

OPN通过VEGF途径增强脑卒中后的神经可塑性

廖海康^{1,2,3} 刘维钦⁴ 邹珍友¹ 姚华^{1,3*}

(¹桂林医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 桂林 541004; ²温州医科大学老年研究院浙江省阿尔茨海默病研究重点实验室, 温州 325035; ³温州大学神经与化学研究所, 温州 325035; ⁴赣州市人民医院神经外科, 赣州 341000)

摘要 该研究旨在探讨骨桥蛋白(osteopontin, OPN)对缺血性脑卒中亚急性期的神经可塑性作用。制备小鼠光化学栓塞模型, 在卒中后2、7、14、21、28天采用Western blot测定小鼠大脑皮层梗死周区组织中突触素(synaptophysin, SYN)的蛋白表达水平。卒中后第7天, 通过脑立体定位仪局部给予人重组骨桥蛋白(recombinant osteopontin, rOPN)。运用囊泡谷氨酸转运体1(vesicular glutamate transporter 1, Vglut1)、突触后致密蛋白95(post-synaptic density protein 95, PSD 95)免疫荧光染色, 观察骨桥蛋白治疗后梗死周区皮层共存突触的数量。采用胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、离子化钙结合适配蛋白分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1)、血小板内皮黏附分子31(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)染色评估骨桥蛋白对胶质增生及血管密度的作用。此外, 通过转录组测序分析OPN调控神经可塑性的潜在机制。以上结果提示, 与假手术组相比, 卒中后第7天梗死周区的突触素蛋白表达水平显著上调, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。与生理盐水组相比, OPN显著增强梗死周区皮层神经可塑性, 促进血管生成和胶质细胞增生($P<0.01$)。转录组测序结果提示, OPN诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA表达。Western blot结果进一步证实OPN显著上调梗死周区VEGF蛋白的表达($P<0.01$)。总之, 结果表明, 卒中亚急性期, OPN可能通过VEGF激活梗死周区的突触相关蛋白, 调节神经可塑性, 促进血管生成和胶质细胞增生, 继而起到神经修复作用。因此, OPN可能作为一种促进脑卒中后神经修复的治疗性蛋白。

关键词 缺血性脑卒中; 骨桥蛋白; 血管内皮生长因子; 神经可塑性; 神经修复

OPN Enhances Neuroplasticity after Stroke via VEGF Pathway

LIAO Haikang^{1,2,3}, LIU Weiqin⁴, ZOU Zhenyou¹, YAO Hua^{1,3*}

(¹Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical College, Guilin 541004, China; ²Key Laboratory of Alzheimer's Disease of Zhejiang Province, Institute of Aging, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ³Institute of Neurology and Chemistry, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; ⁴Department of Neurosurgery, Ganzhou City People's Hospital, Ganzhou 341000, China)

收稿日期: 2022-05-20

接受日期: 2022-07-05

广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(批准号: 2021KY0491)、桂林市创新平台和人才计划(批准号: 20210218-6)、广西自然科学基金面上项目(批准号: 2021JJA141110)、国家自然科学基金地区项目(批准号: 82060268)、广西脑与认知神经科学重点实验室自主课题项目(批准号: GKLBCN-20200106)和广西脑与认知神经科学重点实验室开放课题(批准号: GKLBCN-20200108-01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15058303756, E-mail: hua.yao@glmc.edu.cn

Received: May 20, 2022

Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the Fundamental Research Ability Improvement Project for Young and Middle-Aged Teachers in Guangxi Universities (Grant No.2021KY0491), Guilin Innovation Platform and Talent Program (Grant No.20210218-6), General Project of Guangxi Natural Science Foundation (Grant No.2021JJA141110), the National Natural Science of China Funded Regional Project (Grant No.82060268), Autonomous Project of Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience (Grant No.GKLBCN-20200106), and the Open Project of Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience (Grant No.GKLBCN-20200108-01)

*Corresponding author. Tel: +86-15058303756, E-mail: hua.yao@glmc.edu.cn

Abstract This study aimed to investigate the effect of OPN (osteopontin) on neuroplasticity in the sub-acute phase of ischemic stroke. A mice model of photochemical embolization was induced, and Western blot was performed to determine the synaptophysin expression at protein levels in the peri-infarct cortex after 2, 7, 14, 21, and 28 days of stroke. The human rOPN (recombinant osteopontin) was locally delivered by stereotactic apparatus after 7 days of stroke. The Vglut 1 (vesicular glutamate transporter 1) and PSD 95 (post synaptic density protein 95) were detected by immunofluorescence staining, to observe the number of colocalized synapses in the peri-infarct cortex after OPN treatment. To evaluate the OPN impact on astrogliosis and vascular density, this article stained the GFAP (glial fibrillary acidic protein), IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), and CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) by the immunofluorescence technique. In addition, the underlying mechanism of regulating neural plasticity by OPN was analyzed through the RNA-seq studies. This article indicated that the expression level of synaptophysin in the penumbra was significantly upregulated on the 7th day after stroke, compared with the sham group ($P<0.01$). Compared with the stroke+saline group, OPN significantly improved neuroplasticity, angiogenesis and astrogliosis in the peri-infarct cortex ($P<0.01$). Sequencing data revealed that OPN induced the mRNA level of *VEGF* (vascular endothelial growth factor). Moreover, Western blot confirmed that OPN could significantly upregulate the protein levels of VEGF in the peri-infarct area ($P<0.01$). In conclusion, this article proved that OPN might induce VEGF expression and play a neural repair role by activating synapse-related proteins, regulating neuroplasticity, increasing angiogenesis and gliosis in the subacute phase of stroke. Therefore, it suggests that OPN may serve as a therapeutic protein to promote neural repair after stroke.

