

综述

小胶质细胞在缺血性脑卒中中的双重作用及机制

程明星^{1, #}, 李晨辉^{1, #}, 孟卫², 王琛^{1, *}

中国药科大学¹生命科学与技术学院, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室; ²理学院, 南京 211198

摘要: 脑卒中是全球范围内继癌症后导致成年人死亡的第二大病因, 同时也是导致成年人伤残的主要原因, 其中由大脑缺血引起的缺血性脑卒中占绝大多数。中枢神经系统的小胶质细胞在应对脑缺血损伤反应中发挥神经保护和损伤双重作用: 一方面, 小胶质细胞参与了脑卒中后神经功能恢复过程, 包括促进炎症消退、细胞碎片清除、神经再生和突触重塑等; 另一方面, 小胶质细胞的过度激活加重神经损伤。本文简述了小胶质细胞在脑卒中后的激活机制, 着重探讨了其不同功能对脑卒中后神经损伤和恢复的影响, 深入探索脑缺血后小胶质细胞的损伤和保护机制将为脑卒中治疗提供新靶点和新策略。

关键词: 缺血性脑卒中; 小胶质细胞; 炎症反应; 吞噬作用

中图分类号: R392.1

Dual roles and mechanism of microglia in ischemic stroke

CHENG Ming-Xing^{1, #}, LI Chen-Hui^{1, #}, MENG Wei², WANG Chen^{1, *}

¹State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Life Science and Technology; ²School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Stroke is the second most common cause of death after cancer worldwide and a major cause of acquired disability in adults. Overwhelming majority of strokes are caused by cerebral ischemia and are classified as ischemic stroke. Microglia are the resident immune cells and play dual roles in response to ischemia injury in the central nervous system (CNS). On the one hand, microglia may contribute to tissue function recovery process by promoting inflammation resolution, cellular debris clearance, nerve regeneration and synapse remodeling. On the other hand, excessive activation of microglia aggravates nerve damage after ischemic injury. Here, we briefly describe the mechanism of microglia activation after stroke, and comprehensively review the dual role of microglia in neurodegeneration and regeneration after stroke. In-depth exploration of the cytotoxic and protective mechanisms of microglia will provide new targets and new strategies for stroke treatment.

Keywords: ischemic stroke; microglia; inflammation; phagocytosis

缺血性脑卒中是世界范围内危害人类健康的重要疾病, 具有高发病率和高死亡率的特点。长期以来临床上缺少有效的脑卒中药物治疗方案, 唯一被证明有效的急性期治疗药物阿替普酶, 治疗时间窗仅仅为脑卒中后 4~6 h, 而大量缺血性脑卒中患者的有效治疗时间已超过该时间线, 因此迫切需要缺

血性脑卒中的治疗新方案以缓解治疗压力^[1]。

在急性脑卒中后, 损伤的神经元会释放损伤相关模式分子 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 包括热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)、ATP、UDP 和高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box 1 protein, HMGB1) 等, 从而引发以神经 - 胶质

Received 2020-12-18 Accepted 2021-02-26

Research from the corresponding author's laboratory was supported by Youth Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31800724).

[#]These authors contributed equally to this review.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-25-86185395; E-mail: cwang1971@cpu.edu.cn

细胞激活、外周免疫细胞浸润、细胞因子和趋化因子释放为主要特征的免疫反应^[2]。缺血区脑组织在脑卒中后数分钟即出现炎症细胞的激活，并且其激活可持续至脑卒中后数月乃至数年^[3]。

小胶质细胞作为中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中常驻免疫细胞，在生理状态下，具有持续监测和感知脑内环境，并且调控 CNS 稳态和宿主防御的功能^[4]，其功能失调可诱导神经功能障碍^[5]。病理学、影像学研究显示脑卒中患者脑内伴有小胶质细胞激活^[6]，小胶质细胞在脑卒中后不同阶段呈现不同的功能状态，使其具有神经损伤和神经保护双重作用。使用广谱性的小胶质细胞激活抑制剂在治疗脑卒中的临床试验中被证明无效或仅表现为有限的改善作用，也进一步提示小胶质细胞在脑卒中后起到多方面的作用^[7,8]。针对脑卒中后小胶质细胞的治疗方案也应由单纯的抑制小胶质细胞转变为调控其功能，即抑制小胶质细胞的神经毒性作用，同时保留或促进其神经保护作用。本文将对小胶质细胞在缺血性脑卒中后激活的机制及其发挥不同功能的机制进行阐述，为实现精准靶向小胶质细胞治疗提供新思路。

1 缺血性脑卒中后小胶质细胞的激活机制

小胶质细胞表达一系列嘌呤能受体和模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR)，可以识别脑缺血损伤区域的 DAMPs，介导多种免疫信号通路激活。同时受损区域神经元对小胶质细胞的免疫抑制作用减弱，进一步加剧小胶质细胞的激活^[9]。

1.1 P2嘌呤能受体介导的小胶质细胞激活

P2 嘌呤能受体是免疫细胞感知 ATP 和其他核苷酸应激的一类膜受体，分为亲电性 P2X 受体 (P2XRs) 和 G 蛋白耦联型 P2Y 受体 (P2YRs)，两者在脑缺血后小胶质细胞激活过程中均起到重要的作用^[10]。其中小胶质细胞 P2X7 受体被死亡细胞释放的高丰度 ATP 激活后，通过多种方式激活经典核因子 κ B (nuclear factor-kappaB, NF- κ B)、活化 T 细胞核转录因子和低氧诱导因子 1 α ^[11]，诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 和白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 等炎症因子的表达，加剧脑实质炎症反应。

P2YRs 主要包括 P2Y12 受体 (P2Y12R) 和 P2Y6 受体 (P2Y6R)，CNS 中 P2Y12R 主要表达于静息态小胶质细胞膜表面，在受到 ATP 和 ADP 应激后而

