

外泌体转运 miR-223 改善创伤性脑损伤的作用和机制

孙衍昶,徐鹏翔,何青龙,欧阳一彬,莫业和

摘要 目的 探究外泌体(Exo)转运 miR-223 对创伤性脑损伤(TBI)大鼠脑组织损伤与小胶质细胞活化的影响及机制。

方法 通过脂质体法分别将 miR-NC 质粒、miR-223 mimic 质粒转染至 HEK293 细胞,实时荧光定量 PCR 测定细胞中 miR-223 表达水平;提取转染后 HEK293 细胞 Exo,通过透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析及 Western blot 对 Exo 进行鉴定,并采用实时荧光定量 PCR 测定 Exo 中 miR-223 表达水平;将 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、NC-Exo 组、miR-223-Exo 组,每组 10 只。除假手术组外的 3 组大鼠均通过改良 Feeney 自由落体法制备 TBI 模型,NC-Exo 组与 miR-223-Exo 组大鼠分别经尾静脉注射转染 miR-NC 质粒细胞来源的 Exo、转染 miR-223 mimic 质粒细胞来源的 Exo;2 周后,苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠脑组织病理学变化,尼氏(Nissl)染色检测各组大鼠尼氏体改变与分布情况,酶联免疫吸附实验(ELISA)测定各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)水平,免疫荧光双染法观察各组大鼠脑组织内 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)与离子钙接头蛋白(Iba-1)表达,Western blot 测定各组大鼠脑组织内 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的蛋白表达水平。**结果** 细胞转染后,与对照组和 miR-NC 组比较,miR-223 组细胞中 miR-223 相对表达量显著增加($P < 0.05$);分离的颗粒物具有典型的 Exo 形态,粒径峰值大约处于 120 nm,Exo 标志蛋白 CD9、CD63 及 CD81 均明显高表达,且 miR-223 相对表达量显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,miR-223-Exo 组大鼠脑组织损伤现象得到改善,尼氏体形态恢复且数目增加,血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低($P < 0.05$),脑组织内 NLRP3 与 Iba-1 荧光染色强度减少($P < 0.05$),同时,脑组织内 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白相对表达量均下调($P < 0.05$)。**结论** Exo 转运 miR-223 能够明显改善 TBI 大鼠脑组织损伤,抑制小胶质细胞活化,该作用可能与抑制 NLRP3 炎性小体活化相关。

关键词 创伤性脑损伤;miR-223;外泌体;小胶质细胞;NLRP3 炎性小体

中图分类号 R 651

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1111-08

2023-06-06 接收

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(编号:21A200314)

作者单位:海南医学院第二附属医院神经外科一区,海口 570311

作者简介:孙衍昶,男,主治医师;

莫业和,男,主任医师,责任作者,E-mail: m88616@163.

com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.009

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是指由钝性、穿透力、加速力或减速力等外部物理力量引起的颅脑损伤^[1]。当发生 TBI 后,激活的小胶质细胞迅速迁移到损伤部位并释放大量炎症因子,破坏血脑屏障并诱导神经元凋亡,进一步加剧脑组织损伤^[2-3]。因此,适当抑制小胶质细胞活化能减少 TBI 后的脑组织病理损害。外泌体(exosome, Exo)是具有脂质双层膜结构的微小囊泡,由于其体积小,可有效避免单核巨噬细胞的吞噬作用,并自由穿过血管壁和细胞外基质,因此可作为传递载体将信号分子运转至其他细胞,以影响或调控相关功能^[4-5]。作为小的非编码 RNA 分子,miRNA 通过与靶标 mRNA 3'UTR 区域配对结合进行转录后调控。现已知多种 miRNA 在 TBI 后异常表达并参与调控病理进程^[6-7]。研究^[8]表明,miR-223 在脑损伤后表达异常,提高其表达可以抑制炎症反应,减轻脑组织损伤并减少神经元凋亡。基于此,该研究旨在明确 Exo 转运 miR-223 对 TBI 大鼠脑组织病变与小胶质细胞活化的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只 Sprague Dawley 雄性大鼠,SPF 级,体质量 200 ~ 220 g,购自海南药物研究有限责任公司[许可证号:SCXK(琼)2020-0007],饲养在通风良好、温度 20 ~ 25 °C、相对湿度 50% ~ 60%、光照/黑暗 12 h 循环的标准化动物饲养房内。动物饲养 7 d 后检查无异常即可用于实验,本研究方案经海南医学院第二附属医院伦理委员会批准(伦理批准号:H20220124-1)。

1.1.2 主要试剂 HEK293 细胞(美国 ATCC 细胞库),DMEM 培养基、胎牛血清及青-链霉素双抗液(美国 Gibco 公司),Lipofectamine 2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),TRIzol(日本 TaKaRa 公司),MicroRNA 反转录与定量检测试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司),通用型外泌体提取试剂盒(江苏凯