Keywords ischemic stroke; osteopontin; vascular endothelial growth factor; neuroplasticity; neural repair

缺血性脑卒中仍然是成年人致死、致残的主要原因,严重影响社会经济的发展^[1]。目前,大量研究主要集中于卒中急性期的神经保护作用。然而,亚急性期促进神经功能修复的机制知之甚少。近年,随着对脑卒中后大脑内源性修复机制的研究不断深入,越来越多的证据表明,神经可塑性、轴突出芽是脑损伤后神经功能恢复的基础^[2-4]。因此,揭示缺血性脑卒中后神经可塑性的机制及其影响因素,发现新的积极有效的干预手段,应用于促进脑卒中后神经环路修复和神经功能恢复,对缺血性脑卒中的治疗和康复具有重大意义。

早期研究发现细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可以调节神经可塑性,如新轴突的萌芽、新突触的形成和受损伤的神经连接重建^[5]。整合素(integrin, ITG)是细胞表面受体,通过与ECM分子相互作用,在损伤神经系统后促进轴突再生^[6]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)作为一种多功能、可诱导的细胞外基质糖蛋白,在脑损伤后的急性期具有神经保护、免疫调节和抗凋亡的作用^[7]。前期研究发现,在卒中亚急性期,与非出芽神经元的转录组表达水平相比,OPN在出芽神经元中的表达水平提高了12倍^[8]。此外,在中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后,

OPN通过一系列生长因子,例如胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF),积极介导视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、下行脊髓前体神经元和皮质脊髓神经元的轴突再生和突触形成^[9-11]。总之,这些结果提示OPN可能在卒中亚急性期,通过诱导生长因子升高的分子信号级联参与缺血损伤脑组织的神经修复。然而,目前为止,尚不完全清楚OPN在卒中亚急性期介导梗死周区皮质神经元可塑性的具体分子机制。因此,本文拟通过免疫荧光染色、蛋白免疫印迹、转录组测序等实验方法,探讨脑卒中后骨桥蛋白的神经修复作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

54只SPF级C57BL/6雄性小鼠,周龄10周,体重为25~30 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(沪)2013-0016。其中18只小鼠用于卒中后不同时间段的可塑性变化分析,可分为假手术组(sham, $n=3$),卒中2、7、14、21、28天($n=3$)。另外,36只小鼠用于评估骨桥蛋白对卒中后突触形态及分子机制研究。假手术组只注射玫瑰

红光敏试剂而不给予光照。所有程序均按照国家卫生研究院关于实验动物护理/使用的指南进行,以期最大程度地减少实验动物痛苦,并经桂林医学院实验动物伦理委员会批准(批准号: GLMC202203165)。所有小鼠饲养于(22±2) °C和(65±5)%相对湿度条件下,并且保证小鼠能自由接触淡水和食物。此外,动物房具有12 h循环光照系统。

1.2 光化学法建立局部缺血性脑卒中模型

使用异氟醚(浓度为1.5%~3.5%,即70% C₄H₉F₂₉O₄、30% O₂)将小鼠进行麻醉,并将其放置在脑立体定位仪手术框架(瑞沃德生命科技有限公司)中。沿颅中线切开皮肤,露出头骨。去除表面结缔组织,使前囟清晰。再将冷光源(CL6000LED, Carl Zeiss MicroImaging, GER)连接到40×物镜上,位于前囟右侧1.5 mm处。腹腔注射Rose Bengal(0.2 mL, 15 mg/mL, G8540, 北京索莱宝科技有限公司)。5 min后,打开冷光源照射颅骨19 min,在大脑皮层区域形成直径约2 mm的梗死灶。手术后,沿着头皮缝合小鼠并使其恢复自由活动及进食。手术过程中使用加热垫使小鼠体温保持在(36.9±0.4) °C。假手术组小鼠不给予光照,其他条件与实验组相同。

1.3 OPN给药

36只C57BL/6雄性小鼠被随机分配到以下组之一:假手术组、生理盐水组、rOPN(recombinant osteopontin)组(0.3 g、0.1 μg/μL, 人源rOPN, 上海吉玛制药技术有限公司)。卒中后第7天,将小鼠固定在立体定位仪上,再使用异氟醚气体将其连续麻醉,并使用微颅钻(瑞沃德)在前囟外1.5 mm钻孔。在梗死域的位置(A/P, 0.0 mm; M/L, 1.5 mm; D/V, 1.0 mm), rOPN组使用10 μL注射器(Hamilton, US)注射3 μL rOPN(1 μL/min)。生理盐水组小鼠按同样操作步骤给予无菌盐水。给药完成后保持在注射位置5 min。最后,将针轻轻地从小鼠大脑中抽出,缝合伤口并允许小鼠在37 °C的恒温加热垫下恢复到能够自行活动、进行摄食和饮水即可。手术过程中使用加热垫将体温保持在(36.9±0.4) °C。

1.4 免疫荧光染色

rOPN递送24 h后对小鼠进行深度麻醉。使用生理盐水30 mL灌注5 min,直至肺和肝呈灰白色。然后取出全脑,将脑组织置于多聚甲醛中4 °C固定48 h。将其取出后,再使用PBS洗涤3次并于30%蔗糖缓冲液中静置72 h,包埋在水晶OCT(SKURA, US)中,并进行

