

星形胶质细胞外泌体对癫痫大鼠小胶质细胞活化及 JAK2/STAT3 通路的影响

陈菲 陈霞 黄财城

【摘要】 目的 探讨星形胶质细胞外泌体(Astrocyte exosomes, Ast-exos)对癫痫大鼠小胶质细胞活化及 Janus 激酶 2(Janus kinase, JAK2)/信号转导与转录激活子 3(Signal transducer and activator of transcription, STAT3)通路的影响。**方法** 将雄性 SD 大鼠用随机数字表法分为正常对照组、模型组、Ast-exos 组(尾静脉注射 Ast-exos, 0.5 mg/kg)、Coumermycin A1 组(JAK2 通路激活剂, 4.0 mg/kg)、Ast-exos + Coumermycin A1 组, 每组各 10 只;腹腔注射戊四氮(35 mg/kg)建立大鼠癫痫模型, 各组给药 14 d 后观察大鼠行为, 对癫痫症状进行评分;处死大鼠, 取海马组织, 免疫组化法检测小胶质细胞活化数目;酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测海马组织炎症因子-白细胞介素(Interleukin, IL)-1 β 、IL-6 及神经递质 γ 氨基丁酸水平;尼氏及原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色观察海马组织神经元损伤及凋亡状况;免疫荧光共定位法检测 JAK2 磷酸化蛋白(Phosphorylated JAK2, p-JAK2)与活化小胶质细胞共表达数目;蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测 JAK2/STAT3 通路磷酸化蛋白 p-JAK2、磷酸化 STAT3(Phosphorylated STAT3, p-STAT3)、通路下游炎症相关蛋白 IL-1 β 、IL-6、凋亡靶蛋白-半胱氨酸天冬氨酸酶-3(Cysteyl aspartate specific protease, Caspase-3)表达水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠癫痫发作频率及发作等级评分升高, 海马神经元损伤及凋亡加重, 海马组织中炎症因子表达、小胶质细胞活化数目、p-JAK2 与活化小胶质细胞阳性共表达数目均升高, JAK2/STAT3 磷酸化活化蛋白及其介导的下游炎症及凋亡途径相关蛋白表达水平升高($P < 0.05$);Ast-exos 可改善癫痫发作症状, 缓解癫痫大鼠海马神经元损伤及凋亡, 抑制 JAK2/STAT3 磷酸化活化及其介导的下游炎症及凋亡途径激活, 降低 p-JAK2 在活化小胶质细胞中表达, 降低小胶质细胞活化数目及炎症因子表达水平($P < 0.05$);JAK2 通路激活剂-Coumermycin A1 可逆转 Ast-exos 的上述作用($P < 0.05$)。**结论** Ast-exos 可能通过抑制 JAK2/STAT3 通路活化来缓解癫痫大鼠小胶质细胞活化介导的神经炎症损伤及凋亡。

【关键词】 癫痫 星形胶质细胞外泌体 小胶质细胞活化 Janus 激酶 2/信号转导与转录激活子 3

【中图分类号】 R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)03-0267-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.03.015

The effect of astrocyte exosomes on the activation of microglia and JAK2/STAT3 pathway in epileptic rats

Chen Fei, Chen Xia, Huang Caicheng. Department of Neurology, Ningde City Hospital Affiliated to Ningde Normal University, Ningde Fujian 352100

【Abstract】 Objective To explore the effect of astrocyte exosomes (Ast-exos) on the Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in epileptic rats, and its effect on the activation of microglia. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, Ast-exos group (tail vein injection of Ast-exos, 0.5 mg/kg), Coumermycin A1 group (JAK2 pathway activator, 4.0 mg/kg), and Ast-exos + Coumermycin A1 group, with 10 rats in each group. Pentylene tetrazolol (35 mg/kg) was injected intraperitoneally to establish a rat epilepsy model, and each group was evaluated after 14 days of intervention. The behaviors of rats were observed and the symptoms of epilepsy were scored. The hippocampus tissue was taken after the rats were killed, and the number of activated microglia was measured with immunohistochemical method. The levels of inflammatory factors in hippocampus including interleukin (IL)-1 β , IL-6 and neurotransmitter γ -aminobutyric acid were estimated with ELISA method. The neuron damage and apoptosis in hippocampus were assessed with Nissl and TUNEL stainings. The expression of JAK2