基生物公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 超敏发光液及 DAPI 染料(上海碧云天生物研究所), HE 染色液(北京百奥博莱生物公司), Nissl 染色液(北京索莱宝生物公司), 血清肿瘤坏死因子- 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) ELISA 检测试剂盒(上海酶研生物科技公司), Triton X-100(北京凯诗源生物科技公司), 兔抗 CD9 多克隆抗体、兔抗 CD63 多克隆抗体、兔抗 CD81 多克隆抗体、兔抗 Nod 样受体蛋白 3 (nod-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 多克隆抗体、兔抗凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC) 多克隆抗体、兔抗半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 多克隆抗体、小鼠抗离子钙接头蛋白 (ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1) 单克隆抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗与异硫氰酸荧光素标记的二抗(英国 Abcam 公司), miR-NC 质粒与 miR-223 mimic 质粒交由广州锐博生物技术公司设计构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将冷冻的 HEK293 细胞复苏, 添加 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清与 1% 青-链霉素双抗液)后置于 37 °C、5% CO₂ 环境下传代培养。将对数生长期的细胞按照 1×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板, 过夜培养, 分为 3 组: 对照组、miR-NC 组、miR-223 组。对照组细胞正常培养不处理, miR-NC 组与 miR-223 组按照 Lipofectamine 2000 试剂盒使用说明书步骤, 分别转染 miR-NC 质粒、miR-223 mimic 质粒至细胞, 转染 6 h 后更换为完全培养基, 继续培养 48 h, 收集细胞。

1.2.2 实时荧光定量 PCR TRIzol 法提取总 RNA, 1% 凝胶电泳检测 RNA 质量, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度并记录 A260/A280 值。选择 A260/A280 值在 1.8~2.1 的 RNA 样品, 按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription 试剂盒说明书步骤进行逆转录反应。再以第一条 cDNA 链为模板, 通过实时荧光定量 PCR 反应测定 miR-223 表达水平, 具体根据 TaqMan MicroRNA assay 试剂盒说明书配制反应体系, 在定量系统上设置程序进行扩增, 以 U6 作为内参基因进行标准化, 引物序列如下: miR-223 上游引物 5'-CGCUAUAUCUUUAUAUAUA-3', 下游引物 5'-CGCUAUCUUUCUAUAUAUGACUCCAUA-3'; U6 上游引物 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATA-TAC-3', 下游引物 5'-AAAAATATGGAACGCTTAC-GAATTTG-3'。反应结束后, 采用比较循环阈值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算样本内 miR-223 相对表达量, 实验重复 3 次。

3'; U6 上游引物 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATA-TAC-3', 下游引物 5'-AAAAATATGGAACGCTTAC-GAATTTG-3'。反应结束后, 采用比较循环阈值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算样本内 miR-223 相对表达量, 实验重复 3 次。

1.2.3 Exo 的提取与鉴定 提取: PBS 洗涤转染后的细胞, 将其置于高速低温离心机中以 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 移至干净离心管; 加入 250 μ l Exo 分离试剂, 轻轻混匀, 4 °C 下静置 2 h, 再以 8 500 r/min 离心 30 min, 弃去上清液, 留沉淀, 加入无菌 PBS 重悬, 获得 Exo 悬液, 保存于 -80 °C 中。鉴定: 吸取 10 μ l Exo 悬液滴入载样铜网上, 室温吸附 10 min, 吸弃多余液体, 滴加 2% 醋酸双氧乙铀溶液染色 1 min, 吸弃剩余染色液, 自然晾干, 将载样铜网置于样品室内, 通过透射电子显微镜观察 Exo 形态并摄取图像。采用纳米颗粒跟踪分析对 Exo 的布朗运动进行追踪和分析, 以计算直径和浓度。收集提取的 Exo, Western blot 测定 Exo 标志蛋白 CD9、CD63 及 CD81 表达情况, 并通过实时荧光定量 PCR 测定 miR-223 的表达水平。

1.2.4 Western blot 在 Exo 或脑组织中添加 RIPA 裂解液, 提取总蛋白, BCA 法对样品进行定量。100 °C 水浴煮沸使蛋白变性, 室温冷却后, 保存于 -20 °C。配置 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶, 固定电泳装置, 向电泳槽注入电泳缓冲液, 取等量蛋白样品上样至凝胶孔内, 选择适当电压进行电泳分离蛋白。结束后, 将分离的蛋白转印至 NC 膜上, 浸入 5% 脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h。Exo 鉴定中以免抗人 CD9、CD63、CD81 多克隆抗体作为一抗(1:1 000), 细胞测定中以免抗人 NLRP3、ASC、Caspase-1 多克隆抗体作为一抗(1:1 000), 将膜与稀释的一抗液置于 4 °C 下共孵育过夜。次日, TBST 洗膜, 加入对应二抗(1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗后, ECL 超敏发光液发光显影, 观察蛋白条带, 并通过 Image Pro Plus 软件分析细胞内蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 作为标准化内参蛋白, 计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 TBI 大鼠模型制备与分组处理 将 40 只大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、NC-Exo 组、miR-223-Exo 组, 每组 10 只。参考文献^[9], 根据改良 Feeney 自由落体法制备 TBI 大鼠模型, 将除假手术组外的其余 3 组大鼠通过腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 俯卧位固定于手术台上, 全身消毒, 头部备皮, 沿大鼠颅骨正中线作一纵切口, 完整暴露

