

NETs 及 Cdc42 在缺血性脑卒中神经损伤中的作用

覃秋燕, 曹小丽

摘要 缺血性脑卒中(IS)发生后,中性粒细胞聚集释放形成的外诱捕网(NETs)通过多种炎症机制参与神经损伤的过程。细胞分裂周期蛋白42(Cdc42)是一种小GTP酶,在细胞的生长、黏附、增殖及迁移中发挥重要作用,与脑卒中、癫痫等神经系统疾病的发病有关,Cdc42可能通过诱导神经炎症反应尤其是调节中性粒细胞的功能介导IS引起的损伤。Cdc42和NETs都通过炎症作用影响IS的发生发展,本文综述了二者在IS中的作用途径及相互变化关系。

关键词 缺血性脑卒中;中性粒细胞胞外诱捕网;NETs;Cdc42;中性粒细胞

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210203

本文引用格式:覃秋燕,曹小丽. NETs 及 Cdc42 在缺血性脑卒中神经损伤中的作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2022, 17(3): 145-147.

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是人群死亡及残疾的主要原因之一,发病机制复杂。研究表明,脑缺血损伤后中性粒细胞会迅速迁移至梗死核心部位,并释放形成中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),通过参与内源性和外源性凝血机制、卒中后免疫抑制、继发微小血栓形成等机制加重脑损伤,而中性粒细胞本身具有N1和N2两种表型,其中N1表型可加重脑损伤,N2表型对脑卒中起保护作用^[1,2]。已知缺血性脑卒中还与细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle protein 42, Cdc42)表达下降有关,Cdc42作为重要的免疫调节分子,不仅可激活和促进神经干/祖细胞迁移,促进脑损伤的修复;也可以调节中性粒细胞的迁移,甚至诱导其极化表型的转化。目前尚未有研究表明Cdc42和NETs在IS发生后的作用关系及机制,本文综述了缺血性脑卒中后Cdc42蛋白水平及NETs的变化及二者的关系,试图为IS的发病机制和治疗提供新思路。

1 中性粒细胞、NETs 与缺血性脑卒中

IS早期,外周免疫系统炎症细胞因子、趋化因子广泛激活,引起中性粒细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞浸润,加重脑损伤^[3]。Neumann等^[4]使用活体双光子显微镜记录小鼠卒中模型,发现中性粒细胞在局灶性缺血3h后开始向脑实质浸润,在24~48h达到峰值;脑实质内靠近缺血核心的区域,可见浸润的中性粒细胞通过血管缓慢滚动、粘附、外渗及主动迁移,而在离缺血中心较远的脑实质未能观察到中性粒细胞;同时发现浸润的中性粒细胞引起局部小胶质细胞相互合作,形成扁平网状的膜突起,阻止中性粒细胞进一步浸润。在小鼠大脑中动脉永久性闭塞模型中,梗死脑组织周边区域小胶质细胞丰富,体外延时共聚焦显微镜可观察到小胶质细胞对中性粒细胞的吞噬作用^[5]。研究发现,中性粒细胞可分化出N1和N2表型,缺血核心区的小胶质细

胞/巨噬细胞优先吞噬N2表型中性粒细胞,加快清除炎症组织中碎片,有利于脑卒中后神经炎症的缓解,而N1极化加重了葡萄糖氧剥夺模型(oxygen-glucose deprivation, OGD)神经元的死亡^[2,6]。说明缺血脑损伤导致中性粒细胞广泛参与神经炎症发生并发挥重要作用,其中N1表型可加重脑损伤,N2表型对脑卒中起保护作用。

NETs是中性粒细胞释放的细胞外纤维网状结构,由DNA、组蛋白和中性粒细胞颗粒蛋白,包括弹性蛋白酶、组织蛋白酶G和髓过氧化物酶等组成;其功能是在细胞外解离和杀死病原体。NETs相关研究涉及感染、自身免疫、血栓疾病、癌症、血管重建等^[7,8]。体外实验证实NETs会加重缺血神经元损伤,并可作为IS早期诊断的循环标志物,与健康人相比,急性缺血性卒中患者的NETs显著升高^[2,9,10]。多项研究表明NETs在IS的病理生理过程中存在多个干预靶点,与NETs形成机制和组成成分相关。瓜氨酸化组蛋白H3(H3Cit)和细胞外DNA是NETs形成的标志物,Laridan等^[11]对68例接受血管内治疗的缺血性卒中患者的血栓进行免疫染色,发现均能检测到中性粒细胞,H3Cit阳性面积约占血栓总面积的13.45%,同时H3Cit与中性粒细胞释放的细胞外DNA共定位也证实NETs的存在。临床上发现体外组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, t-PA)治疗联合DNaseI的血栓溶解效果优于单用t-PA,推测因为DNaseI破坏NETs的DNA结构,改善了“t-PA抵抗”^[12]。有临床研究表明急性脑梗死患者取栓组血管再通率高于使用rt-PA溶栓组^[13]，“t-PA”抵抗可能是静脉溶栓效果欠佳的原因之一。另一项对急性缺血性卒中患者血栓进行的组织学分析也证实NETs位于血栓的外层,可作为细胞和多种凝血因子的支架,刺激纤维蛋白沉积;另外,通过PicoGreen® dsDNA定量分析和ELISA检测发现血管病患者支架植入后外周血H3Cit和细胞游离DNA增高^[14]。肽基氨基酸脱