内化，诱导细胞骨架再组装信号转导，促进小胶质细胞趋化性粘连与迁移。同时由于 ADP 诱导蛋白激酶 B 磷酸化，P2Y12R 也参与了小胶质细胞的炎症级联反应^[12]。P2Y6R 可被 UDP 激活，介导吞噬反应^[13]。当脑缺血损伤早期释放这些信号分子后，P2Y12R 和 P2Y6R 二者被激活后共同充当“发现我”信号，介导小胶质细胞迁移、形态变换以及吞噬凋亡或坏死神经元。而组织中 ATP 和 UDP 大量积累导致小胶质细胞过度激活，引起过度吞噬反应，损害正常神经细胞功能，增强炎症反应。P2Y6 受体拮抗剂 MRS2578 可有效减少脂多糖诱导的神经元死亡^[13]。P2Y12R 抑制剂氯吡格雷可以减弱小胶质细胞的迁移能力，改善双侧颈总动脉闭塞模型小鼠海马 CA1 神经元活力^[14]。

1.2 PRR介导的小胶质细胞激活

小胶质细胞作为脑内主要的固有免疫细胞，表达 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs) 和 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLR) 等 PRRs 以便对 DAMPs 迅速做出反应。TLRs 起到主要作用，TLR2 和 TLR4 在缺血区脑组织显著上调^[15]，两者可以被 HSP60、HMGB1 和 β 淀粉样蛋白等分子激活并诱导小胶质细胞产生 TNF- α 、白介素 6 (interleukin 6, IL-6) 和 IL-1 β ，促进炎症反应。有关 TLR4 报道显示，小胶质细胞中 TLR4 表达水平受到雌激素受体 G 蛋白耦联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 调节。在小鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 导致脑缺血再灌注损伤后，GPR30 激活可通过下调 TLR4 表达水平抑制小胶质细胞活化，同时减少 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 释放，减轻炎症反应^[16]。HMGB1 被认为是脑卒中后激活 TLR4 最重要的内源激动剂，HMGB1 单克隆抗体可有效改善包括脑卒中在内多种 CNS 疾病的病理特征^[17]。

脑卒中后释放钾离子和 ATP 外排、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 释放或溶酶体损伤等分子事件能够激活 NLRP3 炎症小体，诱导 IL-1 β 和 IL-18 分泌并诱发细胞焦亡，加剧血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性渗漏^[18–20]。巨噬细胞诱导的 C 型凝集素 (macrophage inducible C type lectin, MINCLE) 受体是 CLR 家族中的主要成员之一，其被死亡细胞释放的 SIN3 转录调控蛋白家族成员 A 相关蛋白 130 (Sin3A associated protein 130, SAP130) 激活后，调控下游脾酪氨酸激酶 (spleen

associated tyrosine kinase, Syk) 信号转导, 表达炎症因子。MINCLE 与 SAP130 表达水平在脑缺血 2 h 后达到峰值, 而 Syk 抑制剂显著减小 MCAO 小鼠脑梗死体积^[21]。环二核苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) 是感知 DNA 的免疫受体, 在细胞胞浆和核内均发挥着抗病毒感染作用^[22]。其与下游接头蛋白干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 介导 DNA 引起的免疫反应。当脑缺血发生后, 小胶质细胞吞噬死亡细胞释放的 DNA, 激活 cGAS-STING 信号通路, 分泌 IL-6、TNF- α 和 β 干扰素, 加剧炎症反应。cGAS 抑制剂 A151 可以降低缺血脑部 IL-6 和 TNF- α 含量, 减少中性粒细胞浸润, 减轻脑水肿^[23]。

1.3 抑制信号缺失介导的小胶质细胞激活

在正常生理状态下, 神经元活动可调控小胶质细胞的活性, 如神经递质可抑制小胶质细胞的过度激活。小胶质细胞表达 AMPA 受体、GABA 受体、去甲肾上腺素受体和大麻素受体等神经递质受体, 其激活后下调 TNF- α 等促炎细胞因子的产生, 减轻神经毒性作用^[24]。另外, 神经细胞表面表达的趋化因子 CX3CL1 和免疫抑制分子 CD200, 分别通过 CX3CR1 和 CD200R 稳定小胶质细胞静息态表型。而脑缺血区神经元的死亡导致 CX3CL1 和 CD200 丢失后, 增强了小胶质细胞的活化程度^[25, 26]。给予脑卒中模型小鼠脑室注射外源重组 CD200 蛋白可抑制小胶质细胞活化, 降低 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平, 减轻神经炎症反应^[26]。

2 小胶质细胞调节缺血性脑卒中损伤与修复的功能机制

激活后小胶质细胞发生多种功能的改变, 总的来说包括释放性分泌功能和接触性功能, 参与调控脑卒中损伤与修复过程。

2.1 小胶质细胞释放性功能调控缺血性脑卒中损伤与修复

脑卒中急性缺血期间, 小胶质细胞发生激活并迁移到梗死区域, 同时释放 ROS、蛋白酶、促炎细胞因子和 NO 等炎症介质^[27], 大量研究证明这些介质可导致脑卒中后 BBB 破坏。ROS 积累引起的氧化应激是脑卒中后 BBB 破坏早期阶段的关键因素, ROS 一方面导致细胞间紧密连接蛋白功能失调, 增加 BBB 通透性; 另一方面激活血管内皮细胞内 NF- κ B 信号, 上调细胞间黏附分子 1 (intercellular

cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 表达, 招募炎症细胞浸润, 进一步破坏 BBB^[28]。在小鼠 MCAO 模型脑皮质或脑卒中患者脑样本中均检测到高水平的 NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4)。而敲除 NOX4 减少 ROS 产生, 可以减轻 BBB 渗漏和神经元凋亡^[28, 29]。小胶质细胞释放的基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotein, MMP) 主要包括 MMP-3 和 MMP-9, 两者通过降解细胞外基质蛋白和紧密连接蛋白, 破坏 BBB 完整性。研究显示, 脑卒中患者血清中的 MMP-9 水平与死亡率和运动功能障碍程度成正比^[30], 使用药物抑制 MMP-9 可显著改善组织型纤溶酶原激活剂输入延迟所带来的 BBB 损伤及出血性转化^[31]。促炎细胞因子通过多种方式损坏 BBB, 如 TNF- α 促进内皮细胞坏死, IL-1 β 可以下调紧密粘连蛋白 ZO-1 表达等^[28]。将共培养的小胶质细胞与血管内皮细胞暴露于缺氧和葡萄糖环境, 血管内皮细胞内坏死通路调控分子 p-RIP1 和 p-MLKL 的表达水平显著升高, 伴随细胞逐渐死亡, 而 TNF- α 单抗药物 Infliximab 可以抑制其坏死程度^[32]。一氧化氮合酶 iNOS 和 NO 也被报道具有损坏 BBB 的作用^[33], 二者在脑缺血后促进 TNF- α 、IL-1 β 和 ROS 产生, 进而引发继发性炎症反应。NO 还可通过下调微囊蛋白 1 (Caveolin-1) 激活 MMP-3 和 MMP-9, 加重 BBB 损伤^[34]。

除了损伤 BBB, 炎症因子也诱导兴奋性神经毒性。兴奋性神经毒性是引起神经元功能障碍和死亡的主要机制之一, 其主要由兴奋性神经递质谷氨酸过量释放所引起。脑卒中后小胶质细胞分泌的 TNF- α , 一方面诱导谷氨酸分泌, 抑制星型胶质细胞摄取和转运谷氨酸, 增加细胞外谷氨酸浓度, 引起神经元异常兴奋^[35]。另一方面快速触发神经元表面钙渗透性受体 AMPA 和 NMDA 受体的表达, 而降低抑制性 GABA 受体表达, 导致突触兴奋/抑制比率平衡失调, 进一步造成神经元功能性障碍^[35]。小胶质细胞内源性分子 Rhoa 具有抑制 TNF- α 产生的作用, 在 Rhoa 缺陷的小鼠脑中, 谷氨酸分泌增加, 引起突触缺失及神经变性^[36]。

在脑卒中急性缺血后期, 激活的小胶质细胞通过产生抗炎细胞因子和组织修复活性因子来抑制过度的神经炎症, 恢复稳态以抑制神经损伤。抗炎细胞因子主要包括转化生长因子 β (transforming growth

factor- β , TGF- β) 和白介素 10 (interleukin 10, IL-10), 其产生和分泌受到小胶质细胞的吞噬作用调节^[37]。TGF- β 和 IL-10 可以抑制血管内皮细胞分泌 ICAM-1 和 VCAM-1, 减少中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 降低病灶区 ROS 和 TNF- α 水平。TGF- β 可促进调节性 T 细胞发育, 通过抑制神经毒性星型胶质细胞增生, 减轻神经炎症, 增强脑缺血损伤慢性期的神经功能恢复^[38]。TGF- β 和 IL-10 还具有直接的神经保护作用, 例如 TGF- β 调控星型胶质瘢痕形成以及轴突生长, 促进神经修复^[39]。IL-10 通过激活酪氨酸激酶 JAK1/STAT3 信号通路, 增加轴突导向因子 Netrin-1 表达, 促进神经突触形成^[40]。IL-6 被认为是脑卒中后经典的促炎因子, 但最新的研究证明其也具有神经保护作用, 再生的小胶质细胞产生和分泌 IL-6, 通过 IL-6 受体激活下游信号转导元件 gp130 介导的信号通路, 增强了脑外伤后海马区神经再生能力, 促进神经网络连接修复和减轻行为认知缺陷^[41]。胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是神经细胞生长的关键因子, 在缺血性脑卒中后由小胶质细胞诱导产生, 主要通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制神经元凋亡, 同时促进神经轴突生长。IGF-1 还可以增强侧脑室室管膜下区神经干细胞的增殖、分化和迁移, 进一步修复神经网络^[42]。

2.2 小胶质细胞接触性功能调节缺血性脑卒中损伤与修复

细胞碎片或死亡细胞的快速清除是缺血性脑卒中后神经系统重建和神经功能恢复所必需的。小胶质细胞作为脑组织中主要的吞噬细胞, 激活后能快速清除组织细胞碎片, 减少 DAMPs, 保护大脑免受继发性炎症反应损伤^[9]。CD36 和 TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) 是主要分布于巨噬细胞的吞噬受体, 二者共同介导了缺血性脑卒中后细胞碎片的清除^[43, 44]。脑缺血引起多种 DAMPs 释放, 在早期有助于细胞碎片的清除, 但其过度释放可导致继发性炎症损伤。小胶质细胞通过激活 MAFB/MSR1^[45] 和 STAT6/Arg1 信号通路^[46], 介导其吞噬与胞葬作用, 促进 DAMPs 清除从而改善神经功能障碍。核受体 LXR β 与 RXR α 形成异二聚体, 介导多种与吞噬相关基因的表达, 包括 TREM2。研究显示, LXR β 激动剂 GW3965 可增强小胶质细胞的吞噬能力, 增加突触蛋白表达和轴突密度, 缓解缺血性神经功能损伤^[47–50]。