右侧颅骨,于矢状缝旁开 3 mm 位置应用颅骨钻制作直径约 5 mm 的骨窗,将 40 g 砝码自上方 25 cm 高度自由落下,撞击脑组织,制备 TBI 大鼠模型,随后止血并缝合。假手术组除不进行撞击操作外,其余操作相同。造模结束后,NC-Exo 组和 miR-223-Exo 组大鼠分别通过尾静脉注入转染 miR-NC 质粒、miR-223 mimic 质粒细胞来源的 Exo (3×10^9 个微粒),假手术组和模型组同时尾静脉注射等量 PBS 溶液。

1.2.6 HE 染色 2 周后,颈椎脱臼法处死各组大鼠,在冰盘上分离脑组织,清洗干净后,置于 4% 多聚甲醛中固定过夜。将固定好的脑组织经二甲苯透明和梯度乙醇溶液水化,OCT 包埋,制备成 4 μm 厚的切片。切片进行脱水与透明,苏木精染色 5 min,流水冲洗,1% 盐酸/乙醇溶液中分化数秒,流水冲洗,氨水返蓝,伊红染色 3 min,再用梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,滴上中性树胶覆盖组织,封片,自然晾干,在光学显微镜下观察脑组织病理学变化并拍摄图像。

1.2.7 Nissl 染色 取制备的大鼠脑组织病理切片,二甲苯透明,梯度乙醇水化,加入 Nissl 染色 10 min,蒸馏水洗涤,无水乙醇处理,二甲苯透明,滴上中性树胶覆盖组织,封片,自然晾干,在光学显微镜下观察脑组织染色情况并拍摄图像,尼氏体呈淡紫蓝色。

1.2.8 ELISA 法 2 周后,各组大鼠经腹主动脉取血,室温静置 2 h,以 4 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,获得上清液。采用 ELISA 法对血清样本中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平进行测定,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.9 免疫荧光双染法 取制备的各组大鼠脑组织切片,使用含有 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液浸泡透膜,冷丙酮固定 10 min。滴加适量 5% 牛血清白蛋白溶液,室温封闭 30 min。弃去原液,滴加兔抗 NLRP3 多克隆抗体(1:100)与小鼠抗 Iba-1 单克隆抗体(1:100),进行双荧光标记,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 清洗切片 3 次,每次 5 min。滴加异硫氰酸荧光素标记的二抗(1:500),室温孵育 1 h。PBS 再次清洗切片,DAPI 避光染核 10 min,抗荧光淬灭封片剂封片,激光扫描共焦显微镜下观察脑组织染色情况并拍摄图像,通过 Image Pro Plus 软件分析蛋白染色的荧光强度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行数据统计与分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表

示。多组间数据比较用重复测量资料方差分析法,组内两两数据比较用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染效果 细胞转染结束后,实时荧光定量 PCR 测定结果显示,3 组细胞中 miR-223 相对表达量差异有统计学意义 ($F = 49.850, P < 0.001$)。miR-223 组细胞中 miR-223 相对表达量显著高于对照组和 miR-NC 组 ($P < 0.05$),见图 1。

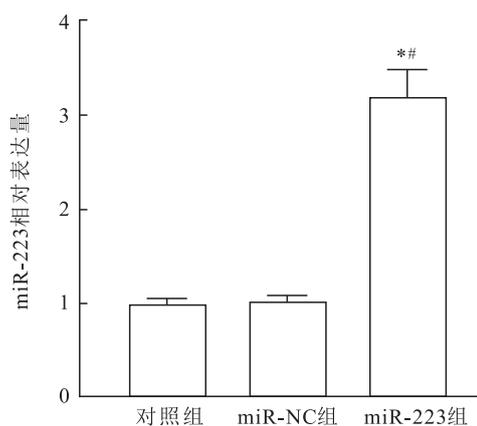


图 1 实时荧光定量 PCR 测定转染后细胞中 miR-223 表达变化与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$

2.2 Exo 鉴定结果 在透射显微镜下观察到分离的颗粒物为球形囊泡,类似圆形小碟状,由脂双层密封,见图 2A,粒径峰值大约处于 120 nm,见图 2B; Western blot 检测结果显示,Exo 标志蛋白 CD9、CD63 及 CD81 均明显高表达,见图 2C,以上结果说明成功分离到 Exo。此外,经实时荧光定量 PCR 测定发现,3 组 Exo 中 miR-223 相对表达量差异有统计学意义 ($F = 42.205, P < 0.001$),miR-223 组的 miR-223 相对表达量显著高于对照组与 miR-NC 组 ($P < 0.05$),见图 2D,说明成功获得高表达 miR-223 的 Exo。