phosphorylated protein (p-JAK2) in activated microglia was detected with immunofluorescence co-localization method. The expression of phosphorylated proteins in JAK2/STAT3 pathway including p-JAK2 and p-STAT2 and inflammation-related proteins such as IL-1 β , IL-6 and apoptosis target protein-cysteine aspartase 3 (Caspase-3) were detected with Western blot method. **Results** Compared with the control group, the epileptic seizure frequency and seizure grade scores of the model group increased and the hippocampal neuron damage and apoptosis were aggravated. The expression levels of inflammatory factors and the number of activated microglia with or without expression of p-JAK2 increased in hippocampus. The levels of JAK2/STAT3 phosphorylation and the downstream inflammation and apoptosis pathway-related protein expression were increased ($P < 0.05$). Ast-exos could improve the symptoms of epileptic seizures and relieve the damage and apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats, inhibit JAK2/STAT3 phosphorylation and the activation of downstream inflammation and apoptosis pathways, decrease the expression of p-JAK2 in activated microglia, and reduce the number of activated microglia and the expression of inflammatory factors ($P < 0.05$). The JAK2 pathway activator (Coumermycin A1) could reverse the above effects of Ast-exos ($P < 0.05$). **Conclusion** Ast-exos may inhibit the activation of JAK2/STAT3 pathway and alleviate the neuroinflammatory injury and apoptosis mediated by the activation of microglia in epileptic rats.

【Key words】 Epilepsy Astrocyte exosomes Microglia activation Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3

癫痫是一种常见的神经系统疾病。目前研究发现,炎症反应是导致癫痫患者神经元凋亡及兴奋性增加、癫痫再次发作易感性增强的关键因素之一^[1]。小胶质细胞是神经系统的常驻免疫细胞,类似于“巨噬细胞”,与炎症反应关系密切,并逐渐受到癫痫、帕金森病、阿尔茨海默症等神经系统疾病研究者的关注和青睐^[2]。

Janus 激酶 2 (Janus kinase, JAK2)/信号转导与转录激活子 (Signal transducer and activator of transcription, STAT3) 是介导小胶质细胞活化,参与癫痫神经炎症反应过程的主要通路之一^[3-4]。已有研究证实 JAK2/STAT3 通路活化可促进小胶质细胞向 M1 型(促炎及神经毒性反应)极化、增殖而参与癫痫神经元凋亡及损伤过程^[5],预示干预 JAK2/STAT3 通路活化,抑制小胶质细胞活化引起的神经炎症反应,可能是癫痫治疗的新思路。

外泌体是通过细胞膜内陷及细胞胞吐后形成的外囊泡小体,可透过细胞膜,携带蛋白质、脂质、核酸等生物成分在细胞间移动而发挥不同生物学功能^[6]。星形胶质细胞为神经系统中存在最多的胶质细胞,其在病理及生理条件下均可释放并分泌大量的外泌体来参与神经系统的信号传递过程^[7]。已有研究证实,星形胶质细胞外泌体 (Astrocyte exosomes, Ast-exos) 可促进体外培养的神经元存活、抑制小胶质细胞活化等来发挥神经系统保护作用^[8-9]。但体外提取 Ast-exos 能否通过干预癫痫患者小胶质细胞活化介导的神经炎症损伤来治疗癫痫还未见

报道。本研究建立大鼠癫痫模型,外源性注射给予 Ast-exos,从 JAK2/STAT3 通路方面对此进行探究验证,以期对癫痫的治疗提供新的思路。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠,雄性,清洁级,6~8 周龄,体重 200~220 g,由中国食品药品检定研究院提供,生产许可证号为 SCXK(京)2019-0017。所有大鼠于本院动物房中常规饲养,试验研究经本院动物伦理委员会批准同意,批号为 IACUC-01(20190917)。试验符合 3R 原则。

1.1.2 主要试剂及仪器 JAK2 通路激活剂-Coumermycin A1 (货号为 HY-N7452) 购自美国 MCE 公司;戊四氮 (Pentetrazol, PTZ) (货号为 P6500) 购自美国 Sigma 公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、 γ 氨基丁酸等 ELISA 试剂盒 (货号为 SEKR-0002, SBJ-R0064, IB-E11974), 分别购自北京索莱宝科技有限公司、南京森贝伽生物科技有限公司、江西艾博因生物科技有限公司;尼氏及 TUNEL 染色试剂盒 (货号为 YT8907, YT2205) 均购自北京伊塔生物科技有限公司;兔抗小胶质细胞活化标记物 (CD11b) (货号为 ab133357)、山羊抗小胶质细胞活化特异性标记物-巨噬细胞特异性蛋白抗体 Iba1 (Ionized calcium binding adapter molecule1, IBA1) (货号为 107159)、兔抗 JAK2 (货号为 ab108597)、JAK2 磷

酸化蛋白(p-JAK2)(货号为 ab219728)、STAT3(货号为 ab68153)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)(货号为 ab76315)、IL-1 β (货号为 ab254360)、IL-6(货号为 ab259341)、半胱氨酸天冬氨酸酶-3(Caspase-3)(货号为 ab184787)等抗体均购自美国 abcam 公司; CX43 光学显微镜购自德国奥林巴斯; EVOS FLoid 免疫荧光共聚焦显微镜购自美国赛默飞。