作者单位

广西医科大学第一附属医院神经内科
南宁 530021

基金项目

国家自然科学基金地区基金项目(NO. 81760218);
广西青年基金项目
(No. 2017GXNSF
BA198067)

收稿日期

2020-09-27

曹小丽

maten79@126.com

氨酶 4(peptidylarginine deiminases 4, PAD4)是 NETs 形成所必需的酶,介导了组蛋白瓜氨酸化及染色质解聚的过程。研究发现,卒中后缺血皮质中 PAD4 的过度表达导致 NETs 增加,伴随着新生血管的减少和血脑屏障损伤的增加,应用药物抑制 PAD 活性或使得中性粒细胞耗竭则可促进血管修复,并增加新生血管,促进神经功能恢复^[8],反之 PAD4 缺乏致 NETs 活性降低,卒中后缺血性损伤较轻,说明若能抑制 NETs 形成,可能有利于缺血后神经细胞的修复。

有研究发现神经细胞缺血使中性粒细胞远离 N2 表型,并促进了 NETs 的形成^[2]。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, atRA)引导中性粒细胞向 N2 表型分化,减少了脑卒中损伤组织中 NETs 的形成^[15]。体外研究证实 N2 中性粒细胞对氧糖剥夺/再氧合(OGD/R)诱导的原发性皮质神经元损伤具有保护作用^[1],而且 N2 表型与 NETs 的形成有相关性,说明支持中性粒细胞向 N2 表型分化,NETs 形成减少,有利于脑损伤修复。

2 Cdc42 与神经细胞迁移和神经细胞损伤

Cdc42 是一种鸟嘌呤三核苷酸(guanosine triphosphate, GTP)酶,属于 RhoGTPase 家族成员,可作为分子“开关”在细胞迁移中行使重要调节功能;Cdc42 在位于细胞运动前缘的区域被激活,可引起微管和微丝等细胞骨架的极性分布,约束细胞爬行的方向,严格且动态地控制处于活性状态的 Cdc42 的含量和分布,细胞才能实现正常迁移。

Cdc42 参与调控神经细胞的生长及迁移过程。在神经细胞发育过程中,轴突由细胞体向外延伸,与其他细胞形成突触联系主要依赖于其前部的生长锥,生长锥由丝足网连接的丝状足组成,已知 Cdc42 缺失的神经细胞丝状足的数量减少且生长缓慢,在轴突生长中存在缺陷,表明 Cdc42 参与调节轴突的生长和延伸并起促进作用。对小鼠小脑颗粒细胞前体进行的 Cdc42 条件性缺失实验,发现 Cdc42 信号通路是小脑发育过程中小脑颗粒细胞前体极性和神经元-胶质连接形成的关键调控因子^[16]。研究表明,抗坏血酸通过其受体维生素 C 协同转运蛋白 2(sodium-vitamin C cotransporter 2, SVCT2)调节内源性神经干/祖细胞(endogenous neural stem/progenitor cell, eNSC/eNPC)的激活;SVCT2 主要表达于神经系统,在脑室下区内外部的 eNSC/eNPC 中均有表达,在实验环境下激活脑室下区和齿状回的 eNSC/eNPC 有利于短期和长期受损脑组织的恢复。添加 Cdc42 选择性抑制剂的脑室下区 eNSC/eNPC 迁移细胞数和生长距离明显缩短,F-肌动蛋白的聚集率、一级突起和二级分枝的形成率也有所下降,SVCT2 过度表达并不能减轻这种抑制作用^[17];说明在体外 OGD 条件下,SVCT2 可能是通过激活 Cdc42,促进 F-肌动蛋白的聚集,从而影响 eNSC/eNPC 的迁移,促进神经元修复。

Cdc42 可作为缺血半暗带的潜在血清标志物^[18]。研究表明 IS 急性期患者外周血淋巴细胞中 Cdc42 阳性比率及 Cdc42 蛋白表达水平显著下降^[19]。缺血/再灌注显著改变 Cdc42 活性,酰基生长素释放肽在缺血再灌注损伤动物模型中和体外培养的中枢神经元中发挥神经保护作用,酰基生长素释放肽处理可以促进神经