冰冻冠状切片(CryoStar NX50, Thermo Fisher Scientific, US)(40 μm)实验。取脑组织冠状切片,PBS洗3次,每次5 min。在此期间,将切片在摇床上轻轻摇动(后续洗涤方法相同)。加入封闭缓冲液(0.1 mol/L PBS+0.05% Triton X-100+5% BSA)并在室温下密封60 min。然后,使用兔抗Vglut 1(1:800, ab227805, Abcam, UK)、大鼠抗CD31(1:400, ab28364, Abcam, UK)、兔抗GFAP(1:400, bs-0199R, 北京博奥森生物技术有限公司)、羊抗IBA1(1:800, NB100-1028SS, Novus, US)、小鼠抗PSD 95(post-synaptic density protein 95)(1:800, MAB1596, Millipore, US)作为一抗,4 °C过夜。取出后,用PBST冲洗脑切片,加入驴抗小鼠IgG Alexa Fluor 488(1:500, A21202, Invitrogen, US)、驴抗兔IgG/Cy3(1:500, bs-0295d-Cy3, 博奥森)、驴抗羊IgG/CY3(1:500, bs-0294d-Cy3, 博奥森)二抗,避光室温下孵育60 min。最后,用PBST冲洗脑切片,使用抗荧光猝灭剂(索莱宝)封片,荧光显微镜(ZEISS Axio Vert.A1, GER)观察结果。分析每只小鼠($n=6$)至少3张梗死区切片,这些切片从梗死区取样,并在梗死区周围进行3个视野采集。

1.5 蛋白免疫印迹检测

rOPN递送24 h后将小鼠颈椎脱臼处死,使用200 mL含有PMSF的RIPA缓冲液(索莱宝)溶解来自实验组和对照组的20 mg小鼠梗死周区皮层组织样品。将组织冷冻研磨后,在4 °C、12 000 r/min下离心悬液40 min,收集上清液。以BSA(索莱宝)为标准,上清液采用BCA(碧云天生物科技股份有限公司)法定量。使用12% SDS-PAGE电泳120 min分离20 μg蛋白质样品,然后在350 mA下将其转移至PVDF膜1 h。PVDF膜在封闭缓冲液中于37 °C下封闭1 h。使用一抗兔抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(1:1 000, bs-1313R, 博奥森),添加兔抗突触素(1:1 000, bs-8845R, 博奥森)作为一抗,4 °C孵育膜过夜。反复洗涤膜后,将膜与过氧化物酶标记的驴抗兔IgG抗体(1:1 000, bs-0295D-HRP, 博奥森)于室温下轻轻摇动孵育PVDF膜1 h, ECL(索莱宝)显色。洗膜后,使用Amersham Imager 600观察膜。ImageJ分析测定各条带的吸光度(D)值,以β-actin蛋白的表达水平为参考,测得蛋白质条带/β-肌动蛋白灰度值作为被测蛋白质的相对表达水平。

1.6 RNA提取和测序

生理盐水组和rOPN组小鼠的皮质样本用于RNA测序。使用TRIzol Plus RNA纯化试剂(12183555, Invitro-

gen, US)从每个样品中提取总RNA, 并使用NEBNext UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina(NEB, US)按相关说明书和索引进行文库制备, 代码被添加到每个样本的属性序列中。使用TruSeq PE Cluster Kit v4-cBot-HS(Illumina)在cBot Cluster Generation System上对索引编码样本进行聚类。文库在Illumina Hiseq 2500平台上进行测序, 并生成双端读数。使用DESeq R包(1.10.1)对两组基因进行差异表达分析, $P<0.05$ 的基因为差异表达。使用KOBAS软件进行KEGG术语分类, 以测试KEGG通路中差异表达基因的富集情况。

1.7 免疫荧光统计

使用Puncta Analyzer计算囊泡谷氨酸转运体1(vesicular glutamate transporter 1, Vglut 1)标记的突触前(红色)、PSD 95标记的突触后(绿色)以及共存突触的数量(黄色)。Puncta Analyzer由BaryWark编写, 从c.eroglu@cellbio.duke.edu获得, 并只能在ImageJ 1.26(<http://rsbweb.nih.gov/ij>)下运行^[12]。此外, ImageJ定量分析CD31标记的血管密度、GFAP标记的星形胶质细胞数量、IBA1标记的小胶质细胞数量。

1.8 数据统计分析

本研究采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析和制图。实验数据以均值±标准误(mean±SEM)

来表示。两独立样本采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

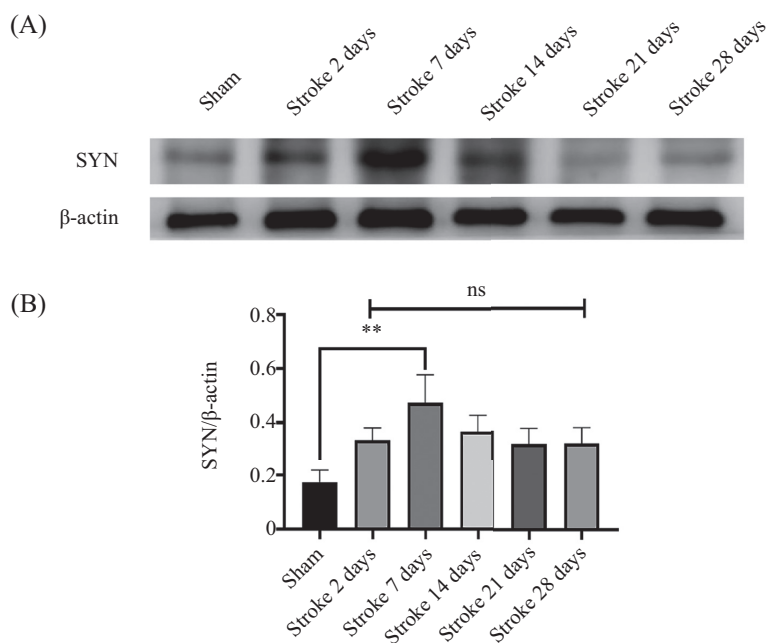
2 结果

2.1 卒中后第7天梗死周区皮层突触素表达水平显著上调

突触素是评估突触和轴突可塑性变化的关键分子之一^[13]。通过免疫印迹实验, 与假手术组相比, 突触素表达水平从脑卒中后第2天开始升高, 第7天达到峰值, 第14天下降, 差异具有统计学意义($P<0.01$)(图1A)。尽管突触素表达在卒中后1个月的不同时间发生了变化, 但在卒中后2、7、14、21、28天无统计学显著性差异($^{ns}P>0.05$)(图1B)。提示在脑卒中后的第7天可能是神经可塑性发生的最佳时间窗。