1.2 方法

1.2.1 大鼠癫痫模型建立及分组给药 参照李卫泊等^[10]使用方法建立大鼠癫痫模型:大鼠经腹腔注射戊四氮(PTZ),35 mg/kg,1 次/d,连续 4 周,建立癫痫模型;若大鼠在注射 PTZ 期间出现连续 3 次 IV 级以上的痫性发作,视为造模成功。共造模成功 50 只大鼠,随机分为模型组、Ast-exos 组、Coumermycin A1 组(JAK2 通路激活剂)、Ast-exos + Coumermycin A1 组,每组各 10 只。另取 10 只大鼠腹腔注射等量生理盐水,作为正常对照组。

Ast-exos 组参考文献^[13]方法提取 Ast-exos,并鉴定出其呈杯口状形态、粒径平均值为 113.9 nm,表面包含外泌体经典标记物溶酶体膜蛋白(Cluster of differentiation 63,CD63)和凋亡连接基因-2-相互作用蛋白 X(Apoptosis-linked gene-2-interacting protein X,ALIX)后经尾静脉注射 0.5 mg/kg 的 Ast-exos,1 次/d,进行干预治疗。Coumermycin A1 组参考文献^[13]经尾静脉按 4.0 mg/kg 的剂量注射 JAK2 通路激活剂-Coumermycin A1,1 次/d;Ast-exos + Coumermycin A1 组给予 Ast-exos 的同时给予 Coumermycin A1;模型组、正常对照组尾静脉注射给予等量生理盐水。各组连续给药 14 d[给药期间继续腹腔注射给予 35 mg/kg 的戊四氮(Pentylenetetrazol,PTZ),每周 1 次]后观察大鼠症状,并进行后续试验。

1.2.2 大鼠行为学观察及癫痫 Racine 等级评分 各组大鼠于给药期间观察大鼠行为 30 min,参考文献^[10]采用 Racine 等级法观察大鼠癫痫发作频率,评价癫痫发作等级并进行评分。

1.2.3 大鼠海马组织尼氏及 TUNEL 染色 麻醉处死大鼠,取全脑组织,冰上剥离完整海马组织,分成两部分,一部分置于 -80 °C 冰箱保存备用;一部分迅速置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,常规处理后进行浸蜡包埋,并切成 5 μ m 切片,取部分切片,脱蜡水化后按尼氏及 TUNEL 染色试剂盒说明书方法进行染色,置于光学显微镜下观察拍照。TUNEL 染色切片按 ImagePro plus 5.0 图像分析系

统检测阳性染色细胞比例。

1.2.4 免疫组化法检测海马组织小胶质细胞活化数目 取海马组织石蜡切片,脱蜡及抗原修复后加入 CD11B(1:200)一抗抗体,4 °C 孵育过夜后加入兔抗辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)二抗(1:200),室温孵育 2 h,二氨基联苯胺显色、苏木精复染后于显微镜下观察拍照,用 ImagePro plus 6.0 图像分析软件半定量检测单位面积内阳性染色细胞数目。

1.2.5 免疫荧光共定位法检测 p-JAK2 与小胶质细胞(IBA1)阳性共表达数目 取海马组织石蜡切片,脱蜡、抗原修复、曲拉通透化后加入一抗(山羊抗 IBA1、兔抗 p-JAK2,1:200)4 °C 孵育过夜,加入二抗驴抗山羊 IgG(红)、羊抗兔-异硫氰酸酯(Fluoresceine isothiocyanate,FITC)(绿),1:200,37 °C 避光孵育 2.5 h,4,6-联脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, DAPI)核染后用荧光共聚焦显微镜观察拍照,通过 Image Pro Plus 6.0 系统分析单位面积内阳性共表达染色细胞数目。

1.2.6 ELISA 法检测海马组织炎症因子 IL-1 β , IL-6 及神经递质 γ 氨基丁酸水平 取 -80 °C 冰箱保存的海马组织,4 °C 解冻后冰上研磨并提取组织匀浆液,按 ELISA 试剂盒说明书方法检测 IL-1 β , IL-6 及 γ 氨基丁酸水平。

1.2.7 Western blot 法测海马组织中 JAK2, p-JAK2, STAT2, p-STAT2, IL-1 β , IL-6, Caspase-3 蛋白相对表达水平 取 -80 °C 冰箱保存的海马组织,4 °C 解冻后加入裂解液冰上研磨后取匀浆液,抽提蛋白,聚氰基丙烯酸正丁酯(Bicinchoninic acid, BCA)法测蛋白水平后取 100 μ g 蛋白行凝胶电泳及半干转膜反应,孵育盒中加入一抗抗体 JAK2, p-JAK2, STAT2, p-STAT2, IL-1 β , IL-6, Caspase-3(1:1 000),内参 β -actin 抗体(1:2 000),4 °C 孵育过夜及含吐温的 Tris 缓冲液(Tris buffered saline with tween, TBST)漂洗后加入 1:1 000 的羊抗兔 HRP 二抗室温孵育 2 h,用增强化学发光法显色,用化学发光仪观察条带并拍照,以 Image-J 软件分析蛋白相对表达水平。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS22.0 及 GraphPad Prism 8 软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步 2 组比较行 *snk-q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ast-exos 对大鼠行为学及 Racine 等级评分的影响