脑卒中可导致神经网络和神经电生理异常, 缺血区域的小胶质细胞通过清除受损的神经网络, 促进神经功能的恢复^[51]。在小鼠体内荧光标记神经元和小胶质细胞的双光子成像研究中发现, 静息态小胶质细胞监视和接触神经突触时长约 5 min, 而脑缺血后, 激活态小胶质细胞接触时间延长至 1 h, 并增加包裹在突触结构周围的接触面积, 同时伴随着突触前端结构消失现象^[52], 说明小胶质细胞可能通过吞噬突触来调节和保护神经元功能。其他相关研究显示, 小胶质细胞可通过分泌补体成分 C1q, 介导吞噬反应, 清除病变突触结构, 减轻视神经挤压诱导的外侧膝状体背核神经退行性病变^[53]。最新三维超微结构实验 (FIB-SEM) 揭示了小胶质细胞与神经元突触的动态相互作用, 发现小胶质细胞主要吞噬或选择性部分吞噬突触前端结构和轴突, 并非吞噬整个突触, 同时诱导新突触结构棘头丝状伪足形成^[54], 这可能有利于树突棘和突触前端在缺血后几周内的修复更新。白介素 33 作为神经保护性因子, 在突触塑造上也具有重要作用。其一方面增强小胶质细胞吞噬冗余的突触, 促进神经回路的发展^[55], 另一方面诱导小胶质细胞吞噬并重塑细胞外基质, 促进驱动树突棘可塑性, 增强记忆巩固^[56]。

适度的小胶质细胞吞噬有助于脑卒中后神经功能恢复, 但过度的吞噬也可直接导致脑组织发生迟发性神经元丢失和死亡。磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 从细胞质膜内翻到外膜, 是凋亡细胞的重要标志, 并可促进巨噬细胞对凋亡细胞的清除。但受损且存活神经元也发生 PS 的外翻, 其可被乳脂球表皮生长因子 -8 (milk fat globule EGF factor 8, MFG-E8) 识别, 并结合小胶质细胞表面的酪氨酸受体激酶 (Mer tyrosine kinase, MerTK)。随后神经元释放的嘌呤能信号 UDP 作用于 P2Y6R, 诱导吞噬杯的形成, 导致存活神经元的吞噬性死亡^[13, 57]。补体系统也介导吞噬存活神经元。脑卒中后 DAMPs 诱导机体产生自反应性天然免疫球蛋白 M (IgM) 抗体, IgM 通过结合应激细胞表面新表位, 触发小胶质细胞补体级联反应, 产生 C1q 和 C3。研究显示, MCAO 后 24 h, 缺血区 C1q 和 C3 沉积会引起活的神经元死亡, 补体抑制剂 B4Crry 可以阻止小胶质细胞过度吞噬神经元, 改善小鼠长期运动和认知恢复^[58]。

小胶质细胞接触性功能除了吞噬作用, 还可以微调神经元活性。小胶质细胞 P2Y12R 与神经元胞

体释放 ATP 的局部空间处形成特殊的嘌呤能连接体 (somatic junctions), 持续接触和监测神经元。缺血后小胶质细胞覆盖神经元的连接体面积增大, 通过调节神经元内钙离子浓度和增强线粒体活力, 减轻脑卒中后神经元受损程度^[59]。此外, 小胶质细胞 P2Y₁₂R 被活跃突触释放的 ATP 激活后, 调控其伪足探测到突触结构端, 并利用 CD39 和 CD73 等相关受体将 ATP 转化为腺苷来抑制过度的神经活动^[60]。而 CD39 会随着小胶质细胞的激活而降低, 因此缺血性脑卒中后小胶质细胞的激活可能抑制这一神经调节反馈回路, 引起兴奋性神经毒性损伤。

3 讨论与展望

缺血性脑卒中可导致神经元的兴奋性毒性、神经细胞的死亡、神经网络的损伤以及 BBB 通透性的改变, 小胶质细胞可迅速对这些损伤做出反应, 调节疾病的进程和损伤后恢复。从小胶质细胞发挥作用的机制上看 (图 1), 一方面, 活化的小胶质细胞可通过释放多种促炎细胞因子等神经毒性介质介导 BBB 的破坏, 诱导神经元细胞死亡; 另一方面, 活化的小胶质细胞也可以通过清除组织碎片减少神经细胞凋亡, 增强神经再生, 进一步促进脑卒中后神经功能的恢复。可见, 小胶质细胞在缺血损伤后发挥着有益和有害双重作用, 小胶质细胞和神经元之间的相互作用是一个受环境因素调控、由多种通路介导的动态过程^[61]。

选择性清除小胶质细胞的动物相比于正常动物, 其脑卒中后兴奋性谷氨酸神经毒性以及神经元凋亡增加, 神经功能紊乱更加严重^[51]。说明整体上小胶质细胞在脑卒中后的作用是利大于弊, 具体发挥何种作用需考虑脑缺血性损伤反应的阶段。因此, 脑卒中靶向治疗需要严格考虑小胶质细胞的动态性质, 在相应的时间针对特定的靶点进行干预和治疗。同时, 针对其他靶点的脑卒中治疗也需要考虑对小胶质细胞的影响。例如 P2Y₁₂R 拮抗剂被广泛用于脑卒中的二级预防^[62, 63], 但小胶质细胞的 P2Y₁₂R 在脑卒中后的神经功能恢复过程中也起着重要作用, 且数据显示 P2Y₁₂R 拮抗剂氯吡格雷可透过受损的 BBB^[64], 因此此类药物在用于脑卒中预防时需考虑靶点的双重影响; TLR4/NF- κ B 通路过去一直被认为是引起缺血性脑卒中后小胶质细胞早期激活, 并促进炎症反应的关键信号通路之一, 因此使用 TLR4 拮抗剂药物抑制 NF- κ B 的激活来减轻炎症