2.2 OPN促进梗死周区皮层突触的形成

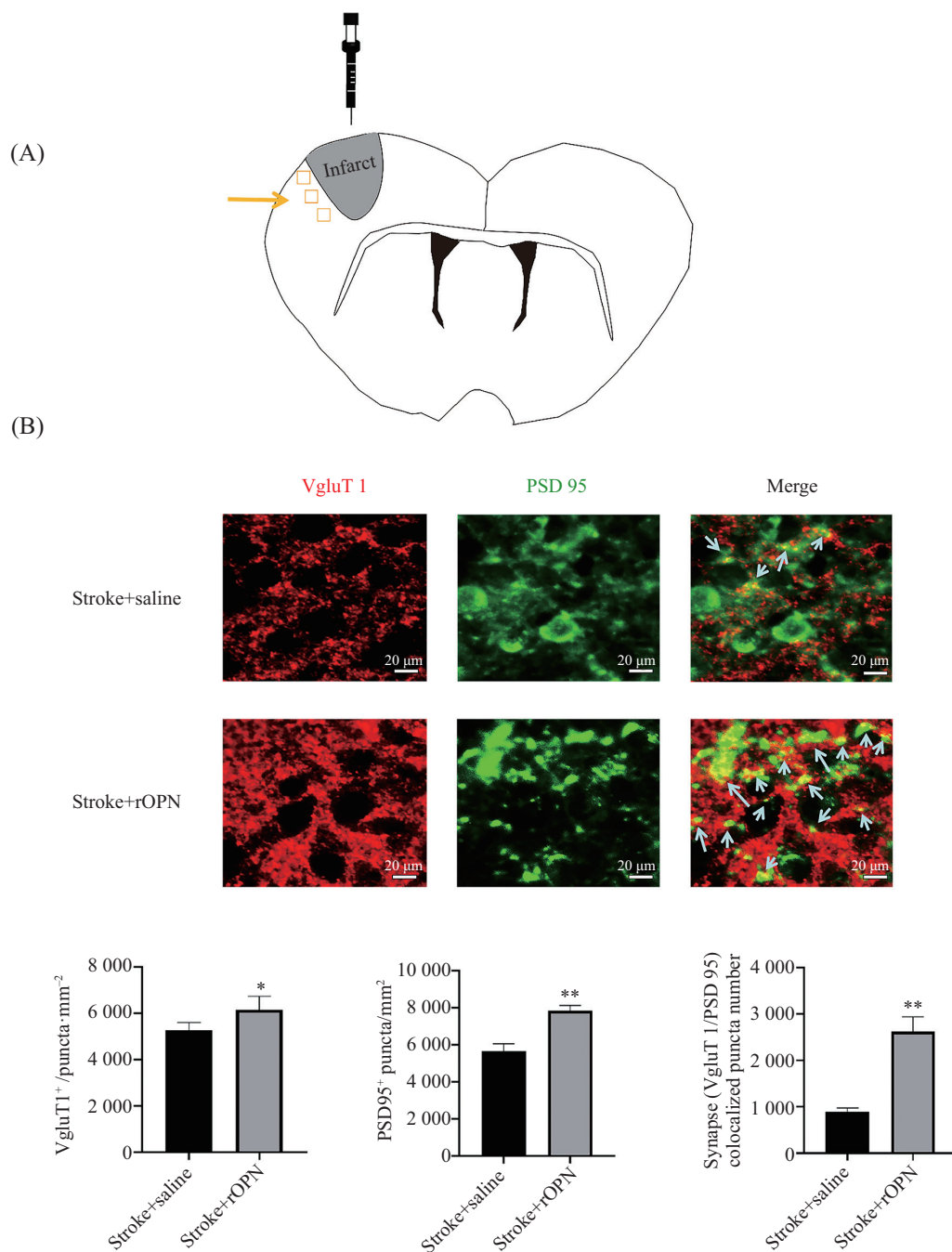
突触后PSD 95和Vglut 1是标记神经元兴奋性突触密度的关键蛋白^[14]。为确定OPN是否可以促进梗死周区的神经元的突触形成, 我们在卒中后第7天对梗死区域进行原位注射人源rOPN, 24 h后处死小鼠并在梗死周区皮层检测Vglut 1、PSD 95以及共存突触的表达(图2A)。与生理盐水组相比, rOPN给药后可



A: Western blot检测卒中后2、7、14、21、28天及假手术组突触素蛋白的表达水平; B: Western blot灰度值统计结果。^{ns} $P>0.05$, ^{**} $P<0.01$, $n=3$ 。
A: Western blot was used to evaluate the expression levels of synaptophysin at 2, 7, 14, 21, 28 days after stroke and in the sham group; B: statistical analysis of Western blot. ^{ns} $P>0.05$, ^{**} $P<0.01$, $n=3$.

