFG-E8 的基因表达水平, 通过免疫印迹实验检测 MFG-E8、磷酸化信号转导与转录因子 3(p-STAT3)和细胞因子信号传导抑制因子-3(SOCS3)蛋白表达水平。**结果** 行为学检测发现, 缺血组、rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组在造模成功 1、3、5、7 d 后的转棒时间和 mNSS 评分与假手术组同时间点比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模成功 7 d 后, 与假手术组比较, 缺血组 MFG-E8 基因和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$), M1 极化标记物 iNOS 基因的表达显著增高($P < 0.05$), M2 极化标记物 Arg1 和 Ym1 基因的表达显著下降($P < 0.05$), p-STAT3/STAT3 蛋白的表达显著上调($P < 0.05$), SOCS3/GAPDH 蛋白的表达显著下调($P < 0.05$)。造模成功 7 d 后, 与缺血组比较, rmMFG-E8 组的梗死灶体积显著缩小($P < 0.05$)。造模成功 7 d 后, rmMFG-E8+Colivelin TFA 组 iNOS 基因的表达较 rmMFG-E8 组明显增加($P < 0.05$), Arg1 和 Ym1 基因的表达明显降低($P < 0.05$), p-STAT3/STAT3 的表达显著上调($P < 0.05$), SOCS3/GAPDH 的表达显著下降($P < 0.05$)。**结论** MFG-E8 可通过 STAT3 信号通路促进脑缺血后小胶质细胞向 M2 型极化, 促进脑缺血小鼠神经功能的恢复。

【关键词】 大脑中动脉梗死再灌注模型; 小胶质细胞极化; 乳脂球-表皮生长因子 8; 信号转导与转录因子 3

基金项目: 广东省自然科学基金(2016A030313314)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.07.003

The mechanism by which epidermal growth factor 8 regulates microglia polarization in transient cerebral ischemia

Fang Yingying¹, Zhang Jinghui^{2,3}

¹School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Guangdong Association of Rehabilitation Medicine, Guangzhou 510000, China; ³Department of Rehabilitation Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: Zhang Jinghui, Email: cathychuang@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the function of epidermal growth factor 8 in the polarization of microglia after ischemic brain injury and its mechanism. **Methods** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into a sham operation group, an ischemia group, a recombinant mouse milk fat globule epidermal growth factor 8 (rmMFG-E8) group and an rmMFG-E8 + colivelin TFA group, each of 10. The middle cerebral artery occlusion and reperfusion model (tMCAO) was established in all except the sham operation group. Right after the modelling the mice in the rmMFG-E8 group were immediately injected with 2 μ L of 0.4 μ g/ μ L of rmMFG-E8 into the ventricle contralateral to the cerebral infarction. The rmMFG-E8+Colivelin TFA group was injected with the same dose of rmMFG-E8 plus 2 μ L

of 5pmol/ μ L colivelin TFA. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day after the modelling, neurological functioning was documented using behavioral tests. The volume proportion of the cerebral infarction was observed after tissue staining on the 7th day after the operation. The gene expression levels of M1 polarization marker-induced nitric oxide synthase (iNOS), M2 polarization marker arginase-1 (Arg1) and mouse chitinase-like molecule 3 (YM1) in the microglia were detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reactions. The protein expression levels of MFG-E8, phosphorylated signal transduction and transcription factor 3 (p-STAT3) and cytokine signal transduction inhibitor-3 (SOCS3) were determined using western blotting. **Results** The behavior tests revealed significant differences between the sham operation group and the other groups on all four days. Compared with the sham operation group, the average expression of MFG-E8 gene and its protein, Arg1 and Ym1, and the SOCS3/GAPDH protein ratio had decreased significantly in the ischemic group, while the average expression of iNOS and the p-STAT3/STAT3 protein ratio had increased significantly. On the 7th day after the modelling, compared with the ischemic group, the infarct volume was significantly smaller in the rmMFG-E8 group. The average expression of iNOS and the average p-STAT3/STAT3 ratio in the rmMFG-E8+colivelin TFA group had increased significantly compared with the rmMFG-E8 group, while the average expression of Arg1 and Ym1, and the SOCS3/GAPDH ratio were significantly lower. **Conclusion** MFG-E8 promotes the polarization of M2-type microglia after cerebral ischemia through STAT3 signaling, promoting the recovery of neurological functioning.