反应似乎是合理的治疗策略^[65-67], 但这类药物仅作用于脑缺血急性期和亚急性期。已有研究显示神经损伤导致的早期炎症反应可以促进少突胶质细胞前体细胞的增殖和分化, 并促进神经功能的长期恢复, 而抑制早期的小胶质细胞激活阻碍了损伤后轴突的修复^[68]; TNF- α 单抗 Infliximab 可抑制血管内皮细胞坏死, 减轻脑缺血导致的 BBB 破坏^[32], 但其也会阻碍小胶质细胞坏死。最新研究显示, 受损的小胶质细胞程序性坏死和随后的小胶质细胞再生, 有利于防止失调小胶质细胞的异常激活, 促进 CNS 蛋白质再生^[69]。因此该单抗使用需要考虑时效性, 防止缺血后神经功能恢复障碍。相比之下, 神经鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 受体调节剂芬戈莫德 (FTY720) 通过调控小胶质细胞表型, 增强其神经保护功能而抑制其神经损伤作用, 在脑缺血损伤后起着长效的保护作用, 并在临床试验中对脑缺血患者具有良好的疗效^[70, 71]。这些研究提示我们针对小胶质细胞的抗脑缺血治疗应从一味的抑制转变为调控, 且应注意治疗时间的选择。

小胶质细胞在缺血性脑卒中引起的神经炎症过程中起着关键作用, 病理学研究也显示小胶质细胞激活在脑卒中后各阶段具有持续性, 这为药物干预提供了一个有吸引力的治疗靶点。但是目前针对缺血性脑卒中免疫反应的药物在临床试验阶段都以失败告终, 虽然失败的具体原因还未可知, 但总结起来有以下几种可能: (1) 抗炎药物的使用时间不合理, 同一靶点在神经损伤的不同阶段可能具有相反的作用^[41, 72], 而一些单抗类药物可能既抑制了早期神经毒性的炎症反应, 又抑制了炎症在神经功能恢复阶段的保护作用; (2) 使用包括非甾体类消炎药或者米诺环素等并没有靶向脑卒中相关免疫途径的特定靶点, 导致小胶质细胞多种功能受到抑制, 进而降低其神经保护作用; (3) 免疫治疗药物可能通过未知的机制影响了 CNS 其他细胞的正常功能。因此迫切需要选用与疾病相关的特定免疫检查点抑制剂进行脑卒中治疗。

目前尚未完全了解小胶质细胞激活的潜在机制是研究缺血性脑卒中后病理变化的重要障碍, 导致靶向小胶质细胞治疗策略缺乏针对性。目前单细胞测序等一系列技术表明神经损伤后随着空间和时间的推移, 小胶质细胞可能分为多种亚群, 这些不同状态的细胞之间以及它们与 CNS 的其他细胞间是否以及如何相互作用仍需要进一步研究。另一方面,