图1 卒中后不同时间段梗死周区皮层突触素(SYN)蛋白表达水平

Fig.1 The protein expression levels of SYN (synaptophysin) in the peri-infarct cortex at different periods after stroke



A: 给予OPN后小鼠脑组织切片, 黄色方框为梗死周区视野采集区域。B: 双重免疫荧光检测突触前标记物VgluT 1(红色)和突触后标记物PSD 95(绿色)在梗死周区的表达, 白色箭头指示处为VgluT 1和PSD 95共存突触(黄色)。对突触前标记物VgluT 1、突触后标记物PSD 95和共存突触的定量分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与生理盐水组相比, $n=6$ 。

A: mouse brain tissue sections after OPN administration, the yellow box is the field of view collection area around the infarct. B: double immunofluorescence to detect the expression of presynaptic marker VgluT 1 (red) and postsynaptic marker PSD 95 (green) in the penumbra of stroke. The yellow cells indicated by the white arrows are representative the colocalized synapses of VgluT 1 and PSD 95. Quantitative analysis of the VgluT 1, PSD 95 and colocalized synapses. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the stroke+saline group, $n=6$.

图2 OPN促进梗死周区的突触形成, 并增强神经可塑性

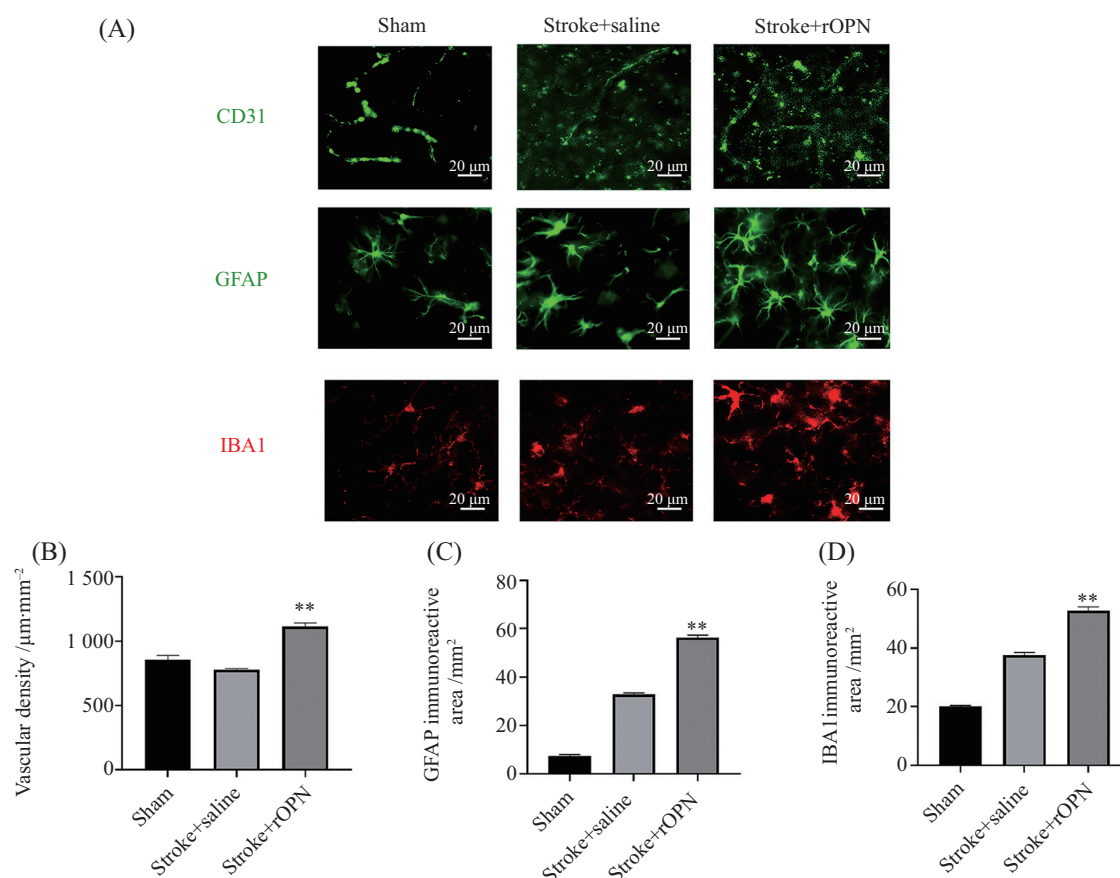
Fig.2 OPN promotes the synaptic formation and enhances neuroplasticity in the penumbra area

显著上调梗死周区突触的数量, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)(图2B)。结果表明, 在卒中亚急性期, OPN可以促进梗死周区的突触形成, 诱发神经元的突触重连

接, 增强神经可塑性。

2.3 OPN诱导卒中后血管生成、胶质细胞增生

梗死周区血小板内皮黏附分子31(platelet endo-



A: 假手术组、生理盐水组和rOPN组梗死周区的CD31、GFAP和IBA1免疫荧光染色; B-D: 假手术组、生理盐水组和rOPN组的血管密度、星形胶质细胞和小胶质细胞的统计分析。** $P<0.01$, 与生理盐水组相比, $n=6$ 。

A: immunofluorescence staining of CD31, GFAP and IBA1 in the peri-infarct area of the sham group, the stroke+saline group and the stroke+rOPN group; B-D: statistics of vascular density, astrocyte and microglia in the sham group, the stroke+saline group and the stroke+rOPN group. ** $P<0.01$ compared with the stroke+saline group, $n=6$.