2.3 Exo 转运 miR-223 改善 TBI 大鼠脑组织病理损伤 通过 HE 染色观察到假手术组大鼠脑组织内细胞形态规则,大小较为一致,胞质染色均匀;模型组大鼠脑组织间质水肿,细胞形态不规则,胞体肿胀或胞核皱缩、碎裂,且胞核呈深染色;与模型组比较,NC-Exo 组大鼠脑组织损伤现象未得到明显改善,而 miR-223-Exo 组大鼠脑组织间隙变小,细胞碎裂或胞核皱缩数目减少,损伤程度明显减小。

经 Nissl 染色后可见假手术组尼氏体染色均匀,

细胞结构清晰且分布均匀,数目较多;模型组大鼠尼氏体排列紊乱,出现坏死与胞核固缩、溶解的现象,数目也明显减少;与模型组比较,NC-Exo 组大鼠尼氏体仍表现为损伤,未发生明显改变,miR-223-Exo 组大鼠尼氏体数量明显增加,细胞形态恢复正常,见图 3。

2.4 Exo 转运 miR-223 抑制 TBI 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平 ELISA 法测定 4 组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,结果显示,各组间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异有统计学意义($F = 426.975$ 、 559.172 、 299.013 , $P < 0.001$)。模型组大鼠血清

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均高于假手术组 ($P < 0.05$);与模型组比较,miR-223-Exo 组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$),NC-Exo 组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.5 Exo 转运 miR-223 抑制 TBI 大鼠脑组织 NLRP3 与 Iba-1 荧光表达 4 组大鼠脑组织切片经免疫荧光染色后显示,NLRP3 与 Iba-1 的荧光染色强度差异有统计学意义 ($F = 56.117$ 、 60.346 , $P < 0.001$)。与假手术组比较,模型组大鼠脑组织内 NLRP3 与 Iba-1 的荧光染色强度显著增加 ($P <$

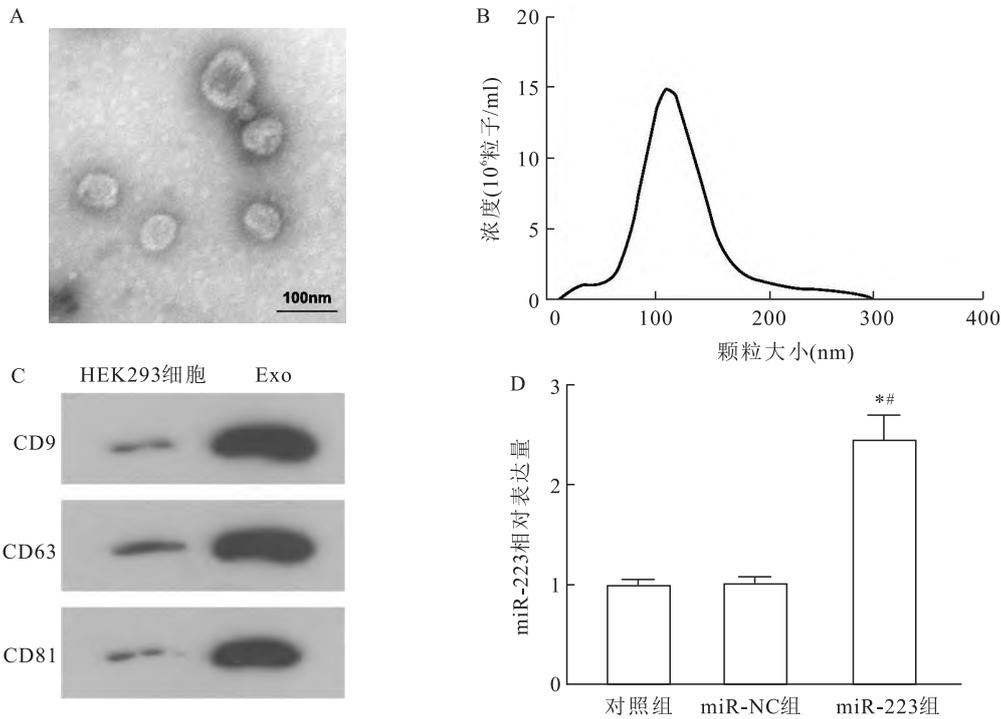


图 2 Exo 鉴定

A:透射电镜观察 Exo 形态 $\times 10\ 000$;B:纳米粒子跟踪分析法测定 Exo 直径粒径分布;C:Western blot 法检测 Exo 标志蛋白 CD9、CD63、CD81 表达;D:实时荧光定量 PCR 测定 Exo 中 miR-223 表达水平;与对照组比较: * $P < 0.05$;与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$