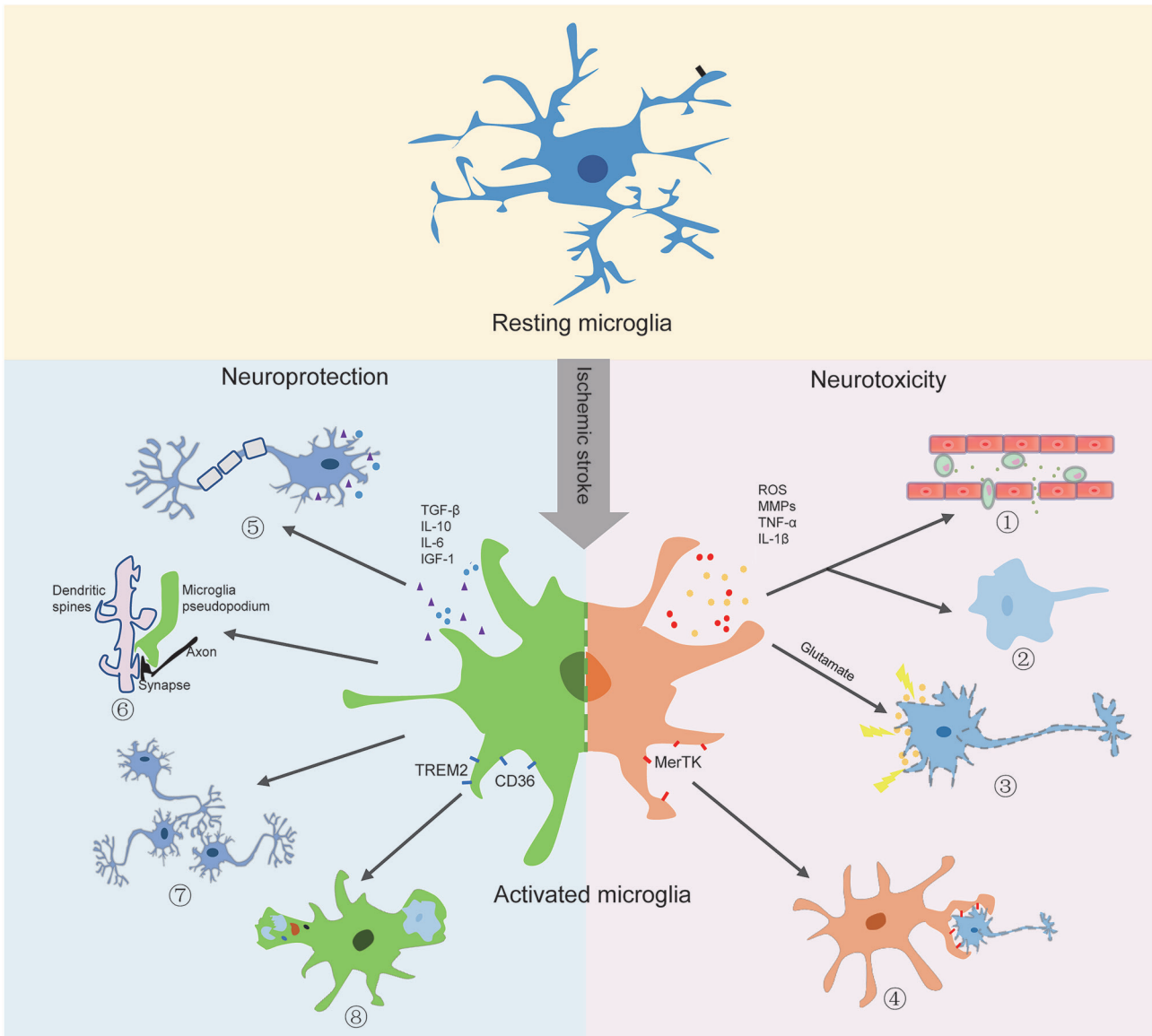


图 1. 小胶质细胞在缺血性脑卒中中发挥的神经保护和损伤作用

Fig. 1. Neurotoxic and neuroprotective effects of microglia in ischemic stroke. In ischemic stroke, resting microglia are activated and display prominent changes in morphology related to various functional states. Subsequently, microglia contribute to neurotoxicity and neuroprotection. (1) Activated microglia can exacerbate BBB disruption ① and neural death ② via releasing multiple pro-inflammatory mediators including ROS, MMPs, TNF- α and IL-1 β ; Excitotoxicity can be caused by excessive release of glutamate ③; In addition, microglia excessively phagocytose mildly damaged neurons leading to delayed neuronal death ④. (2) Conversely, microglia are also associated with nerve repair and regeneration ⑤ through releasing anti-inflammatory or neurotrophic factors including TGF- β , IL-10, IL-6 and IGF-1; Microglia can promote synapse remodeling ⑥ and neuronal connectivity ⑦ by contacting neurons; Microglia can also phagocytose cellular or tissue debris ⑧, and resolute inflammation. BBB, blood brain barrier; ROS, reactive oxygen species; MMPs, matrix metalloproteins; TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL-1 β , interleukin 1 β ; TGF- β , transforming growth factor β ; IL-10, interleukin 10; IL-6, interleukin 6; IGF-1, insulin-like growth factor-1; MerTK, Mer tyrosine kinase; TREM2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

调控小胶质细胞亚群的具体机制以及其对脑卒中后疾病进程的影响也需要进一步的探索和研究。随着新技术的不断涌现以及研究的不断深入，我们有理

由相信在未来数年内选择性靶向和操纵这些免疫检查点的治疗药物将进入大家的视野，并为缺血性脑卒中的治疗提供新的选择。

参考文献

- Campbell BCV, Silva DAD, Macleod MR, Coutts SB, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 70.
- Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics* 2016; 13(4): 661–670.
- Kollikowski AM, Schuhmann MK, Nieswandt B, Mullges W, Stoll G, Pham M. Local leukocyte invasion during hyperacute human ischemic stroke. *Ann Neurol* 2020; 87(3): 466–479.
- Li Y (李莹), Du XF, Du JL. Physiological properties and functions of microglia. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2013; 65(5): 471–482 (in Chinese).
- Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2018; 21(10): 1359–1369.
- Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng YJ, Ghavampour S, Hannocks MJ, Prinz V, Dirnagl U, Endres M, Prinz M, Beschorner R, Harter PN, Mittelbronn M, Engelhardt B, Sorokin L. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 2013; 125(3): 395–412.
- Kohler E, Prentice David A, Bates Timothy R, Hankey Graeme J, Claxton A, van Heerden J, Blacker D. Intravenous minocycline in acute stroke. *Stroke* 2013; 44(9): 2493–2499.
- Malhotra K, Chang JJ, Khunger A, Blacker D, Switzer JA, Goyal N, Hernandez AV, Pasupuleti V, Alexandrov AV, Tsvigoulis G. Minocycline for acute stroke treatment: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Neurol* 2018; 265(8): 1871–1879.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17(7): 796–808.
- Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(3): 177–192.
- Savio LEB, de Andrade Mello P, da Silva CG, Coutinho-Silva R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Front Pharmacol* 2018; 9: 52.
- Fan Y, Xie L, Chung CY. Signaling pathways controlling microglia chemotaxis. *Mol Cells* 2017; 40(3): 163–168.
- Neher JJ, Neniskyte U, Hornik T, Brown GC. Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia *in vitro* and *in vivo*. *Glia* 2014; 62(9): 1463–1475.
- Webster CM, Hokari M, McManus A, Tang XN, Ma H, Kacimi R, Yenari MA. Microglial P2Y12 deficiency/inhibition protects against brain ischemia. *PLoS One* 2013; 8(8): e70927.
- Tajalli-Nezhad S, Karimian M, Beyer C, Atlasi MA, Azami Tameh A. The regulatory role of Toll-like receptors after ischemic stroke: neurosteroids as TLR modulators with the focus on TLR2/4. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(3): 523–537.
- Zhang Z, Qin P, Deng Y, Ma Z, Guo H, Guo H, Hou Y, Wang S, Zou W, Sun Y, Ma Y, Hou W. The novel estrogenic receptor GPR30 alleviates ischemic injury by inhibiting TLR4-mediated microglial inflammation. *J Neuroinflammation* 2018; 15(1): 206.
- Nishibori M, Mori S, Takahashi HK. Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases. *J Pharmacol Sci* 2019; 140(1): 94–101.
- Gong T, Jiang W, Zhou R. Control of inflammasome activation by phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 2018; 43(9): 685–699.
- Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34(4): 660–667.
- Dong XQ (董晓庆), Deng YP, Zhang JP, Shao BP. Role of inflammasome activation in brain neurovascular diseases. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)* 2020; 36(01): 108–112 (in Chinese).
- Suzuki Y, Nakano Y, Mishihiro K, Takagi T, Tsuruma K, Nakamura M, Yoshimura S, Shimazawa M, Hara H. Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke. *Sci Rep* 2013; 3: 3177.
- Cui S, Yu Q, Chu L, Cui Y, Ding M, Wang Q, Wang H, Chen Y, Liu X, Wang C. Nuclear cGAS functions non-canonically to enhance antiviral immunity via recruiting methyltransferase Prmt5. *Cell Rep* 2020; 33(10): 108490.
- Li Q, Cao Y, Dang C, Han B, Han R, Ma H, Hao J, Wang L. Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke. *EMBO Mol Med* 2020; 12(4): e11002.
- Liu H, Leak RK, Hu X. Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke Vasc Neurol* 2016; 1(2): 52–58.
- He HY, Ren L, Guo T, Deng YH. Neuronal autophagy aggravates microglial inflammatory injury by downregulating CX3CL1/fractalkine after ischemic stroke. *Neural Regen Res* 2019; 14(2): 280–288.
- Yang Y, Zhang XJ, Zhang C, Chen R, Li L, He J, Xie Y, Chen Y. Loss of neuronal CD200 contributed to microglial activation after acute cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 2018; 678: 48–54.
- Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2017; 157: 247–272.
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development,

- maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 2013; 19(12): 1584–1596.
- 29 Kleinschnitz C, Grund H, Winkler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N, Schmidt HH. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 2010; 8(9): e1000479.
- 30 Zhong C, Yang J, Xu T, Xu T, Peng Y, Wang A, Wang J, Peng H, Li Q, Ju Z, Geng D, Zhang Y, He J; CATIS Investigators. Serum matrix metalloproteinase-9 levels and prognosis of acute ischemic stroke. *Neurology* 2017; 89(8): 805–812.
- 31 Chen H, Guan B, Chen X, Chen X, Li C, Qiu J, Yang D, Liu KJ, Qi S, Shen J. Baicalin attenuates blood-brain barrier disruption and hemorrhagic transformation and improves neurological outcome in ischemic stroke rats with delayed t-PA treatment: involvement of ONOO⁻-MMP-9 pathway. *Transl Stroke Res* 2018; 9(5): 515–529.
- 32 Chen AQ, Fang Z, Chen XL, Yang S, Zhou YF, Mao L, Xia YP, Jin HJ, Li YN, You MF, Wang XX, Lei H, He QW, Hu B. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death Dis* 2019; 10(7): 487.
- 33 Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology* 2012; 19(1): 13–20.
- 34 Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung SK, Liu KJ, Shen J. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 2012; 120(1): 147–156.
- 35 Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 861231.
- 36 Socodato R, Portugal CC, Canedo T, Rodrigues A, Almeida TO, Henriques JF, Vaz SH, Magalhaes J, Silva CM, Baptista FI, Alves RL, Coelho-Santos V, Silva AP, Paes-de-Carvalho R, Magalhaes A, Brakebusch C, Sebastiao AM, Summavielle T, Ambrosio AF, Relvas JB. Microglia dysfunction caused by the loss of Rhoa disrupts neuronal physiology and leads to neurodegeneration. *Cell Rep* 2020; 31(12): 107796.
- 37 Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140(6): 871–882.
- 38 Ito M, Komai K, Mise-Omata S, Iizuka-Koga M, Noguchi Y, Kondo T, Sakai R, Matsuo K, Nakayama T, Yoshie O, Nakatsukasa H, Chikuma S, Shichita T, Yoshimura A. Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* 2019; 565(7738): 246–250.
- 39 Li S, Gu X, Yi S. The Regulatory effects of transforming growth factor-beta on nerve regeneration. *Cell Transplant* 2017; 26(3): 381–394.
- 40 Chen H, Lin W, Zhang Y, Lin L, Chen J, Zeng Y, Zheng M, Zhuang Z, Du H, Chen R, Liu N. IL-10 promotes neurite outgrowth and synapse formation in cultured cortical neurons after the oxygen-glucose deprivation via JAK1/STAT3 pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 30459.
- 41 Willis EF, MacDonald KPA, Nguyen QH, Garrido AL, Gillespie ER, Harley SBR, Bartlett PF, Schroder WA, Yates AG, Anthony DC, Rose-John S, Ruitenber MJ, Vukovic J. Repopulating microglia promote brain repair in an IL-6-dependent manner. *Cell* 2020; 180(5): 833–846.e16.
- 42 Fang CY (房昌运), WU XS, Zhang H, GU YL, Wang SB, Ren HW, Chen K, Zhang H, Cheng BH, Gao Y. Research advances in endogenous neural stem cells promoting neural repair after ischemic stroke. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2019; 71(3): 454–462 (in Chinese).
- 43 Ballesteros I, Cuartero MI, Pradillo JM, de la Parra J, Perez-Ruiz A, Corbi A, Ricote M, Hamilton JA, Sobrado M, Vivancos J, Nombela F, Lizasoain I, Moro MA. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPAR γ and 5-LO-dependent pathways. *J Leukoc Biol* 2014; 95(4): 587–598.
- 44 Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, Nakamura MC, Yenari MA. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci* 2015; 35(8): 3384–3396.
- 45 Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat Med* 2017; 23(6): 723–732.
- 46 Cai W, Dai X, Chen J, Zhao J, Xu M, Zhang L, Yang B, Zhang W, Rocha M, Nakao T, Kofler J, Shi Y, Stetler RA, Hu X, Chen J. STAT6/Arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *JCI Insight* 2019; 4(20): e131355.
- 47 Cui X, Chopp M, Zacharek A, Cui Y, Roberts C, Chen J. The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice. *Stroke* 2013; 44(1): 153–161.
- 48 Cui X, Chopp M, Zhang Z, Li R, Zacharek A, Landschoot-Ward J, Venkat P, Chen J. ABCA1/ApoE/HDL pathway mediates GW3965-induced neurorestoration after stroke. *Stroke* 2017; 48(2): 459–467.