正常对照组大鼠行为正常,未见癫痫发作;与正常对照组比较,模型组大鼠出现频繁点头、两前肢痉挛直立等癫痫症状,癫痫发作在Ⅳ-Ⅴ级以上,且发作次数频繁,发作频率及 Racine 等级评分升高($P<0.05$);与模型组比较,Ast-exos 组大鼠出现单侧肢抽搐现象,只有极少数大鼠癫痫发作在Ⅳ-Ⅴ等级以上,发作频率及 Racine 等级评分降低($P<0.05$);Coumermycin A1 组大鼠癫痫发作频率及发作等级评分进一步升高($P<0.05$);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反($P<0.05$)(表 1)。

表 1 大鼠 Racine 等级评分比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	评分(分)	发作频率(次/d)
正常对照组	10	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	10	47.09±2.02◆	13.09±1.14◆
Ast-exos 组	10	20.28±1.98●	6.03±0.64●
Coumermycin A1 组	10	70.05±3.28●	19.02±1.38●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	46.75±2.49*	13.14±1.05*

注:与正常对照组比较,◆ $P<0.05$;与模型组比较,● $P<0.05$;与 Ast-exos 组比较比,* $P<0.05$

2.2 Ast-exos 对大鼠海马神经元损伤与凋亡的影响

尼氏染色可见正常对照组大鼠海马组织神经元排列整齐、染色均匀,结构正常;模型组大鼠海马组织神经元排列紊乱,肿胀、胞体固缩且核染加深,神经元坏死及丢失严重。TUNEL 染色可见正常对照组大鼠染色均匀,且仅有少量凋亡细胞被染成红棕色;模型组大鼠海马组织可见大量被染成红棕色的凋亡细胞。与模型组比较,Ast-exos 组大鼠海马神经元数量有所增加,排列稍整齐,神经元丢失及坏死减少,红棕色染色变浅,凋亡率降低($P<0.05$);Coumermycin A1 组大鼠海马神经元丢失坏死进一步加重,红棕色染色加深,凋亡率进一步升高($P<0.05$);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反($P<0.05$)(图 1、表 2)。

2.3 Ast-exos 对大鼠海马组织小胶质细胞活化数目的影响

CD11B 阳性染色数目可代表活化小胶质细胞数目。免疫组化显示,正常对照组大鼠海马组织 CD11B 呈弱阳性,几乎未见到小胶质细胞活化;与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 CD11B 呈强

阳性染色,小胶质细胞活化数目增多($P<0.05$);与模型组比较,Ast-exos 组大鼠小胶质细胞活化数目减少($P<0.05$);Coumermycin A1 组大鼠小胶质细胞活化数目进一步增多($P<0.05$);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反($P<0.05$)(图 2、表 3)。