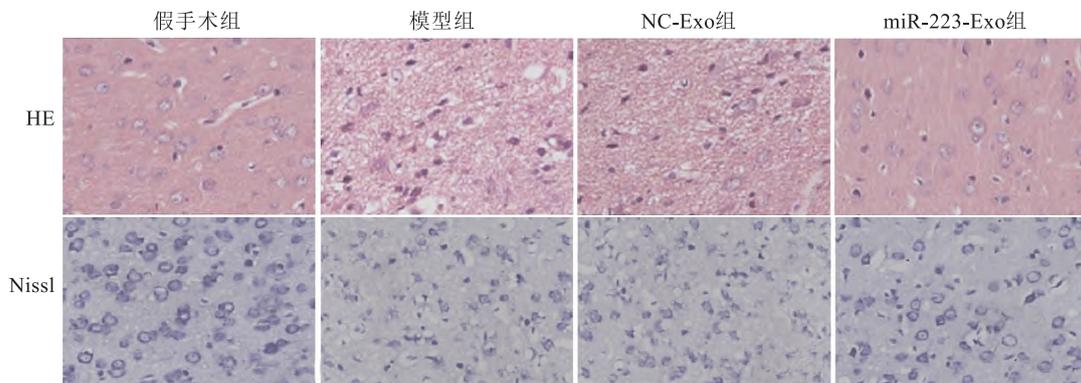


图 3 HE 染色和 Nissl 染色观察各组大鼠脑组织病理学变化 $\times 200$

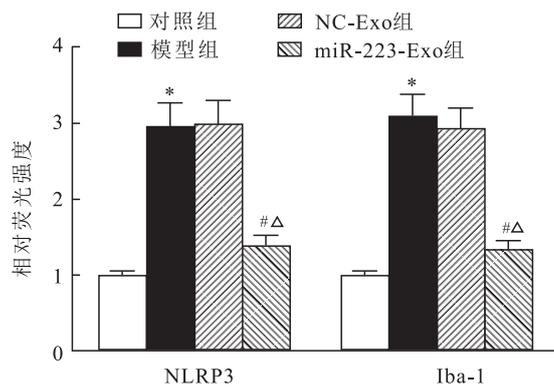
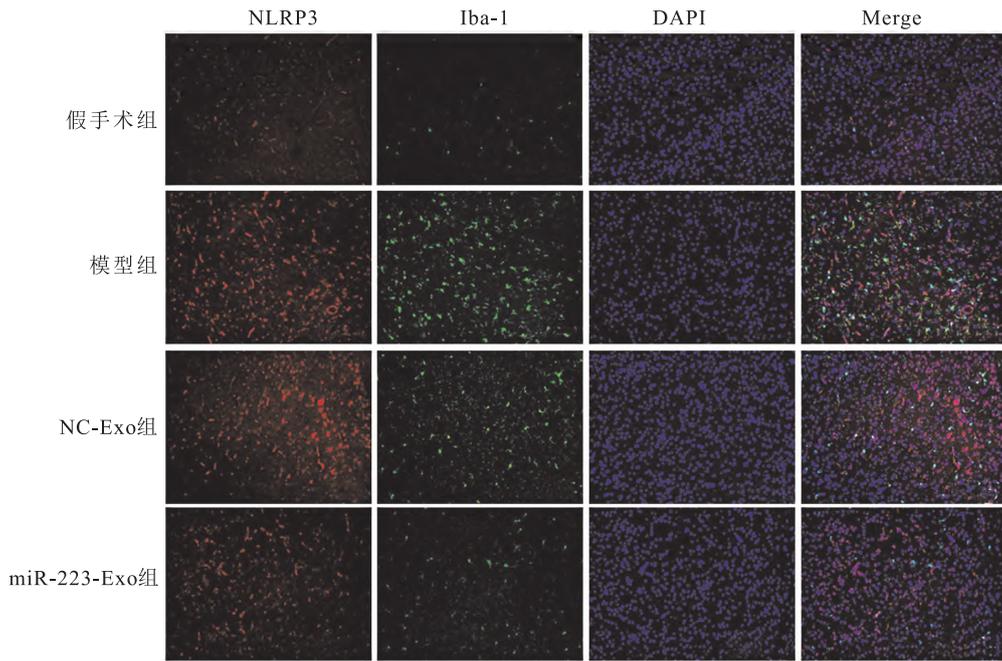


图4 免疫荧光染色观察各组大鼠脑组织 NLRP3 与 Iba-1 表达 ×100
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC-Exo 组比较: $\Delta P < 0.05$

表1 各组大鼠血清内细胞因子水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术	51.89 \pm 5.06	72.64 \pm 7.13	36.38 \pm 3.25
模型	166.21 \pm 15.78 *	259.45 \pm 26.29 *	87.07 \pm 8.64 *
NC-Exo	165.94 \pm 16.11	260.01 \pm 25.82	85.91 \pm 8.39
miR-223-Exo	90.43 \pm 8.93 ^{#Δ}	142.37 \pm 13.74 ^{#Δ}	50.59 \pm 4.96 ^{#Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC-Exo 组比较: $\Delta P < 0.05$