- 49 Kim E, Woo MS, Qin L, Ma T, Beltran CD, Bao Y, Bailey JA, Corbett D, Ratan RR, Lahiri DK, Cho S. Daidzein augments cholesterol homeostasis via ApoE to promote functional recovery in chronic stroke. *J Neurosci* 2015; 35(45): 15113–15126.
- 50 Ting SM, Zhao X, Sun G, Obertas L, Ricote M, Aronowski J. Brain cleanup as a potential target for poststroke recovery: the role of RXR (Retinoic X Receptor) in phagocytes. *Stroke* 2020; 51(3): 958–966.
- 51 Szalay G, Martinecz B, Lenart N, Kornyei Z, Orsolits B, Judak L, Csaszar E, Fekete R, West BL, Katona G, Rozsa B, Denes A. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 2016; 7: 11499.
- 52 Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009; 29(13): 3974–3980.
- 53 Norris GT, Smirnov I, Filiano AJ, Shadowen HM, Cody KR, Thompson JA, Harris TH, Gaultier A, Overall CC, Kipnis J. Neuronal integrity and complement control synaptic material clearance by microglia after CNS injury. *J Exp Med* 2018; 215(7): 1789–1801.
- 54 Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, Raggioli A, Schertel A, Schwab Y, Gross CT. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1228.
- 55 Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, Kelley KW, Miller JG, Chien EC, Liddelow SA, Nguyen PT, Nakao-Inoue H, Dorman LC, Akil O, Joshita S, Barres BA, Paz JT, Molofsky AB, Molofsky AV. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science* 2018; 359(6381): 1269–1273.
- 56 Nguyen PT, Dorman LC, Pan S, Vainchtein ID, Han RT, Nakao-Inoue H, Taloma SE, Barron JJ, Molofsky AB, Kheirbek MA, Molofsky AV. Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell* 2020; 182(2): 388–403.e15.
- 57 Neher JJ, Emmrich JV, Fricker M, Mander PK, Thery C, Brown GC. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(43): E4098–E4107.
- 58 Alawieh A, Langley EF, Tomlinson S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice. *Sci Transl Med* 2018; 10(441): eaao6459.
- 59 Cserep C, Posfai B, Lenart N, Fekete R, Laszlo ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnar G, Heindl S, Schwarcz AD, Ujvari K, Kornyei Z, Toth K, Szabadits E, Sperlagh B, Baranyi M, Csiba L, Hortobagyi T, Magloczky Z, Martinecz B, Szabo G, Erdelyi F, Szipocs R, Tamkun MM, Gesierich B, Duering M, Katona I, Liesz A, Tamas G, Denes A. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* 2020; 367(6477): 528–537.
- 60 Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, Chen X, Nair A, Ikegami A, Hwang P, Chan AT, Graves SM, Uweru JO, Ledderose C, Kutlu MG, Wheeler MA, Kahan A, Ishikawa M, Wang YC, Loh YE, Jiang JX, Surmeier DJ, Robson SC, Junger WG, Sebra R, Calipari ES, Kenny PJ, Eyo UB, Colonna M, Quintana FJ, Wake H, Gradinaru V, Schaefer A. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* 2020; 586(7829): 417–423.
- 61 Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2012; 43(11): 3063–3070.
- 62 James SK, Storey RF, Khurmi NS, Husted S, Keltai M, Mahaffey KW, Maya J, Morais J, Lopes RD, Nicolau JC, Pais P, Raev D, Lopez-Sendon JL, Stevens SR, Becker RC; PLATO Study Group. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and a history of stroke or transient ischemic attack. *Circulation* 2012; 125(23): 2914–2921.
- 63 Grotta JC. Antiplatelet therapy after ischemic stroke or TIA. *N Engl J Med* 2018; 379(3): 291–292.
- 64 Sipe GO, Lowery RL, Tremblay ME, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK. Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun* 2016; 7: 10905.
- 65 Hua F, Tang H, Wang J, Prunty MC, Hua X, Sayeed I, Stein DG. TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35(4): 536–542.
- 66 Abdul Y, Abdelsaid M, Li W, Webb RC, Sullivan JC, Dong G, Ergul A. Inhibition of Toll-like receptor-4 (TLR-4) improves neurobehavioral outcomes after acute ischemic stroke in diabetic rats: possible role of vascular endothelial TLR-4. *Mol Neurobiol* 2019; 56(3): 1607–1617.
- 67 Song W, Wang T, Shi B, Wu Z, Wang W, Yang Y. Neuroprotective effects of microRNA-140-5p on ischemic stroke in mice via regulation of the TLR4/NF- κ B axis. *Brain Res Bull* 2021; 168: 8–16.
- 68 Wang J, He X, Meng H, Li Y, Dmitriev P, Tian F, Page JC, Lu QR, He Z. Robust myelination of regenerated axons induced by combined manipulations of GPR17 and microglia. *Neuron* 2020; 108(5): 876–886.e4.
- 69 Lloyd AF, Davies CL, Holloway RK, Labrak Y, Ireland G,

- Carradori D, Dillenburg A, Borger E, Soong D, Richardson JC, Kuhlmann T, Williams A, Pollard JW, des Rieux A, Priller J, Miron VE. Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation. *Nat Neurosci* 2019; 22(7): 1046–1052.
- 70 Tian DC, Shi K, Zhu Z, Yao J, Yang X, Su L, Zhang S, Zhang M, Gonzales RJ, Liu Q, Huang D, Waters MF, Sheth KN, Ducruet AF, Fu Y, Lou M, Shi FD. Fingolimod enhances the efficacy of delayed alteplase administration in acute ischemic stroke by promoting anterograde reperfusion and retrograde collateral flow. *Ann Neurol* 2018; 84(5): 717–728.
- 71 Qin C, Fan WH, Liu Q, Shang K, Murugan M, Wu LJ, Wang W, Tian DS. Fingolimod protects against ischemic white matter damage by modulating microglia toward M2 polarization via STAT3 pathway. *Stroke* 2017; 48(12): 3336–3346.
- 72 Murata Y, Fujiwara N, Seo JH, Yan F, Liu X, Terasaki Y, Luo Y, Arai K, Ji X, Lo EH. Delayed inhibition of c-Jun N-terminal kinase worsens outcomes after focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2012; 32(24): 8112–8115.