【Key words】 Cerebral artery occlusion; Microglia polarization; Epidermal growth factor 8; Signal transduction and transcription factor 3

Funding: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313314)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.07.003

缺血性脑卒中是由多种因素导致脑血流量降低所引起的脑血管疾病之一,其高致残率和高死亡率严重威胁着人们的健康^[1]。小胶质细胞是中枢神经系统固有的免疫效应细胞,分布于灰质和白质中,约占脑细胞总数的 10%^[2],它们在维持中枢内环境的稳定、防止病原的入侵、调节神经系统病理生理过程中起着重要作用。研究表明,小胶质细胞是脑缺血损伤后首先产生免疫应答的细胞之一^[3],在脑缺血损伤后,它们会快速迁移到损伤部位,转化为激活状态。激活后的小胶质细胞可分为 M1 和 M2 两种表型,即小胶质细胞极化,其中 M1 型小胶质细胞主要释放促炎因子,引起组织的炎性损伤,促使神经元细胞死亡;M2 型小胶质细胞主要分泌抗炎、修复因子,具有抑制免疫炎症反应和促进组织修复的作用^[4]。因此,调节小胶质细胞向抗炎和组织修复表型的极化可能是脑缺血的一种有效的治疗策略。目前,调节脑缺血后小胶质细胞极化方向的机制尚不明确。

乳脂球-表皮生长因子 8 (milk fat globule epidermal growth factor 8, MFG-E8) 是一种分泌型糖蛋白和哺乳动物乳脂球膜 (milk fat globule membrane, MFGM) 的主要成分^[5]。有研究发现, MFG-E8 可抑制脑损伤后细胞凋亡和炎症反应^[6], 并且可选择性调节小胶质细胞向 M2 型极化^[7-8], 但其在脑缺血中的作用机制尚不明确。因此,本研究观察了 MFG-E8 在脑缺血后小胶质细胞极化过程中的作用, 以期对缺血性脑卒中的治疗探索新的靶点。

材料与方 法

一、实验动物

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 体重 20~22 克, 动物合格证号为 SCXK (粤) 2016-0041。本研究方案经南方医科大学动物研究委员会批准。动物可自由获取食物和水, 自动控制昼夜循环 (12/12 h), 室温 (22±1) °C, 将小鼠饲养在 12 h 光-暗循环下, 并允许在手术后自由获取食物和水。

二、实验仪器和试剂

小鼠脑立体定位仪和适配器 (购自深圳瑞沃得公司), 凝胶成像系统 (购自美国 BIO-RAD 公司), 7500 Real-Time PCR System 仪 (购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 重组小鼠乳脂球-表皮生长因子 8 (recombinant murine milk fat globule epidermal growth factor 8, rmMFG-E8) 试剂 (购自美国 R&D Systems 公司), 科利维林 TFA (Colivelin TFA) 试剂 (购自美国 Medchemexpress 公司), 线栓 (购自豫顺生物公司), 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 试剂 (购自美国 Sigma 公司), 动物 RNA 提取试剂 (Trizol) (购自日本 Takara 公司), 互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 合成试剂盒 (购自日本 Takara 公司), 磷酸化细胞信号传导与转录活化因子-3 (phosphorylated signal transducers and activators of transcription, p-STAT3) 一抗 (购自美国 Abcam 公司), 信号转导与转录因子 3 (signal transduc-

ers and activators of transcription, STAT3) 一抗(购自美国 Abcam 公司), 细胞因子信号传导抑制因子-3(suppressor of cytokine signaling-3, SOCS3) 一抗(购自美国 Abcam 公司), 磷酸甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗(购自美国 Santa Cruz 公司), 乳脂球-表皮生长因子 8(MFG-E8) 一抗(购自日本 MBL 公司), 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 引物(购自中国华大基因), 精氨酸酶 1(arginase 1, Arg1) 引物(购自中国华大基因), 小鼠类几丁质酶 3 样分子(Ym1) 引物(购自中国华大基因), 荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 混合液(购自美国 DBI 公司), 化学发光试剂处理膜(购自中国碧云天公司), 二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒(购自中国碧云天公司), 放射免疫沉淀(radio immunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液(购自中国碧云天公司), microRNA 提取试剂盒、TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒、TaqMan[®] Universal Master Mix & MicroRNA Assay(聚合酶链式反应试剂盒)(购自美国 ABI 公司)。

三、动物分组和缺血模型制备

采用随机数字表法将 40 只小鼠分为假手术组、缺血组、rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组, 每组 10 只小鼠。采用 Shigeno 等^[9]、Longa 等^[10] 和 Alkayed 等的方法^[11] 制作大脑中动脉梗死再灌注模型(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)。缺血组、rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组均先给予异氟烷诱导麻醉, 完全失去知觉后, 将小鼠仰卧固定于手术台上, 颈部正中剪开皮肤, 分离出颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 颈外动脉上的两个小动脉分支用电烙铁烫断凝固。颈外动脉远心端用 5-0 手术线打死结, 拉紧结扎, 近心端用 4-0 手术线打死结, 中间用 5-0 手术线打活结, 颈总动脉用 4-0 手术线打活结。然后插入线栓, 勒紧 5-0 手术线以固定线栓, 然后剪开近心端处的 4-0 手术线, 继续插入线栓至颈外颈内动脉分叉处。剪断颈外动脉远心端, 拉住断端使线栓掉头, 然后顺势插入线栓, 直到感到阻力停。假手术组线栓只插入 0.5 cm, 其余步骤同缺血组。小鼠缺血 1 小时, 缺血期间放入恒温恒湿箱。小鼠待缺血时间完毕后, 拔出线栓, 缝合皮肤。小鼠苏醒后, 出现偏瘫症状, Longa 评分法 ≥ 3 分^[10] 即判定为脑缺血模型制作成功。