0.05); 与模型组比较, miR-223-Exo 组大鼠脑组织内 NLRP3 与 Iba-1 的荧光染色强度显著减少 ($P < 0.05$), NC-Exo 组内两者的染色强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.6 Exo 转运 miR-223 抑制 TBI 大鼠脑组织内 NLRP3 炎症小体途径相关蛋白表达 Western blot 测定 4 组大鼠脑组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达水平, 结果显示, 各组间 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白相对表达量差异均有统计学意义 (F

= 28.546、47.051、41.359, $P < 0.001$)。与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织内 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白相对表达量均显著上调 ($P < 0.05$); 而与模型组比较, miR-223-Exo 组大鼠脑组织内 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$), NC-Exo 组与模型组大鼠脑组织内 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

3 讨论

既往研究表明, miRNA 表达水平改变与 TBI 密切相关, 例如, 已在 TBI 大鼠脑组织中 miRNA-21-5p 表达水平增加, 上调 miRNA-21-5p 表达可以通过抑制炎症反应和减少细胞凋亡来缓解受损脑微血管内皮屏障的泄漏, 改善大鼠神经功能障碍^[10]; 在 TBI 小鼠中上调 miRNA-23a-3p 表达能够抑制皮质神经元凋亡并改善神经功能, 有效减轻 TBI 小鼠脑组织

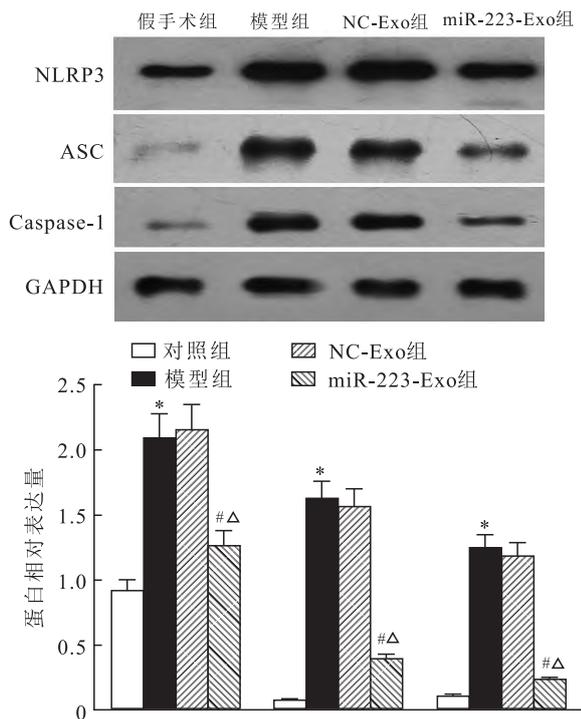


图5 Western blot 测定各组大鼠脑组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与 NC-Exo 组比较: Δ $P < 0.05$

病理损伤^[11];上调 miRNA-9-5p 表达通过激活 Hedgehog 通路和抑制 NF-κB/MMP-9 通路来缓解血脑屏障损伤和神经炎症反应,从而促进 TBI 后神经功能的恢复^[12]。目前,关于 miR-223 在各种脑损伤的研究报道也不断增多,Sha et al^[13] 研究表明电针灸治疗显著降低了缺血性脑损伤大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死面积,并揭示这一作用是通过提高梗死皮质组织中 miR-223 表达水平实现的;Huang et al^[14] 研究发现在出血后丘脑痛小鼠模型中 miR-223 表达下降,注射 miR-223 agomir 能够抑制炎症因子表达,并改善丘脑出血诱导的中枢性中风疼痛;Zhao et al^[15] 研究指出 miR-223-3p 能够通过抑制小胶质细胞激活后介导的促炎反应,从而减轻大脑中动脉闭塞再灌注大鼠脑组织损伤。以上研究结果均提示,miR-223 具有成为 TBI 诊断及治疗靶标的潜力。

Exo 具有生物相容性好、免疫原性低、稳定性高和能够穿越血脑屏障等特点,因而将其作为药物或分子递送载体在包括脑疾病在内的靶向治疗中独具优势^[16-17]。以 Exo 作为载体运转 miRNA 可以改变脑组织结构及功能,这为 TBI 的治疗提供新途径。高迎吉等^[18] 研究表明 Exo 能够通过递送 miR-124

抑制急性创伤性脊髓损伤大鼠脊髓小胶质细胞活化,减轻炎症反应,从而对大鼠起到保护作用;Long et al^[19] 研究指出星形胶质细胞来源的 Exo 能够通过运转 miR-873a-5p 抑制 NF-κB 信号通路,减弱小胶质细胞介导的神经炎症并改善了 TBI 后神经缺陷;Zhang et al^[20] 研究表明富集 miR-17-92 的 Exo 能够传递 miR-17-92 至 TBI 受损组织,从而改善运动和认知功能障碍,减少神经炎症和增强内源性血管生成,并抑制神经元丢失。本研究结果显示,经 Exo 转运 miR-223 处理的 TBI 大鼠脑组织损伤明显减轻,尼氏体数量增加且细胞形态趋于正常,这表明 Exo 转运 miR-223 能够有效改善 TBI 大鼠脑部病理损伤。