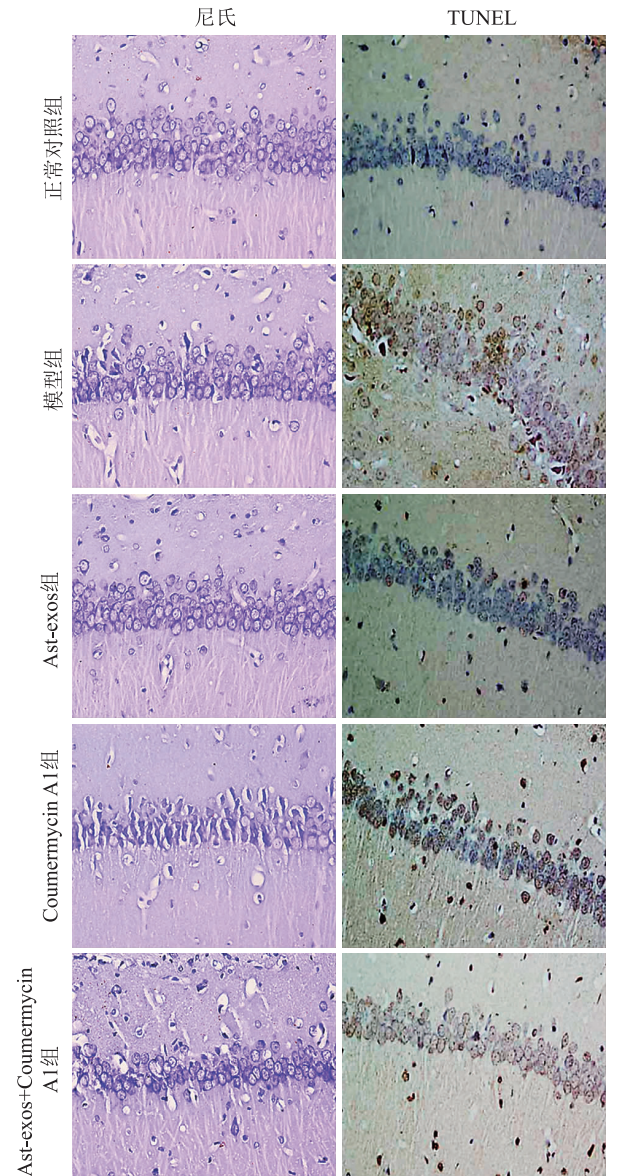


图 1 大鼠海马组织尼氏及 TUNEL 染色(×400 倍)

表 2 大鼠海马神经元凋亡率比较($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	<i>n</i>	凋亡率
正常对照组	10	1.05±0.02
模型组	10	23.47±2.08◆
Ast-exos 组	10	10.35±1.07●
Coumermycin A1 组	10	39.48±3.23●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	22.25±2.13*

注:与正常对照组比较,◆ $P<0.05$;与模型组比较,● $P<0.05$;与 Ast-exos 组比较,* $P<0.05$

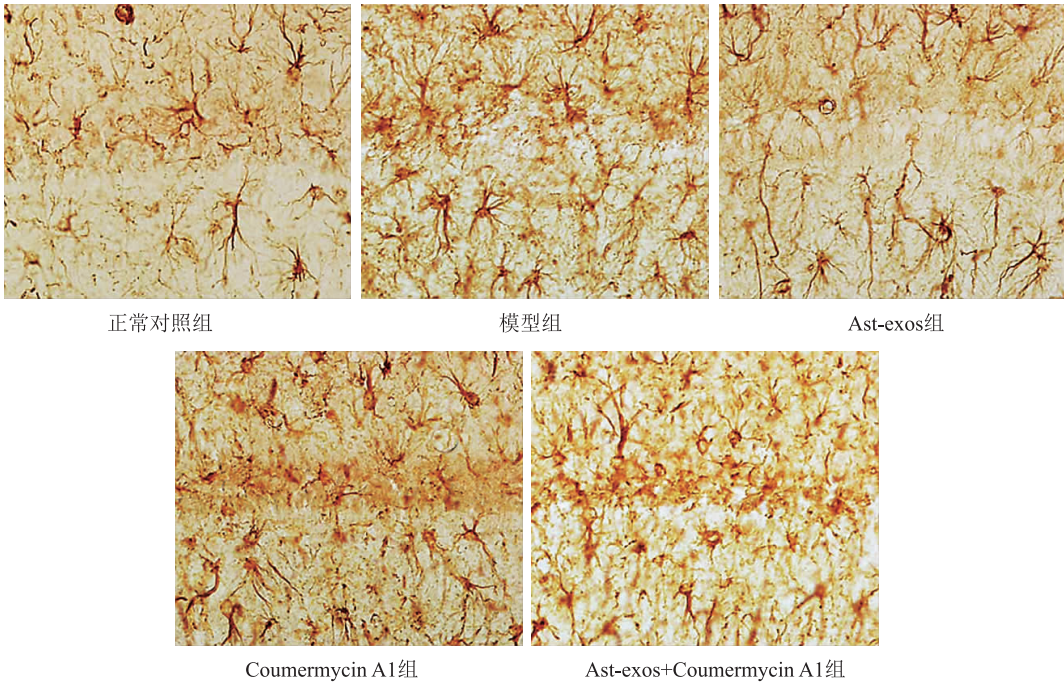


图 2 海马组织 CD11B 免疫组化染色(×400 倍)

表 3 大鼠海马组织活化小胶质数目比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	活化数目(CD11B ⁺ 数目) (个/mm ²)
正常对照组	10	9.08 ± 0.90
模型组	10	33.47 ± 3.27◆
Ast-exos 组	10	21.26 ± 2.18●
Coumermycin A1 组	10	49.74 ± 4.28●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	32.36 ± 3.25*

注:与正常对照组比较,◆*P*<0.05;与模型组比较,●*P*<0.05;与 Ast-exos 组比较,**P*<0.05

2.4 Ast-exos 对大鼠海马组织中 IL-1β、IL-6、γ 氨基丁酸水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织中 IL-1β、IL-6 水平升高(*P*<0.05),γ 氨基丁酸水平降低(*P*<0.05);与模型组比较,Ast-exos 组大鼠海马组织中 IL-1β、IL-6 水平降低(*P*<0.05),γ 氨基丁酸水平升高(*P*<0.05);Coumermycin A1 组大鼠海马组织中 IL-1β、IL-6 水平进一步升高(*P*<0.05),γ 氨基丁酸水平进一步降低(*P*<0.05);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反(*P*<0.05)(表 4)。