四、侧脑室立体定位注射

假手术组和缺血组造模成功后不做任何干预, rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组小鼠在造模成功后立即给予缺血侧侧脑室立体定位并注射对应

的试剂进行干预。将小鼠固定于立体定位仪上, 剪开颅顶皮肤, 3% 双氧水清理筋膜露出颅骨, 确定 Bregma 原点, 注射区域为缺血侧侧脑室, 三维坐标为前后 -0.58 mm, 偏侧 1.25 mm, 深度 2.25 mm。rmMFG-E8 组给予 rmMFG-E8 的浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 总量 $2 \mu\text{l}$; rmMFG-E8+Colivelin TFA 组给予 rmMFG-E8 浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 总量 $2 \mu\text{l}$, Colivelin TFA 浓度为 $5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, 总量 $2 \mu\text{l}$ 。4 组小鼠均于 rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组干预完成后放回原饲养环境, 常规饲养。

五、行为学检测

造模成功 1、3、5、7 d 后分别对 4 组小鼠进行转棒实验和神经功能缺损严重程度评分(modified neurological severity score, mNSS)。

1. 转棒实验: 将小鼠放在加速旋转的转棒上(5 min 内从 $4 \text{ r}/\text{min}$ 加速到 $40 \text{ r}/\text{min}$), 直到小鼠掉落, 记录停留时间, 5 min 内仍未掉下按 5 min 计算。每只小鼠每日进行 3 次实验, 实验间隔 20 min, 计算平均停留时间。

2. mNSS 评分^[12]: 该量表包括运动试验、感觉试验、平衡木试验、反射丧失和不正常运动。①运动功能检测——提起小鼠尾部, 正常为 0 分, 前肢屈曲为 1 分, 后肢屈曲为 1 分, 头部在 30 s 内沿垂直轴移动 $> 10^\circ$ 1 分, 最大值 3 分; 将小鼠放置地面, 正常为 0 分, 不能直走为 1 分, 向轻瘫侧打转为 2 分, 向轻瘫侧倾倒为 3 分。②感觉试验——触觉反应采用牙签碰触前爪掌区来检测, 正常为 0 分, 减缓反应为 1 分, 无反应为 2 分; 本体感觉采用棉棒放在双侧脖颈处检测, 正常为 0 分, 减缓反应为 1 分, 没有反应为 2 分)。③平衡木试验——将小鼠置于长 20 cm, 直径 5 cm, 离地 10 cm 的平衡木上, 正常值为 0 分, 最大值 6 分。④反射丧失和不正常运动——接触外耳道时无反应为 1 分, 用棉签接触角膜时不眨眼为 1 分, 对快弹硬纸片的噪音无运动反应为 1 分, 出现癫痫、肌痉挛、肌张力障碍 1 分。mNSS 总分最高 18 分, 总分越高则神经功能缺损程度越重。

六、标本采集

4 组小鼠均于造模成功 7 d 后麻醉后断头, 取出大脑组织, 放入 0.1 M 磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS) 的冰水混合物中 2 min, 将 4 组随机分为两部分, 一部分小鼠大脑组织待组织染色, 另一部分小鼠的大脑组织用预冷脑模具将大脑以 2 mm 间距切片, 梗死灶肉眼可见, 用显微镜镊夹离梗死灶, 取梗死灶外延 1 mm 半暗带区域脑组织放入液氮中速冻后转 -80°C 超低温冰箱储存待测。

七、各项指标检测方法

4 组大脑组织均行 TTC 染色观察其梗死灶体积变

化,采用 RT-qPCR 和蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测假手术组和缺血组半暗带区 MFG-E8 基因和蛋白表达水平,采用 RT-qPCR 检测 4 组 M1 极化标记物一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和 M2 极化标记物(Arg1 和 Ym1)基因表达情况,同时采用蛋白免疫印迹法检测 4 组脑组织 p-STAT3/STAT3、SOCS3/GAPDH 蛋白表达比变化情况。检测方法如下。

1. TTC 染色:取小鼠大脑组织放入 0.1 M PBS 的冰水混合物中 2 min 后大脑组织变硬,取出放入预冷脑模具,以 1 mm 间距切片,将切片放入 2% TTC 染液中(0.1 M PBS 配制),在室温下正反面各染 5 min 后,取出放入 4% 甲醛溶液中固定 6 h 后拍照。通过 Image J 图像处理软件测量并计算脑梗死体积。