轴突生长,减轻脑损伤,蛋白质组学证实促进神经突生长的过程由 Cdc42 介导^[20];而排斥引导分子 A(repulsive guidance molecule A, RGMa)通过 CDC-42/PAK-1 信号通路介导的血脑屏障破坏参与缺血再灌注损伤^[21]。Cdc42 介导缺血/再灌注神经损伤的修复过程,同时 Cdc42 是内皮细胞迁移和屏障功能的重要调节因子,通过炎症作用介导血管内皮细胞的修复过程^[22],并且调节中性粒细胞的迁移,所以 Cdc42 可能通过神经炎症介导缺血神经损伤的修复。

3 Cdc42 与 NETs 在 IS 发病机制中的协同作用

中性粒细胞在 IS 中聚集释放形成的 NETs 在无细菌性梗死组织中诱导神经炎症反应,加重组织损伤,中性粒细胞的迁移是聚集的关键;而 Cdc42 可通过改变中性粒细胞极化形态,调节其迁移及运动方向,通过介导 CD11b 信号调节中性粒细胞尾足来维持细胞的极性进而调节细胞定向迁移。Cdc42 是 Rho GTPase 家族成员之一,而 Rho GTPases 是调节细胞骨架动力学的关键因子,Rho 家族在细胞内形成蛋白质梯度,前部为较高的活性 Rac 和较低的活性 Rho 浓度,而后部以较高的活性 Rho 和较低的活性 Rac 浓度为特征;Rac 在肌动蛋白的前沿参与聚合反应,形成层状脂膜并控制粘附形成,Rho 促进肌动蛋白组织形成应力纤维,参与粘附装配和细胞后部的尾巴缩回^[23]。Cdc42 位于细胞前部,调节肌动蛋白和粘附的组织,即在细胞迁移过程中,局部 Cdc42 信号直接转向趋化剂,介导趋化调控行为^[24]。

另外,有研究表明抑制 Cdc42/Rac1 Rho GTPase 可抑制人类宿主防御肽 LL-37 介导的白细胞迁移,特别是单核细胞和中性粒细胞的迁移^[25]。LL-37 是具有免疫调节功能的 37 个氨基酸的阳离子肽,参与趋化因子的产生、白细胞的募集等促炎功能和其他抗炎反应;趋化因子通过调节 PI3K、Ras、Rac、Cdc42、RhoA 和其他信号控制肌动蛋白的活动;而 Cdc42/Rho GTPase 选择性地控制宿主防御肽 LL-37 介导的趋化特性^[25],说明在促炎反应中 Cdc42 即受趋化因子调节,也能反馈调节趋化因子及中性粒细胞的募集,影响 NETs 的形成。

缺血发生后会产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),进一步诱发炎症反应及神经元凋亡^[26],ROS 在 NETs 形成过程中起重要作用,ROS 可以激活染色质缩聚,调控下游 PAD4 的过表达,诱导 NETs 形成的增加并提高 NETs 结构的稳定性和完整性^[27]。体外实验证实 Cdc42 是 GPCR 激动剂(fMLP 和 C5a)诱导的原代人中性粒细胞活化、脱颗粒和 ROS 形成的负调节因子,具有刺激依赖性^[28];其次,F-肌动蛋白的分解是细胞膜破裂和细胞外 DNA 释放的关键^[29],而 Cdc42 通过调节效应蛋白,可调节 F-肌动蛋白细胞骨架的极性,这与 NETs 的形成密切相关。最近 Tackenberg 等^[30]通过 Sytox-green 动力学分析 Cdc42 的活性对原代人中性粒细胞 NETs 形成的作用,发现佛波酯(phorbol ester, PMA)和 Cdc42 抑制剂(casin)处理均显著诱导 NETs 的形成,并且中性粒细胞与 PMA 和 casin 共同孵育可增加 NETs 形成;该实验使用 Cdc42 的药理抑制剂和遗传模型,证明 Cdc42 抑制通过 NADPH 氧化酶非依赖性途径诱导 NETs 形成,

Cdc42的抑制通过PKC、SK通道和线粒体活性增加了NETs的形成;支持Cdc42是原代人中性粒细胞NETs形成的负调节因子。

上述研究表明,Cdc42可抑制NETs的形成。鉴于NETs形成与中性粒细胞N2表型的相关性,笔者推测Cdc42对缺血脑损伤的保护作用与其诱导中性粒细胞向N2表型转化有关。

4 小结与展望

神经炎症是IS的重要研究靶点。目前已证明Cdc42对IS起保护作用,而促进中性粒细胞N2极化及减少NETs形成有利于加快清除炎症碎片,减轻神经损伤。部分研究支持Cdc42可抑制NETs形成的关键环节,所以笔者猜测Cdc42对IS起保护作用与抑制NETs的形成并影响中性粒细胞极化表型相关,但目前分子机制仍不清楚。这对研究Cdc42及中性粒细胞二者的关系至关重要,可能成为IS新的研究方向。