2.5 Ast-exos 对大鼠海马组织中 p-JAK2、IBA1 阳性共表达水平的影响

免疫荧光染色显示,p-JAK2 可阳性表达于 IBA1 阳性标记的小胶质细胞胞浆中。与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 p-JAK2⁺ IBA1⁺ 表达

水平升高(*P*<0.05);与模型组比较,Ast-exos 组大鼠海马组织中 p-JAK2⁺ IBA1⁺ 表达水平降低(*P*<0.05);Coumermycin A1 组大鼠海马组织中 p-JAK2⁺ IBA1⁺ 表达水平进一步升高(*P*<0.05);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反(*P*<0.05)(图 3、表 5)。

表 4 大鼠海马组织中 IL-1β、IL-6 及 γ 氨基丁酸水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	γ 氨基丁酸 (ng/mg)
正常对照组	10	3.23 ± 0.39	23.51 ± 2.08	13.98 ± 0.99
模型组	10	5.48 ± 0.52◆	45.37 ± 4.04◆	6.07 ± 0.63◆
Ast-exos 组	10	3.92 ± 0.31●	30.64 ± 3.27●	8.85 ± 0.82●
Coumermycin A1 组	10	6.79 ± 0.67●	69.84 ± 6.56●	4.05 ± 0.42●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	5.46 ± 0.59*	22.95 ± 2.24*	6.13 ± 0.58*

注:与正常对照组比较,◆*P*<0.05;与模型组比较,●*P*<0.05;与 Ast-exos 组比较,**P*<0.05

表 5 大鼠海马组织 p-JAK2⁺ IBA1⁺ 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	p-JAK2 ⁺ IBA1 ⁺ (个/mm ²)
正常对照组	10	1.09 ± 0.05
模型组	10	19.09 ± 1.28◆
Ast-exos 组	10	9.52 ± 0.99●
Coumermycin A1 组	10	28.69 ± 0.93●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	18.34 ± 1.21*