2. RT-qPCR 检测:取相应组别半暗带脑组织样本 100 mg,加入 TRNzol 低温快速匀浆并使用氯仿,异丙醇,无水乙醇,DEPC 水提取总 RNA,采用紫外分光光度计检测所提取的 RNA 浓度,使用逆转录试剂盒进行逆转录和 RT-PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 反应,以 GAPDH 基因为内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算出样品 MFG-E8, iNOS, Arg1, Ym1 的相对表达量。上下游引物由华大基因合成,引物序列如表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
MFG-E8	tagccctctctcacacatcaca	aaggggcaagagaggaacca
iNOS	gcagagattggaggccttgggtg	gggttgttgttgcgaacttcagtc
Arg1	ggaagacagcagaggagggtg	tatggttaccctcccgltga
Ym1	tcacttacacacatgagcaac	cggttctgaggagtagacca
GAPDH	gcagtccectgactgccaac	ctgtgtgatgtaaatgtcctct

3. Western blot 检测:取对应组别半暗带脑组织样本 100 mg,低温快速匀浆并提取总蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、转膜和封闭,分别加入 MFG-E8、p-STAT3、STAT3、SOCS3 一抗(1:1000)4 ℃ 孵育过夜,次日吐温-20 羟甲基氨甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween20, TBST)漂洗,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:3000)室温孵育 1 h, TBST 漂洗,条带曝光,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,最后凝胶成像系统分析图像并计算光密度值。

八、数据分析

本研究采用 GraphPad Prism 软件(Prism 7 版,美国 San Diego 公司)进行统计学分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析验证多组间差异显著性,两两比较则采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、4 组小鼠行为学检测结果显示和梗死灶体积比较行为学检测发现,缺血组、rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组在造模成功 1、3、5、7 d 后的转棒时间和 mNSS 评分与假手术组同时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),造模成功 1 d 后,缺血组、rmMFG-E8 组和 rmMFG-E8+Colivelin TFA 组的转棒时间和 mNSS 评分组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),造模成功 3、5、7 d 后,rmMFG-E8 组的转棒时间和 mNSS 评分与缺血组同时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而造模成功 3、5、7 d 后,rmMFG-E8+Colivelin TFA 组的转棒时间和 mNSS 评分与缺血组同时间点比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图 1A。TTC 染色显示,造模成功 7 d 后,rmMFG-E8 组脑梗死灶体积显著低于缺血组($P < 0.05$),rmMFG-E8+Colivelin TFA 组脑梗死灶体积显著大于 rmMFG-E8 组($P < 0.05$),但与缺血组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图 1B。

二、脑缺血对 MFG-E8 基因和蛋白表达的影响

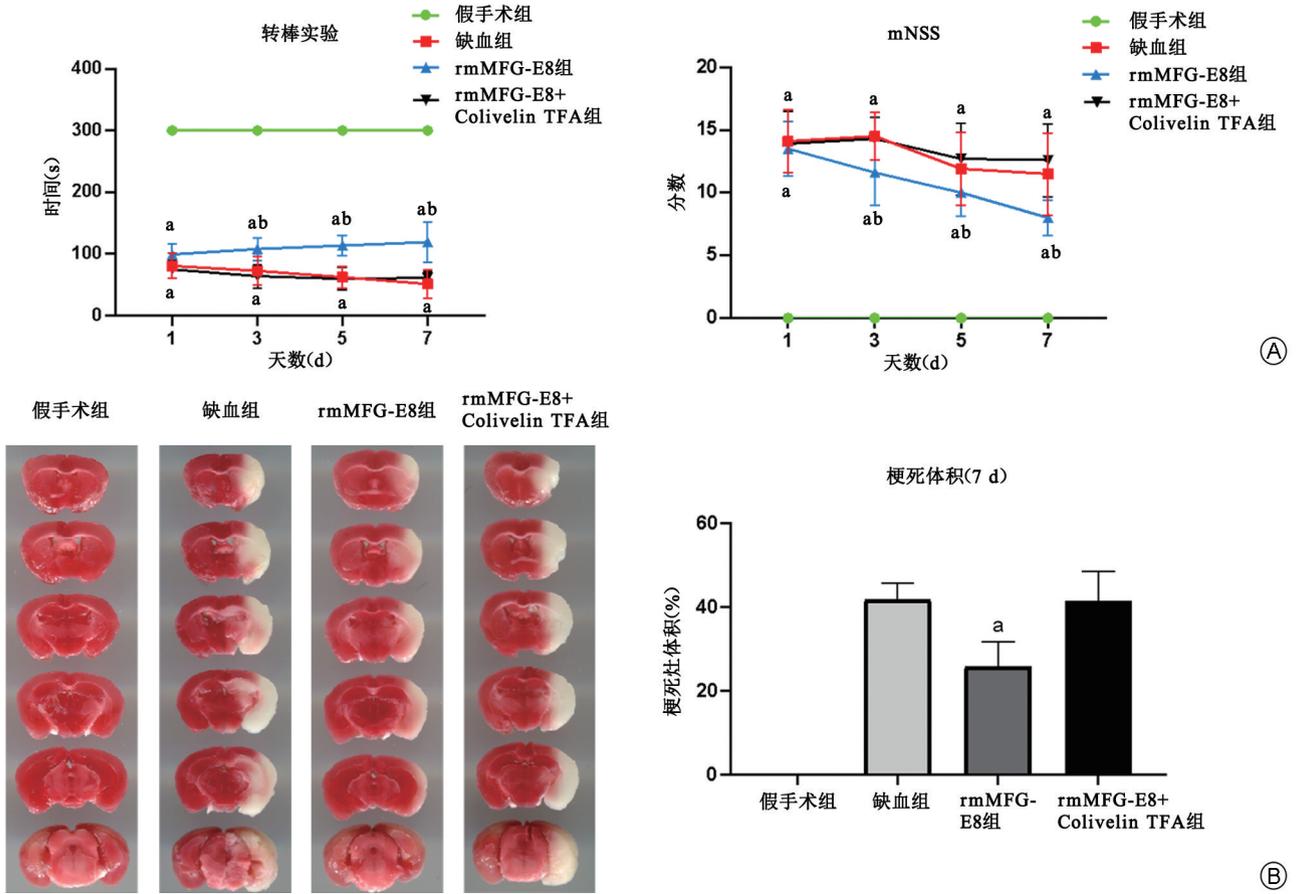
RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,造模成功 7 d 后,缺血组梗死半暗带区域脑组织 MFG-E8 基因和蛋白表达量较假手术组均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 2。