参考文献

- [1] Hou Y, Yang D, Xiang R, et al. N2 neutrophils may participate in spontaneous recovery after transient cerebral ischemia by inhibiting ischemic neuron injury in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77: 105970.
- [2] Cai W, Liu S, Hu M, et al. Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11: 108-121.
- [3] Kim E, Cho S. CNS and peripheral immunity in cerebral ischemia: partition and interaction[J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113508.
- [4] Neumann J, Riek-Burchardt M, Herz J, et al. Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129: 259-277.
- [5] Otxoa-de-Amezaga A, Miró-Mur F, Pedragosa J, et al. Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation[J]. *Acta Neuropathologica*, 2019, 137: 321-341.
- [6] Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, et al. N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPAR γ Agonist Rosiglitazone[J]. *Stroke*, 2013, 44: 3498-3508.
- [7] Bonaventura A, Liberale L, Carbone F, et al. The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases[J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118: 6-27.
- [8] Kang L, Yu H, Yang X, et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2488.
- [9] Lim HH, Jeong IH, An GD, et al. Evaluation of neutrophil extracellular traps as the circulating marker for patients with acute coronary syndrome and acute ischemic stroke[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34: e23190.
- [10] Vallés J, Lago A, Santos MT, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117: 1919.
- [11] Laridan E, Denorme F, Desender L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi[J]. *Ann Neurol*, 2017, 82: 223-232.

- [12] Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke[J]. *Stroke*, 2018, 49: 754-757.
- [13] 陆小波, 肖国栋, 肖章红, 等. 神经介入取栓术治疗脑梗死的疗效研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14: 523-524.
- [14] Demyanets S, Stojkovic S, Mauracher LM, et al. Surrogate Markers of Neutrophil Extracellular Trap Formation are Associated with Ischemic Outcomes and Platelet Activation after Peripheral Angioplasty and Stenting[J]. *J Clin Med*, 2020, 9: 304.
- [15] Cai W, Wang J, Hu M, et al. All trans-retinoic acid protects against acute ischemic stroke by modulating neutrophil functions through STAT1 signaling[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16: 175.
- [16] Govek EE, Wu Z, Acehan D, et al. Cdc42 Regulates Neuronal Polarity during Cerebellar Axon Formation and Glial-Guided Migration[J]. *Science*, 2018, 1: 35-48.
- [17] Yang Y, Zhang K, Chen X, et al. SVCT2 Promotes Neural Stem/Progenitor Cells Migration Through Activating CDC42 After Ischemic Stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 429.
- [18] Pang XM, Zhou X, Su SY, et al. Identification of Serum Biomarkers for Ischemic Penumbral by iTRAQ - Based Quantitative Proteomics Analysis[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2019, 13: e1900009.
- [19] Mo XY, Li T, Hu ZP. Decreased levels of cell-division cycle 42 (Cdc42) protein in peripheral lymphocytes from ischaemic stroke patients are associated with Golgi apparatus function[J]. *J Int Med Res*, 2013, 41: 642-653.
- [20] Liu J, Chen M, Dong R, et al. Ghrelin Promotes Cortical Neurites Growth in Late Stage After Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Injury[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 68: 29-37.
- [21] Li M, Wen Y, Zhang R, et al. Adenoviral vector-induced silencing of RGMa attenuates blood-brain barrier dysfunction in a rat model of MCAO/reperfusion[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 142: 54-62.
- [22] Flentje A, Kalsi R, Monahan TS. Small GTPases and Their Role in Vascular Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 917.
- [23] Lyda JK, Tan ZL, Rajah A, et al. Rac activation is key to cell motility and directionality: An experimental and modelling investigation[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 1436-1452.
- [24] Yang HW, Collins SR, Meyer T. Locally excitable Cdc42 signals steer cells during chemotaxis[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 191-201.
- [25] Hemshekhar M, Choi KG, Mookherjee N. Host Defense Peptide LL-37-Mediated Chemoattractant Properties, but Not Anti-Inflammatory Cytokine IL-1RA Production, Is Selectively Controlled by Cdc42 Rho GTPase via G Protein-Coupled Receptors and JNK Mitogen-Activated Protein Kinase[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1871.
- [26] Meschia JF, Brodt T. Ischaemic stroke[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25: 35-40.
- [27] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 134-147.
- [28] Tackenberg H, Möller S, Filippi MD, et al. The Small GTPase Cdc42 Is a Major Regulator of Neutrophil Effector Functions[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1197.
- [29] Thiam HR, Wong SL, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 31, 117: 7326-7337.
- [30] Tackenberg H, Möller S, Filippi MD, et al. The Small GTPase Cdc42 Negatively Regulates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps by Engaging Mitochondria[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 564720.

(本文编辑:王晶)