注:与正常对照组比较,◆*P*<0.05;与模型组比较,●*P*<0.05;与 Ast-exos 组比较,**P*<0.05

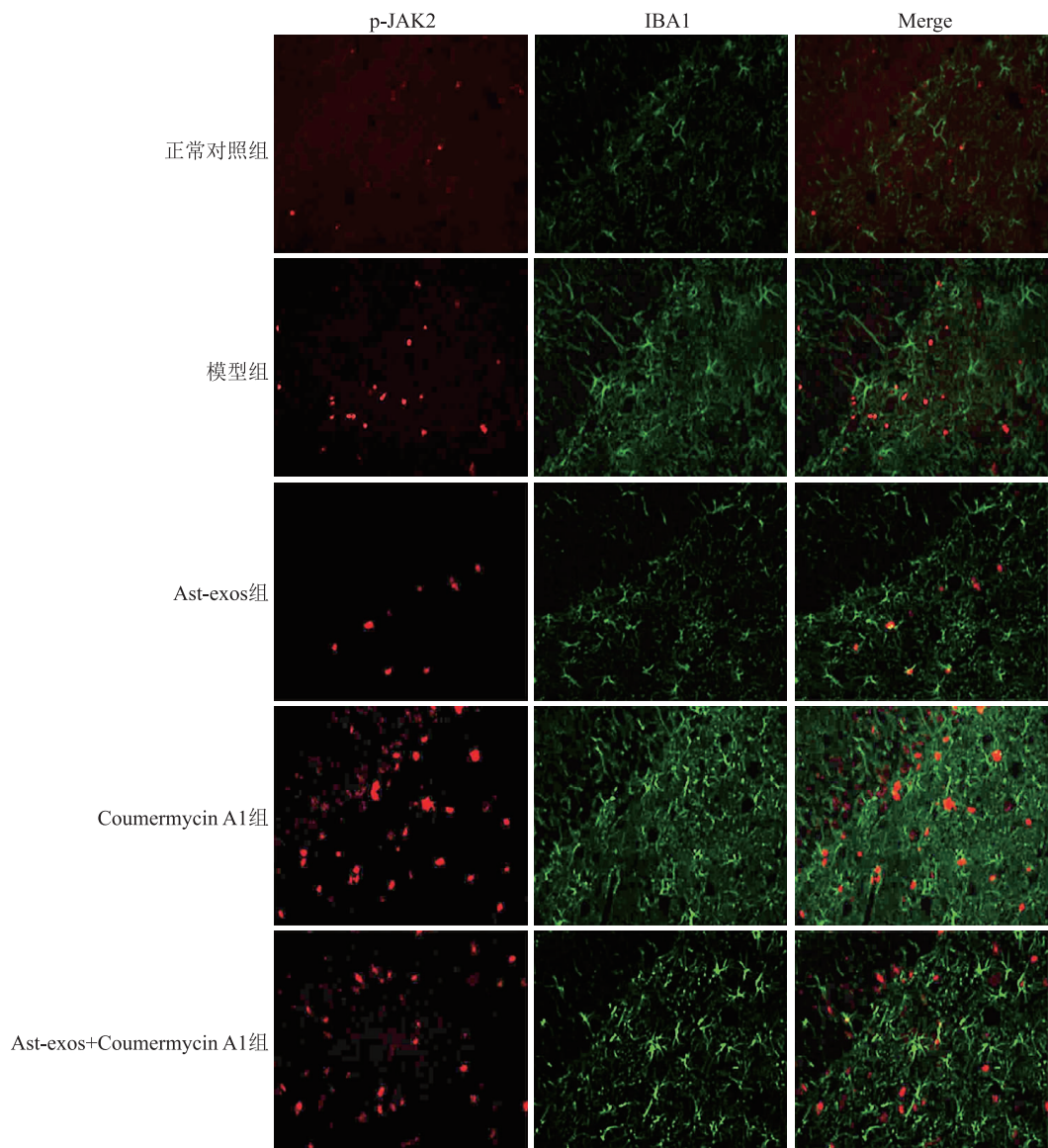


图3 大鼠海马组织 p-JAK2 及 IBA1 免疫荧光共定位染色(×200 倍)

2.6 Ast-exos 对大鼠海马组织中 JAK2,p-JAK2, STAT2,p-STAT2,IL-1β,IL-6,Caspase-3 蛋白相对表达水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织中 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, IL-1β, IL-6, Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组比较, Ast-exos 组大鼠海马组织中 p-JAK2/

JAK2,p-STAT3/STAT3,IL-1β,IL-6,Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$);Coumermycin A1 组大鼠海马组织中 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3,IL-1β,IL-6,Caspase-3 蛋白表达水平进一步升高($P<0.05$);Ast-exos + Coumermycin A1 组上述指标水平变化与 Ast-exos 组相反($P<0.05$) (图 4、表 6)。

表6 各组大鼠海马组织 p-JAK2/JAK2,p-STAT3/STAT3,IL-1β,IL-6,Caspase-3 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	IL-1β/β-actin	IL-6/β-actin	Caspase-3/β-actin
正常对照组	10	1.03±0.15	1.01±0.12	1.09±0.10	1.04±0.13	1.01±0.09
模型组	10	1.64±0.16◆	1.99±0.13◆	1.76±0.13◆	1.95±0.19◆	1.84±0.18◆
Ast-exos 组	10	1.33±0.12●	1.66±0.15●	1.43±0.13●	1.58±0.15●	1.45±0.13●
Coumermycin A1 组	10	2.53±0.23●	2.86±0.2●	2.43±0.24●	2.86±0.22●	2.51±0.22●
Ast-exos + Coumermycin A1 组	10	1.63±0.16*	1.97±0.19*	1.72±0.17*	1.85±0.18*	1.81±0.18*

注:与正常对照组比较,◆ $P<0.05$;与模型组比较,● $P<0.05$;与 Ast-exos 组比较,* $P<0.05$

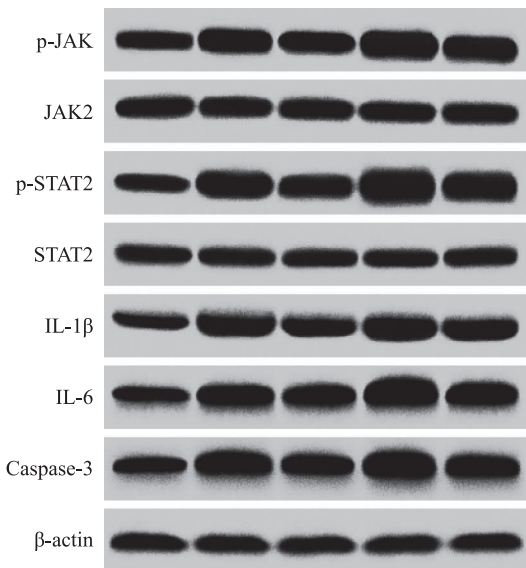


图 4 大鼠海马组织 JAK2, p-JAK2, STAT2, p-STAT2, IL-1 β , IL-6, Caspase-3 蛋白表达水平免疫印迹 A 为正常对照组; B 为模型组; C 为 Asth-exos 组; D 为 Coumermycin A1 组; E 为 Asth-exos + Coumermycin A1 组