三、4 组小鼠造模成功 7 d 后缺血半暗带小胶质细胞 M1/M2 极化标志物的基因表达情况

造模成功 7 d 后,缺血组半暗带小胶质细胞 M1 极化标记物(iNOS)基因表达较假手术组显著上调($P < 0.05$),M2 极化标记物(Arg1 和 Ym1)基因表达较假手术组明显下调($P < 0.05$)。造模成功 7 d 后,rmMFG-E8 组 iNOS 基因表达较缺血组明显下调($P < 0.05$),Arg1 和 Ym1 基因表达则较缺血组显著上调($P < 0.05$)。造模成功 7 d 后,rmMFG-E8+Colivelin TFA 组 iNOS 的基因表达较 rmMFG-E8 组明显上调($P < 0.05$),Arg1 和 Ym1 基因表达较 rmMFG-E8 组明显下调($P < 0.05$),详见图 3。

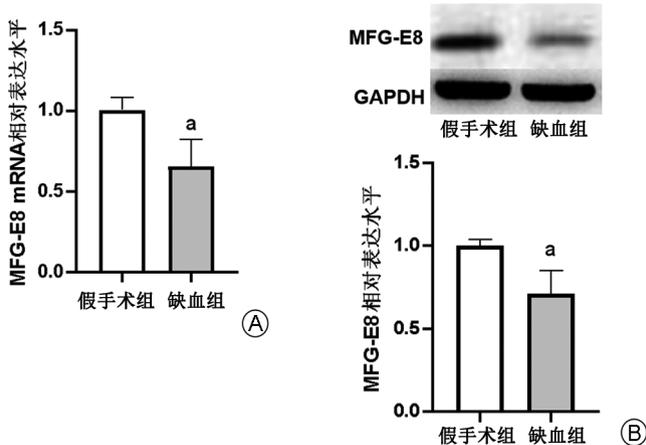
四、4 组造模成功 7 d 后缺血半暗带 p-STAT3 和 SOCS3 蛋白的表达情况

造模成功 7 d 后,缺血组 p-STAT3/STAT3 蛋白表达较假手术组明显上调($P < 0.01$),SOCS3/GAPDH 蛋白的表达较假手术组则显著下调($P < 0.05$),rmMFG-E8 组 p-STAT3/STAT3 蛋白表达较缺血组显著下调($P < 0.01$),SOCS3/GAPDH 蛋白的表达缺血组则明显上调($P < 0.05$)。rmMFG-E8+Colivelin TFA 组 p-STAT3/STAT3 蛋白的表达较 rmMFG-E8 组显著上调($P < 0.05$),SOCS3/GAPDH 蛋白表达较 rmMFG-E8 组则明显下调($P < 0.05$),详见图 4。



注: A 为 4 组小鼠造模成功后不同时间点转棒实验和 mNSS 评分情况; B 为脑组织横切面图(TTC 染色)和脑梗死体积比例半定量分析;与假手术组同时时间点比较, ^a $P < 0.05$;与缺血组同时时间点比较, ^b $P < 0.05$