图3 OPN促进梗死周区的血管生成、星形胶质细胞和小胶质细胞增殖

Fig.3 OPN promotes angiogenesis and astrocyte and microglial proliferation in the peri-infarct area after stroke

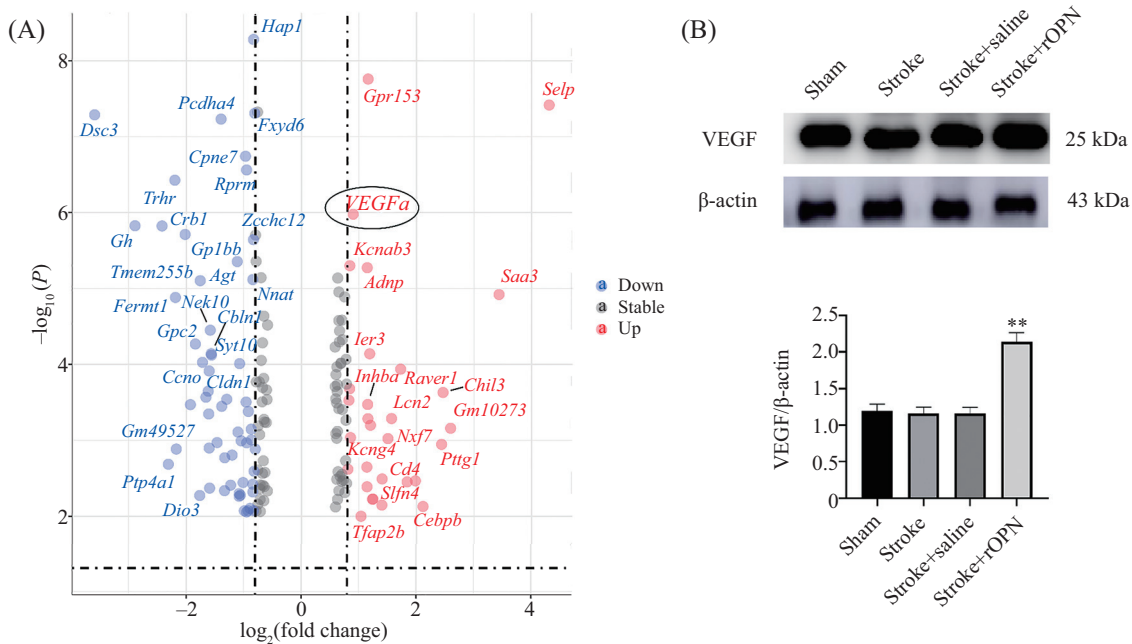
thelial cell adhesion molecule-1, CD31)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和离子化钙结合适配器分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1)与突触形成关系最为密切, 这将为新突触的构建和稳定的连接提供能量及一系列神经营养因子^[15]。我们在给药24 h后, 对梗死周区皮层使用CD31标记血管密度、GFAP标记星形胶质细胞和IBA1标记小胶质细胞(图3A), 并对梗死周区血管密度、星形胶质细胞和小胶质细胞数量进行定量分析(图3B~图3D)。与生理盐水组比较, rOPN给药可显著上调梗死周区的血管密度、星形胶质细胞和小胶质细胞的数量, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果表明, 外源性的rOPN可以促进亚急性期梗死周区的血管生成和胶质细胞增生, 继而导致神经元突触的重连接。

2.4 OPN促进卒中小鼠梗死周区皮层VEGF的表达上调

为深入探讨OPN诱导神经可塑性的潜在机制, 卒中后第7天梗死区域经原位注射rOPN, 24 h后进行梗死周区RNA测序(RNA-Seq)分析(SRA data: PRJ-NA813991, NCBI)。与生理盐水组相比, rOPN显著提高VEGF的转录水平(图4A), 差异具有统计学意义($P<0.01$)。进一步的蛋白质印迹分析也表明, rOPN显著上调VEGF的蛋白表达水平, 差异具有统计学意义(图4B)($P<0.01$)。结果表明, 外源性的rOPN可上调梗死周区VEGF的表达。

3 讨论

脑卒中致死率虽在世界范围内排名第五, 但它仍然是导致大量卒中幸存者永久残疾的主要原因^[16]。截



A: 生理盐水组和rOPN治疗组小鼠之间差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的火山图。显著下调和上调的基因分别绘制为蓝色和红色(总共15 007个基因中的201个, 其中102个基因下调和99个基因上调)。稳定基因以灰色绘制。平行于y轴的两条虚线表明绝对 $\log_2$ 倍变化等于0.8, 并且 $P<0.05$ 用于过滤器。OPN促进VEGF mRNA表达(骨桥蛋白处理组 $n=3$, 生理盐水组 $n=2$)(SRA数据: PRJNA813991, NCBI)。B: Western blot检测假手术组、卒中组、生理盐水组、OPN治疗组的VEGF蛋白表达水平。 $**P<0.01$, 与生理盐水组相比, $n=3$ 。

A: volcano plot of DEGs (differentially expressed genes) between stroke+saline and OPN-treated mice. Significantly down- and up-regulated genes are plotted in blue and red, respectively (201 out of a total of 15 007 genes, of which 102 were down-regulated and 99 were up-regulated). Stable genes are drawn in grey. Two dashed lines parallel to the y-axis indicate absolute $\log_2$ (fold change) equal to 0.8, and $P<0.05$ for the filter. OPN induced VEGF mRNA expression ($n=3$ for OPN treatment, $n=2$ for stroke+saline group) (SRA data: PRJNA813991, NCBI). B: Western blot detection of VEGF protein expression levels in the sham group, the stroke group, the stroke+saline group and the stroke+rOPN group. $**P<0.01$ compared with the stroke+saline group, $n=3$.