TBI 分为两个阶段,第一阶段为原发性损伤,特征是血脑屏障改变和破坏,血流量减少以及对神经元和神经胶质细胞的直接损伤。第二阶段为继发性损伤,发生在损伤后几分钟、几小时、几个月甚至几年内,神经炎症反应在该阶段起核心作用,引起细胞变性以及神经/突触传递和可塑性的改变^[21]。神经炎症反应过程较为复杂,包括小胶质细胞和外周中性粒细胞活化、淋巴细胞和巨噬细胞浸润、促炎和抗炎细胞因子释放以及免疫细胞募集,其中,小胶质细胞激活后诱导促炎细胞因子如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的产生,导致神经系统症状和神经功能障碍^[3,22]。NLRP3 是参与 TBI 中神经炎症反应的主要成分之一,TBI 发生后受伤脑皮层中 NLRP3 炎症小体复合物形成增加,其激活被认为是 TBI 后初始组织损伤扩增的主要原因^[23-24]。作为神经炎症信号通路的重要靶点,靶向抑制 NLRP3 炎症小体的形成和激活是 TBI 的前瞻性疗法。已有研究表明 miR-223 能够调控 NLRP3 的表达水平及其相关途径的激活,从而调控炎症性损伤,例如,miR-223-3p 能够抑制梅毒螺旋体诱导的血管内皮细胞中 NLRP3 炎症小体活化,这为梅毒提供潜在的治疗靶点^[25];miR-223-3p 可能通过靶向牙周炎中的 NLRP3 来调节 GSDMD 介导的神经凋亡,并抑制 NLRP3 下游炎症介质 IL-1β 和 IL-6 的分泌^[26];miR-223 通过直接结合到 NLRP3 的 3'-未翻译区域来抑制其表达,并降低慢性坐骨神经损伤小鼠脊髓中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的蛋白表达水平,增加了 M2 型巨噬细胞的比例,从而改善慢性坐骨神经损伤小鼠的神经性疼痛^[27]。本研究结果显示,经 Exo 转运 miR-223 处理的 TBI 大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低,脑组织中小胶质细胞标志物 Iba-1 与 NLRP3、ASC、

Caspase-1 蛋白表达均下降,由此说明,Exo 转运 miR-223 能够抑制小胶质细胞激活与 NLRP3 炎性小体活化,从而降低 TBI 大鼠神经炎症反应。

综上所述,Exo 转运 miR-223 能够减轻 TBI 大鼠脑部病理损伤,抑制小胶质细胞激活与炎症反应,该作用可能与抑制 NLRP3 炎性小体活化有关,本研究为 TBI 的治疗提供了新思路。但在此过程中 miR-223 调控的具体靶标或相关信号通路尚不清楚,有待后续进一步探索。