图 1 4 组小鼠行为学检测 results 和梗死灶体积比较



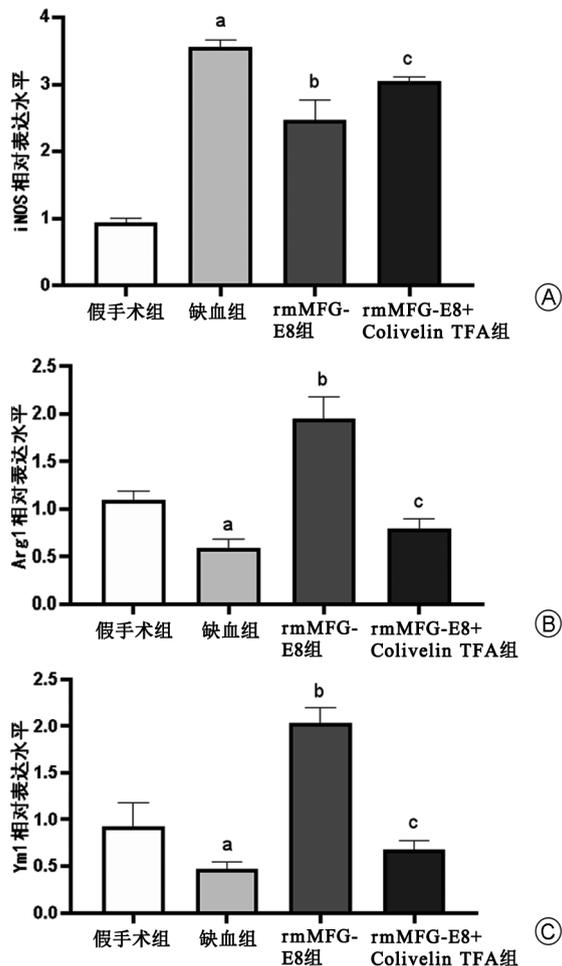
注: A 为造模成功 7 d 后,假手术组和缺血组脑缺血半暗带组织 MFG-E8 基因的表达情况; B 为造模成功 7 d 后,假手术组和缺血组脑缺血半暗带组织 MFG-E8 蛋白的表达情况;与假手术组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 假手术组和缺血组造模成功 7 d 后缺血半暗带区 MFG-E8 基因和蛋白表达水平的比较

讨论

本研究结果显示,脑缺血后,C57BL/6 小鼠半暗带脑组织 MFG-E8 的表达显著降低,梗死半暗带区小胶质细胞 M1 型标志物 iNOS 的表达则显著增高,且 M2 型标志物 Arg1 和 Ym1 表达亦显著降低。通过外源性加入重组 rmMFG-E8 后,脑缺血 C57BL/6 小鼠的梗死灶体积明显缩小,小胶质细胞 M2 型标志物表达亦明显增高,而 M1 型标志物的表达则显著降低,且神经功能行为学情况也明显改善。本研究结果还显示,rmMFG-E8 可下调缺血后 p-STAT3 蛋白的表达,并上调 SOCS3 蛋白的表达。以上结果提示,MFG-E8 可调控脑缺血后小胶质细胞向 M2 型极化,具有神经保护作用,SOCS3/STAT3 可能是 MFG-E8 调控小胶质细胞极化的重要信号通路。

小胶质细胞是脑内常驻的免疫细胞,在中枢神经系统免疫防御过程中扮演着重要的作用。当接触到内源性信号(如神经元死亡)或外源性刺激信号(如感染)时,小胶质细胞可迅速由静息状态激活,活化的小



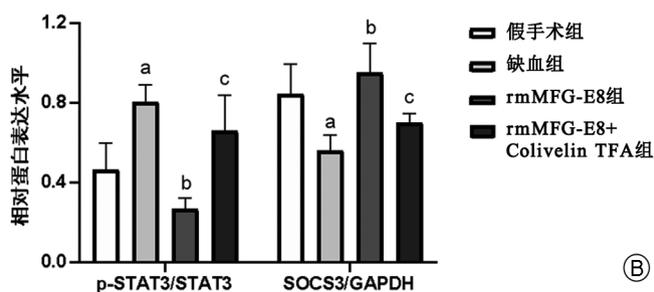
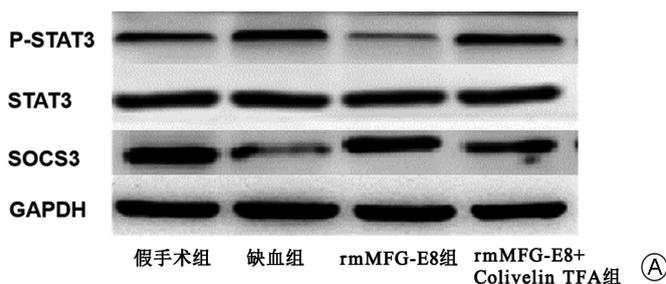
注: A 为 4 组小鼠 iNOS 的基因表达, B 为 4 组小鼠 Arg1 的基因表达, C 为 4 组小鼠 Ym1 的基因表达; 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$, 与缺血组比较, ^b $P < 0.05$, 与 rmMFG-E8 组比较, ^c $P < 0.05$