图4 OPN显著上调梗死周区VEGF的表达

Fig.4 OPN significantly upregulates VEGF expression in the peri-infarct cortex

止目前, 治疗脑卒中的公认方法是组织纤溶酶原激活剂。然而, 由于其狭窄的时间窗以及严重的副作用, 如脑出血和恶性脑水肿等, 临床上仅有不足5%的缺血性卒中患者可以采用溶栓治疗^[17]。因此, 迫切需要开发出有效的神经修复措施, 继而促进卒中患者的神经康复。OPN属于细胞外基质蛋白家族(extracellular matrix, ECM), 有研究报道, 骨桥蛋白可促进中枢神经系统损伤后小鼠的轴突再生功能^[9-11]。脑卒中后, 梗死周区神经元突触的结构和功能受到了一定损伤, 但是它们仍然却具有一定的可塑能力^[8]。结合细胞外基质蛋白家族在调控突触可塑性过程中发挥的作用^[5], 推测OPN很可能在脑卒中后也发挥作用。本实验结果发现, 卒中后第7天大脑具有自发的神经修复能力。为确定卒中亚急性期OPN的神经可塑性效应, 在卒中后第7天, 我们通过梗死区域皮层原位注射人源rOPN治疗小鼠。结果提示, 在卒中亚急性期OPN可诱导突触发生、血管生成以及胶质增生。另外,

转录组测序发现VEGF是OPN的关键下游分子, OPN可以上调VEGF的mRNA和蛋白表达水平, 促进脑血管重塑。结果提示OPN可能通过VEGF信号途径增强卒中后神经可塑性。

脑卒中可分为急性期(超急性期)、亚急性期和慢性期, 不同时间节点对应不同治疗方法。在卒中急性期(超急性期), 主要以介导兴奋性毒性、诱发炎症反应等细胞过程为特征, 并在最初失血的几个小时内导致细胞死亡^[18-19]。卒中的急性期(超急性期)之后是亚急性期。该阶段主要以炎症反应减少和可塑性增加为特征, 在啮齿动物中持续约1个月, 在人类卒中后持续长达3个月^[20-21]。早期研究表明, 小鼠卒中后3周, 运动皮层、运动前皮层、初级和次级躯体感觉皮层均自发地产生显著的神经重投射, 并且在1个月后达到最大值^[8,22]。随着卒中从亚急性期进展到慢性期, 这种可塑性窗口逐渐缩小。在慢性期, 大脑诱导恢复的潜力有限。卒中的慢性期从人类卒

中发作后3个月开始出现,其特征是没有自发恢复^[20-21]。然而,慢性期仍有可能恢复神经功能,但需要强化神经康复治疗 and 患者的高度配合^[23]。与之前的结果一致,我们研究发现,相较于假手术组,突触素蛋白表达在卒中后第7天显著升高。因此,我们推测大脑缺血损伤后,可通过自发诱导功能区皮层的突触发生,促进神经功能恢复;并且脑卒中后第7天可能是脑卒中神经修复的最佳时间窗。

缺血性卒中后,梗死周区的神经可塑性,在神经修复过程中起着关键作用。突触的形成和成熟是神经元成熟的标志,这对建立功能性神经元回路至关重要,它是运动和学习/记忆功能的基础^[24-25]。最近研究发现,ECM家族分子在神经可塑性过程中扮演着重要角色^[26-27]。之前研究发现,当中枢神经系统损伤后,OPN可以增强视网膜神经节、皮质脊髓神经元、下行脊髓前体神经元的生长能力^[9-11]。然而,骨桥蛋白是否能加强卒中亚急性期皮质神经元的神经可塑性作用尚不完全清楚。我们进一步研究发现,局部注射骨桥蛋白可激活突触相关蛋白VgluT 1和PSD 95的表达。免疫荧光共定位结果发现,骨桥蛋白的过表达促进共存突触数量增加。上述结果表明,过表达骨桥蛋白确实可介导脑卒中亚急性期皮质神经元的生长,加强神经可塑性。

研究表明,VEGF通过改善卒中患者和啮齿动物卒中模型的血管重塑和增强组织修复能力来促进血管生成并增强神经功能恢复^[28-30]。VEGF是由神经元、星形胶质细胞和内皮细胞在中枢神经系统中表达的二聚体多肽。它表现出血管生成和神经营养特性,并在发育过程中激活突触可塑性^[14,31]。此外,VEGF信号还在发育过程中调节海马轴突分支^[32]。最近的研究表明,OPN与GF-1、BDNF和/或CNTF联合治疗可增强受损轴突的再生能力^[9-11]。因此,我们推测,VEGF是OPN的关键下游分子,并参与卒中后的突触发生和血管生成。为了验证这一假设,我们进行了转录组测序和蛋白质印迹实验。结果表明,OPN可以提高VEGF mRNA和蛋白质的表达水平。

中枢神经系统组织再生类似于激活癌症^[33]。神经的再生可触发成年神经元的生长程序,以促进可塑性重排或涉及祖细胞对损伤组织信号级联反应^[34]。在卒中和脊髓损伤模型中,激活*C-myc*和*RAS*等癌基因可促进轴突出芽,从而建立新的神经网络^[35-36]。之前的研究表明,OPN/整合素/VEGF信号轴可促进血

管生成和乳腺肿瘤生长^[37-38]。本研究结果与先前研究报道一致,在卒中亚急性期,OPN可能通过激活VEGF表达,促进血管生成并激活皮质神经元生长。

综上所述,我们的结果提示,VEGF可能是OPN促进卒中后梗死周区血管生成的关键下游分子,并参与卒中后的突触发生、神经可塑性。本研究证实,局部注射外源性rOPN可以促进梗死周区的突触形成和血管生成,这将为今后治疗缺血性脑卒中后的神经修复和功能恢复提供一定的研究基础。

参考文献 (References)