参考文献

- [1] Haarbauer-Krupa J, Pugh M J, Prager E M, et al. Epidemiology of chronic effects of traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2021, 38(23):3235–47.
- [2] 王 星, 余 万, 黄保胜. 异甘草素通过 TLR4-TBK1-IKKe 信号通路对创伤性脑损伤大鼠脑内炎症反应的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(2):277–82.
- [3] Krukowski K, Nolan A, Becker M, et al. Novel microglia-mediated mechanisms underlying synaptic loss and cognitive impairment after traumatic brain injury[J]. Brain Behav Immun, 2021, 98:122–35.
- [4] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [5] Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. Theranostics, 2020, 10(8):3684–707.
- [6] Panaro M A, Benameur T, Porro C. Extracellular vesicles miRNA cargo for microglia polarization in traumatic brain injury[J]. Biomolecules, 2020, 10(6):901.
- [7] 黄晓飞, 冯 华, 喻安永. microRNA 在创伤性脑损伤诊断及分型中的作用研究进展[J]. 中华神经外科杂志, 2021, 37(10):1074–7.
- [8] Wang B, Cao X, Lin J, et al. Up-regulation of microRNA-223 inhibits brain injury and hippocampal neuron apoptosis of rats after febrile seizure through the NLRP3-Caspase-1 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114:108683.
- [9] 杨 莉, 李 坪, 吴海鹰, 等. 创伤性脑损伤大鼠模型中与铁死亡相关的基因探索[J]. 中国急救医学, 2022, 42(2):154–8.
- [10] Ge X, Huang S, Gao H, et al. miR-21-5p alleviates leakage of injured brain microvascular endothelial barrier *in vitro* through suppressing inflammation and apoptosis[J]. Brain Res, 2016, 1650:31–40.
- [11] Li Z, Xu R, Zhu X, et al. MicroRNA-23a-3p improves traumatic brain injury through modulating the neurological apoptosis and inflammation response in mice[J]. Cell Cycle, 2020, 19(1):24–38.
- [12] Wu J, He J, Tian X, et al. microRNA-9-5p alleviates blood-brain barrier damage and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. J Neurochem, 2020, 153(6):710–26.
- [13] Sha R, Zhang B, Han X, et al. Electroacupuncture alleviates ischemic brain injury by inhibiting the miR-223/NLRP3 pathway [J]. Med Sci Monit, 2019, 25:4723–33.
- [14] Huang T, Xiao Y, Zhang Y, et al. miR-223 ameliorates thalamus hemorrhage-induced central poststroke pain *via* targeting NLRP3 in a mouse model[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(5):353.
- [15] Zhao Y, Gan Y, Xu G, et al. Exosomes from MSCs overexpressing microRNA-223-3p attenuate cerebral ischemia through inhibiting microglial M1 polarization mediated inflammation [J]. Life Sci, 2020, 260:118403.
- [16] Lai J J, Chau Z L, Chen S Y, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development [J]. AdvSci (Weinh), 2022, 9(15):e2103222.
- [17] Shao J, Zaro J, Shen Y. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: from tissue distribution to intracellular fate [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15:9355–71.
- [18] 高迎吉, 朱中蛟, 杨秀玲. 外泌体源性 microRNA-124 对急性创伤性脊髓损伤大鼠脊髓小胶质细胞活化及炎症反应的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(18):32–8.
- [19] 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.
- [20] Zhang Y, Zhang Y, Chopp M, et al. MiR-17-92 cluster-enriched exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells improve tissue and functional recovery in rats after traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2021, 38(11):1535–50.
- [21] Najem D, Rennie K, Ribecco-Lutkiewicz M, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(4):391–406.
- [22] Thapa K, Khan H, Singh T G, et al. Traumatic brain injury: mechanistic insight on pathophysiology and potential therapeutic targets [J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(9):1725–42.
- [23] 阎朝龙, 闫惠颖, 金 伟. NLRP3 炎性小体在创伤性脑损伤中的作用 [J]. 医学研究生学报, 2021, 34(4):418–23.
- [24] O'Brien W T, Pham L, Symons G F, et al. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):104.
- [25] Long F Q, Kou C X, Li K, et al. MiR-223-3p inhibits rTp17-induced inflammasome activation and pyroptosis by targeting NLRP3 [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24):14405–14.
- [26] Xia Y, Zhou K, Sun M, et al. The miR-223-3p regulates pyroptosis through NLRP3-caspase 1-GSDMD signal axis in periodontitis [J]. Inflammation, 2021, 44(6):2531–42.
- [27] Zhu J, Yang J, Xu J. miR-223 inhibits the polarization and recruitment of macrophages *via* NLRP3/IL-1 β pathway to meliorate neuropathic pain [J]. Pain Res Manag, 2021, 2021:6674028.

Role and mechanism of exosome transport of miR-223 in improving traumatic brain injury

Sun Yanchang, Xu Pengxiang, He Qinglong, Ouyang Yibin, Mo Yehe

(Dept of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311)

Abstract *Objective* To investigate the effect and mechanism of exosome (Exo) transported miR-223 on brain tissue injury and microglial activation in rats with traumatic brain injury (TBI). *Methods* The miR-NC plasmid and miR-223 mimic plasmid were transfected into HEK293 cells by liposome method, and the expression level of miR-223 in the cells was determined by quantitative real-time PCR. Exo was extracted from transfected HEK293 cells and identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blot, the expression level of miR-223 in Exo was determined by quantitative real-time PCR. Forty SD rats were randomly divided into sham group, model group, NC-Exo group and miR-223-Exo group, with 10 rats in each group, TBI model was prepared by modified Feeney free fall method in all groups except sham group, rats in NC-Exo group and miR-223-Exo group were injected with cell-derived Exo transfected with miR-NC plasmid and cell-derived Exo transfected with miR-223 mimic plasmid *via* tail vein, respectively. Two weeks later, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of brain tissue in each group, Nissl staining was used to detect the changes and distribution of Nissl bodies in each group, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), immunofluorescence double staining was used to observe the expression of nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) and ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1), Western blot was used to detect the protein expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing (ASC) and Caspase-1. *Results* After transfection, compared with control group and miR-NC group, the relative expression of miR-223 in miR-223 group significantly increased ($P < 0.05$). The isolated particles had typical Exo morphology, the peak particle size was about 120 nm, the Exo marker proteins CD9, CD63 and CD81 were significantly overexpressed, and the relative expression of miR-223 significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the damage phenomenon of brain tissue in the miR-223-Exo group was improved, the morphology and number of Nissl bodies were restored, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum decreased ($P < 0.05$), the intensity of NLRP3 and Iba-1 fluorescence staining in brain tissue decreased ($P < 0.05$), the relative protein expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 in brain tissue were down-regulated ($P < 0.05$). *Conclusion* Exo operation of miR-223 can significantly improve brain tissue injury and inhibit microglial activation in TBI rats, which may be related to the inhibition of NLRP3.

Key words traumatic brain injury; miR-223; exosome; microglia; NLRP3 inflammasome