图 3 4 组小鼠造模成功 7 d 后小胶质细胞 M1/M2 型极化标志物的基因表达情况比较

胶质细胞有 M1/M2 两种表型极化: M1 型小胶质细胞释放促炎症因子、分泌蛋白酶和生成活性氧 (iNOS), M2 型小胶质细胞释放抗炎成分和神经营养物质 (如神经营养因子、精氨酸酶 1、类几丁质酶 3 样分子 3) 来保护和维持受损神经元。本研究结果显示, 脑缺血后小胶质细胞被激活, 且 M1 极化标记物 iNOS 表达增

高, M2 极化标记物 Arg1 和 Ym1 表达降低, 提示急性脑缺血引起小胶质细胞主要向 M1 型极化, 这与相关文献报道结果一致^[13], 即过度活化的小胶质细胞会产生严重的神经毒性作用, 过强的炎症反应可能会进一步加重组织损伤。本课题组认为, 在治疗脑缺血的过程中, 应避免小胶质细胞过度活化导致的神经元损伤, 小胶质细胞也成为了抗炎药物的重要靶点。

组织修复和炎症的消除过程中, 凋亡细胞的有效清除非常重要。小胶质细胞在中枢神经系统免疫防御中发挥着类似外周神经系统中巨噬细胞的功能, 对凋亡细胞的清除有着重要作用。小胶质细胞识别、吞噬凋亡细胞主要由复杂的蛋白受体介导^[14], 其中 MFG-E8 被认为是一种识别凋亡细胞吞噬信号的重要桥联受体^[15]。小胶质细胞产生和分泌 MFG-E8, 通过 COOH-末端因子 VIII 同源区域特异性识别并结合到凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸信号后, MFG-E8 又通过 NH2-末端表皮生长因子样区域结合到小胶质细胞 $\alpha V\beta 3$ 整合素上, 使小胶质细胞和凋亡细胞间形成连接, 从而介导小胶质细胞对凋亡细胞吞噬^[16-17]。有研究提出, 外源性加入重组 MFG-E8 可有效地增强小胶质细胞的吞噬能力, 而用 MFG-E8 的同分异构体 D89E 蛋白可有效抑制小胶质细胞对凋亡细胞的吞噬能力^[18-19]。以上研究证明, MFG-E8 在小胶质细胞吞噬功能中具有关键作用。研究表明, 内源性 MFG-E8 产生不足可出现细胞吞噬功能障碍和促炎反应^[5], 而凋亡细胞的吞噬作用也可能诱导抗炎细胞因子的释放^[20], 如凋亡细胞不足以被小胶质细胞清除时, 小胶质细胞便会释放炎症因子^[21], 因此通过增强小胶质细胞的吞噬作用可能会影响其极化的趋势。本研究结果显示, 脑缺血后半暗带区域的 MFG-E8 基因和蛋白表达均被抑制, 导致半暗带区内源性 MFG-E8 产生减少; 通过外源性加入重组 MFG-E8 可显著降低梗死灶体积, 促进神经行为学功能改善, 抑制 M1 型小胶质细胞极化, 上调 M2 型极化标志物基因表达。本课题组认为, 本研究可以证明 MFG-E8 具有很强的神经保护作用。



注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$, 与缺血组比较, ^b $P < 0.05$, 与 rmMFG-E8 组比较, ^c $P < 0.05$

图 4 4 组小鼠缺血半暗带 p-STAT3 和 SOCS3 蛋白的表达情况比较

用,通过调控脑内 MFG-E8 的含量可影响脑缺血后半暗带区域小胶质细胞 M1/M2 型极化转移。

SOCS3/STAT3 是一条与脑缺血损伤病理变化密切相关的信号转导通路。STAT3 属于信号转导与转录因子 STAT 家族一员,可由干扰素、白细胞介素等多种细胞因子介导,在相应配体的激活下参与到细胞增殖、分化、凋亡、血管生成等多种生物学过程中^[22],与脑卒中的病理生理过程密切相关^[23]。细胞因子信号抑制物 3(SOCS3)是 STAT3 信号转导通路的关键内源性负调控因子^[24],SOCS3 可通过抑制 STAT 的磷酸化,从而发挥对 STAT3 信号转导通路的负反馈调节作用。本研究明确了 MFG-E8 对脑缺血后小胶质细胞极化转移可能的调控机制,通过外源性加入重组 MFG-E8 可有效地降低脑缺血后半暗带区域 p-STAT3 的表达,并上调 SOCS3 蛋白的表达,联合 STAT3 激动剂 Colivelin TFA 后则可逆转 MFG-E8 对 SOCS3/STAT3 信号转导通路和 MFG-E8 对脑缺血后小胶质细胞脑保护极化的影响。因此本课题组认为,SOCS3/STAT3 通路参与了 MFG-E8 对小胶质细胞极化的调控过程。

综上所述,MFG-E8 可通过 SOCS3/STAT3 信号转导通路调控脑缺血后小胶质细胞向 M2 型极化转移,发挥小胶质细胞抗炎抗凋亡的神经保护作用,从而促进脑缺血后神经功能恢复。