- [1] POWERS W J, RABINSTEIN A A, ACKERSON T, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association [J]. *Stroke*, 2019, 50(12): 344-418.
- [2] JOY M T, CARMICHAEL S T. Encouraging an excitable brain state: mechanisms of brain repair in stroke [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(1): 38-53.
- [3] YANG L, HAN B, ZHANG Z, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of circular rna scmh1 promotes functional recovery in rodent and nonhuman primate ischemic stroke models [J]. *Circulation*, 2020, 142(6): 556-74.
- [4] JOY M T, BEN ASSAYAG E, SHABASHOV-STONE D, et al. CCR5 is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury [J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1143-57.e13.
- [5] DITYATEV A, SCHACHNER M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(6): 456-68.
- [6] NIEUWENHUIS B, HAENZI B, ANDREWS M R, et al. Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system [J]. *Biol Rev*, 2018, 93(3): 1339-62.
- [7] ZHOU Y, YAO Y, SHENG L, et al. Osteopontin as a candidate of therapeutic application for the acute brain injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 8918-29.
- [8] LI S, OVERMAN J J, KATSMAN D, et al. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(12): 1496-504.
- [9] ANDERSON M A, O'SHEA T M, BURDA J E, et al. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury [J]. *Nature*, 2018, 561(7723): 396-400.
- [10] BEI F, LEE H H C, LIU X, et al. Restoration of visual function by enhancing conduction in regenerated axons [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 219-32.
- [11] LIU Y, WANG X, LI W, et al. A sensitized IGF1 treatment restores corticospinal axon-dependent functions [J]. *Neuron*, 2017, 95(4): 817-33.
- [12] IPPOLITO D M, EROGLU C. Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number [J]. *J Vis Exp*, 2010, 45: 2270.
- [13] YANG K, ZHOU Y, ZHOU L, et al. Synaptic plasticity after focal cerebral ischemia was attenuated by GAP26 but enhanced by GAP-134 [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 888.

- [14] WU K W, LÜ L L, LEI Y, et al. Endothelial cells promote excitatory synaptogenesis and improve ischemia-induced motor deficits in neonatal mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 121: 230-9.
- [15] OVERMAN J J, CLARKSON A N, WANNER I B, et al. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(33): E2230-9.
- [16] GITTLER M, DAVIS A M. Guidelines for adult stroke rehabilitation and recovery [J]. *JAMA*, 2018, 319(8): 820-1.
- [17] THIEBAUT A M, GAUBERTI M, ALI C, et al. The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(12): 1121-32.
- [18] ANRATHER J, IADECOLA C. Inflammation and stroke: an overview [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(4): 661-70.
- [19] AVERT TRIAL COLLABORATION GROUP. Efficacy and safety of very early mobilisation within 24 h of stroke onset (AVERT): a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(9988): 46-55.
- [20] BERNHARDT J, HAYWARD K S, KWAKKEL G, et al. Agreed definitions and a shared vision for new standards in stroke recovery research: the stroke recovery and rehabilitation roundtable taskforce [J]. *Int J Stroke*, 2017, 12(5): 444-50.
- [21] CORBETT D, CARMICHAEL S T, MURPHY T H, et al. Enhancing the alignment of the preclinical and clinical stroke recovery research pipeline: consensus-based core recommendations from the stroke recovery and rehabilitation roundtable translational working group [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2017, 31(8): 699-707.
- [22] LI S, NIE E H, YIN Y, et al. GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(12): 1737-45.
- [23] WARD N S, BRANDER F, KELLY K. Intensive upper limb neurorehabilitation in chronic stroke: outcomes from the queen square programme [J]. *J Neurol Neurosurg PS*, 2019, 90(5): 498-506.
- [24] MANSVELDER H D, VERHOOG M B, GORIOUNOVA N A. Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2019, 54: 186-93.
- [25] STOKOWSKA A, ATKINS A L, MORÁN J, et al. Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia [J]. *Brain*, 2017, 140(2): 353-69.
- [26] LOURENCO M V, FROZZA R L, DE FREITAS G B, et al. Exercise-linked FNDC5/Irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models [J]. *Nat Med*, 2019, 25(1): 165-75.
- [27] KIM J H, JUNG H G, KIM A, et al. Hevin-calcyon interaction promotes synaptic reorganization after brain injury [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(9): 2571-88.
- [28] KRUPINSKI J, KALUZA J, KUMAR P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-8.
- [29] NIH L R, GOJGINI S, CARMICHAEL S T, et al. Dual-function injectable angiogenic biomaterial for the repair of brain tissue following stroke [J]. *Nat Mater*, 2018, 17(7): 642-51.
- [30] SUN P, ZHANG K, HASSAN S H, et al. Endothelium-targeted deletion of microrna-15a/16-1 promotes poststroke angiogenesis and improves long-term neurological recovery [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 1040-57.
- [31] WU K W, MO J L, KOU Z W, et al. Neurovascular interaction promotes the morphological and functional maturation of cortical neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 290.
- [32] LUCK R, URBAN S, KARAKATSANI A, et al. VEGF/VEGFR2 signaling regulates hippocampal axon branching during development [J]. *eLife*, 2019, 8: e49818.
- [33] CARMICHAEL S T. Emergent properties of neural repair: elemental biology to therapeutic concepts [J]. *Ann Neurol*, 2016, 79(6): 895-906.
- [34] ZAI L, FERRARI C, SUBBAIAH S, et al. Inosine alters gene expression and axonal projections in neurons contralateral to a cortical infarct and improves skilled use of the impaired limb [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(25): 8187-97.
- [35] BELIN S, NAWABI H, WANG C, et al. Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics [J]. *Neuron*, 2015, 86(4): 1000-14.
- [36] MAKWANA M, SERCHOV T, HRISTOVA M, et al. Regulation and function of neuronal GTP-Ras in facial motor nerve regeneration [J]. *J. Neurochem*, 2009, 108(6): 1453-63.
- [37] RAJA R, KALE S, THORAT D, et al. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 α -mediated VEGF-dependent angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2014, 33(16): 2053-64.
- [38] CHAKRABORTY G, JAIN S, KUNDU G C. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 152-61.