3 讨论

癫痫发病率较高、发病机制复杂、治疗相对棘手。大鼠经腹腔注射戊四氮制备癫痫模型是模拟人类癫痫模型的理想方法^[10]。本研究用上述方法建立大鼠癫痫模型后发现大鼠出现跌倒、前肢痉挛及直立等类似人类癫痫症状,癫痫发作 Racine 评分在 IV 级以上,提示造模成功。另外,大量研究证实小胶质细胞活化释放的大量炎性介质如 IL-1 β , IL-6 等是导致癫痫发作及神经元凋亡损伤的关键机制^[11-12]。Gao 等^[13]发现在癫痫病灶区域内还未观察到神经元明显损伤时就已发现有小胶质细胞处于激活状态;Sun 等^[14]发现小胶质细胞活化后释放的高水平 IL-1 β 在加剧神经元毒性损伤的同时还会抑制 γ 氨基丁酸介导的神经传导而促进癫痫发作。本研究发现,模型组大鼠海马神经元肿胀、变性及凋亡加重的同时活化小胶质细胞数目也明显增多,且海马组织中 IL-1 β , IL-6 炎性因子水平明显升高, γ 氨基丁酸水平明显降低,进一步表明造模成功。Asth-exos 可促进神经元存活,并抑制小胶质细胞活化介导的炎性反应^[15]。Pascua-Maestro 等^[16]发现 Asth-exos 可将神经保护蛋白-载脂蛋白(Apolipoprotein, APOD)运送到神经元而促进神经元存活;Saglam 等^[17]发现 Asth-exos 可介导晶状体蛋白- α B(Crystallin-alpha B, CRYAB)分泌,抑制小胶质细胞活化,

缓解神经炎性反应,预示 Asth-exos 可能为缓解癫痫大鼠小胶质细胞活化介导的神经炎性损伤及凋亡的潜在物质。本研究发现,外源性注射 Asth-exos 后大鼠海马神经元损伤及凋亡缓解,海马组织活化小胶质细胞数目、炎症因子 IL-1 β , IL-6 分泌也均明显减少,大鼠癫痫发作症状减轻,证实外源性注射 Asth-exos 可能为治疗癫痫的潜在策略。

JAK2/STAT3 通路为介导小胶质细胞活化及神经炎性反应发生的关键通路之一。刘剑锋等^[5]发现, JAK2/STAT3 通路活化参与体外诱导的小胶质细胞活化及炎症因子释放过程;Shati 等^[18]发现,多种细胞因子及生长因子均可刺激 JAK2 磷酸化活化,活化的 JAK2 可诱导 STAT3 磷酸化并发生核转移而促进细胞因子如 IL-1 β , IL-6 及凋亡靶点 Caspase-3 表达来进一步促进炎症反应并加剧细胞损伤;潘德锋等^[4]发现抑制 JAK2/STAT3 通路活化可减少癫痫大鼠小胶质细胞活化及神经炎性损伤,减轻大鼠癫痫发作。本研究发现, p-JAK2 与活化小胶质细胞共表达数目增加,用 JAK2 激活剂 Coumermycin A1 进一步促进 p-JAK2 在小胶质细胞中表达后大鼠海马组织中 p-STAT3 及下游炎症因子-IL-1 β , IL-6、凋亡靶点 Caspase-3 蛋白表达水平均进一步升高,大鼠海马神经元损伤凋亡及癫痫症状进一步加重,这与潘德锋等^[4]研究机制相一致,证实 JAK2/STAT3 通路活化可能参与癫痫大鼠小胶质细胞活化、神经元炎性损伤及凋亡过程。Asth-exos 可携带核酸如 mRNA 成分而参与脑肿瘤、帕金森病等神经系统疾病的神经元损伤及修复过程^[19]。Xu 等^[20]研究发现 Asth-exos 中含 miR-216a-5p,促进脑损伤后神经元恢复;Zhang 等^[21]用双荧光素酶验证试验证实, miR-216a-5p 与 JAK2 之间有靶向结合位点,且 miR-216a-5p 表达水平降低,可能与 JAK2/STAT3 通路活化及炎症因子表达水平升高有关。预示 Asth-exos 缓解癫痫大鼠神经炎性反应可能与间接或直接调控 JAK2/STAT3 通路活化有关。本研究发现, Asth-exos 组大鼠 JAK2/STAT3 通路及炎症、凋亡途径均处于抑制状态,给予大鼠 Asth-exos 的同时外源性注射 JAK2 激活剂可逆转 Asth-exos 抑制 JAK2/STAT3 通路活化及缓解癫痫发作的作用,证实 Asth-exos 可能通过抑制 JAK2/STAT3 通路活化来缓解癫痫大鼠小胶质细胞活化介导的神经炎性损伤及凋亡。

(下转第 280 页)