参 考 文 献

- [1] Maier B, Gory B, Taylor G, et al. Mortality and disability according to baseline blood pressure in acute ischemic stroke patients treated by thrombectomy: a collaborative pooled analysis[J]. J Am Heart Assoc, 2017,6(10):e006484. DOI: 10.1161/JAHA.117.006484.
- [2] 向彬,申婷,肖纯,等.小胶质细胞在缺血性脑卒中后活化特点的研究进展[J].中国医药导报,2017,14(9):31-33.
- [3] Kronenberg G, Uhlemann R, Richter N, et al. Distinguishing features of microglia- and monocyte-derived macrophages after stroke[J]. Acta Neuropathol,2018, 135(4):551-568. DOI: 10.1007/s00401-017-1795-6.
- [4] Orihuela R, McPherson CA and Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol,2016,173(4):649-665.DOI: 10.1111/bph.13139.
- [5] Rikinari H, Masato T, Kay M, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice[J]. Science, 2004, 304(5674):1147-1150. DOI: 10.1126/science.1094359.
- [6] Xiao Y, Li G, Chen Y, et al. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 pretreatment attenuates apoptosis and inflammation via the integrin-β3 pathway after surgical brain injury in rats[J]. Front Neurol, 2018,9:96. DOI: 10.3389/fneur.2018.00096.
- [7] Wu J, Yang H, Cheng J, et al. Knockdown of milk-fat globule EGF factor-8 suppresses glioma progression in GL261 glioma cells by repressing microglial M2 polarization[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11):8679-8690. DOI: 10.1002/jcp.29712.
- [8] Shi X, Cai X, Di W, et al. MFG-E8 selectively inhibited Ab-induced

microglial M1 polarization via NF-κB and PI3K-Akt pathways[J]. Mol Neurobiol,2017,54(10):7777-7788.

- [9] Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, et al. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema[J]. J Neurosurg, 1985, 63(2):272-277. DOI: 10.3171/jns.1985.63.2.0272.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke. 1989,20(1):84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [11] Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, et al. Estrogen and Bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke[J]. J Neurosci, 2001,21(19):7543-7550. DOI:10.1523/JNEUROSCI.21-19-07543.2001.
- [12] Guan X, Wang Y, Kai G, et al. Cerebrolysin ameliorates focal cerebral ischemia injury through neuroinflammatory inhibition via CREB/PGC-1α Pathway[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:1245. DOI: 10.3389/fphar.2019.01245.
- [13] Hu X, De Silva TM, Chen J, et al. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke[J]. Circ Res,2017,120(3):449-471. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308427.
- [14] Maiti SN, Balasubramanian K, Ramoth JA, et al. β-2-Glycoprotein 1-dependent macrophage uptake of apoptotic cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(7):3761-3766. DOI: 10.1074/jbc.M704990200.
- [15] Liu Y, Yang X, Guo C, et al. Essential role of MFG-E8 for phagocytic properties of microglial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55754. DOI: 10.1371/journal.pone.0055754.
- [16] Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, et al. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes[J]. Nature, 2002;417(6885):182-187. DOI: 10.1038/417182a.
- [17] Fuller AD, Van Eldik LJ. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2008, 3(4):246-256. DOI: 10.1007/s11481-008-9118-2.
- [18] Saas P, Kaminski S, Perruche S. Prospects of apoptotic cell-based therapies for transplantation and inflammatory diseases[J]. Immunotherapy,2013,5(10):1055-1073. DOI: 10.2217/imt.13.103.
- [19] Cheyuo C, Jacob A, Wu R, et al. Recombinant human MFG-E8 attenuates cerebral ischemic injury: Its role in anti-inflammation and anti-apoptosis[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(2):890-900. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.018.
- [20] Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease[J]. Neuroscience, 2009,158(3):1030-1038. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.046.
- [21] Scoles DR, Nguyen VD, Qin Y, et al. Neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor schwannomin and its interacting protein HRS regulate STAT signaling[J]. Hum Mol Genet,2002,11(25):3179-3189. DOI: 10.1093/hmg/11.25.3179.
- [22] Gao P, Niu N, Wei T, et al. The roles of signal transducer and activator of transcription factor 3 in tumor angiogenesis[J]. Oncotarget, 2017,8(40):69139-69161. DOI: 10.18632/oncotarget.19932.
- [23] Wang XL, Qiao CM, Liu JO, et al. Inhibition of the SOCS1-JAK2-STAT3 signaling pathway confers neuroprotection in rats with ischemic stroke[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(1):85-98. DOI: 10.1159/000484585.
- [24] Liu C, Jiang D. High glucose-induced LIF suppresses osteoblast differentiation via regulating STAT3/SOCS3 signaling[J]. Cytokine, 2017, 91:132-139. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.12.016.

(修回日期:2021-06-11)

(本文编辑:阮仕衡)