

缺血性卒中后小胶质细胞的异质性活化对脑内皮细胞的作用

许瑶,周罗绮,秦川,田代实,王伟

摘要 缺血性卒中是目前导致人类死亡的主要疾病之一。在卒中引起脑损伤的多种机制中,活化小胶质细胞介导的神经炎症反应至关重要。新兴的单细胞测序技术促进了对小胶质细胞异质性活化的认识。血脑屏障具有维持脑内环境稳态的关键作用,脑血管内皮细胞是血脑屏障的重要组成部分。研究发现血管相关的小胶质细胞可以直接接触脑血管内皮细胞,进而影响血脑屏障的通透性,参与调控生理和病理状态下的脑血流动力学,并促进血管内皮细胞的增殖和血管新生。进一步探索小胶质细胞的异质性活化对脑血管内皮细胞作用,有望为缺血性卒中研发新的治疗思路。

关键词 缺血性卒中;小胶质细胞;血管内皮细胞;血脑屏障

中图分类号 R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210910

本文引用格式:许瑶,周罗绮,秦川,田代实,王伟.缺血性卒中后小胶质细胞的异质性活化对脑内皮细胞的作用[J].神经损伤与功能重建,2022,17(10):591-592,616.

作者单位

华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科
武汉 430030

收稿日期

2021-12-17

通讯作者

王伟

wwang@vip.

126.com

卒中是目前导致人类死亡的主要疾病之一^[1],每年约795000人新发或复发卒中,其中87%的患者为缺血性卒中发作^[2]。小胶质细胞作为中枢神经系统(central nervous system, CNS)常驻巨噬细胞群中最丰富的一种^[3],是抵御CNS损害的第一道防线^[4]。研究表明,小胶质细胞在缺血性卒中疾病进程中持续处于增殖、活化状态,对小胶质细胞表型异质性的探索成为研究热点。以单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)为代表的高新技术不断发展,促进了在单细胞水平上对小胶质细胞异质性的认知和理解^[5]。小胶质细胞、脑内皮细胞和周细胞、星形胶质细胞、神经元突起、基底膜共同构成神经血管单元(neurovascular unit, NVU)^[6],脑血管内皮细胞是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的重要组成部分,NVU各组分之间的相互作用对于BBB完整性的破坏、脑损伤的发生与修复密切相关。近年来,小胶质细胞的异质性活化在缺血性脑卒中后微环境中发挥的作用逐渐引起重视。本文旨在综述缺血性卒中时异质性活化的小胶质细胞对脑内皮细胞的作用。

1 缺血性卒中时小胶质细胞发生异质性活化

作为CNS的监测者与防御屏障,根据小胶质细胞的促炎或抗炎等细胞因子的表达水平,曾将生理情况下处于静息状态的小胶质细胞定义为M0型,将疾病状态下活化的小胶质细胞定义为具有相对异质性的两种表型:释放促炎介质TNF α 、IL-6等的M1型,和释放抗炎、促血管生成因子IL4、TGF β 等的M2型^[7]。随着以scRNA-seq为代表的单细胞测序技术在神经系统疾病的广泛应用,发现传统的M1型和M2型小胶质细胞的分型标准并不能阐明活化小胶质细胞的异质性,许多转录水平的标记物通过单

胞测序被发现并用于小胶质细胞亚群的定义^[8]。

研究发现,清除阿尔兹海默症模型小鼠的脑小胶质细胞,会增加病灶内的微出血和 β 淀粉样蛋白在血管壁上的沉积^[13],提示小胶质细胞可能参与调控血管内皮细胞的功能。于是,基于小胶质细胞与血管内皮细胞的位置关系,血管相关小胶质细胞(vessel-associated microglia, VAM)这一概念也被提出。Koizumi等^[11]通过体内双光子成像技术,证实了一类与脑微血管稳定作用的分支状髓系细胞正是高表达Iba1和Cx3cr1的小胶质细胞。这群小胶质细胞与位于胶质界膜外血管周围间隙的血管旁巨噬细胞不同,它们存在于脑实质中,高度富集于脉管系统并与脑微血管并列,主要通过胞体与血管内皮细胞产生稳定的作用。Császár等^[12]发现VAM的突起可以穿透NVU的星形胶质细胞终足进而与脑血管内皮细胞产生直接接触,还可以通过ATP-P2Y12R与脑内皮细胞产生直接联系来调控脑内皮细胞的线粒体功能。因此,缺血性卒中发生时BBB的破坏、脑损伤的发生、NVU的修复等过程都与小胶质细胞调控脑内皮细胞功能改变密切相关,体现了异质性活化的小胶质细胞中VAM这一亚群的重要地位。

2 VAM在缺血性卒中时影响BBB的通透性

BBB主要由脑内皮细胞通过紧密连接相关蛋白组成,而血管周小胶质细胞、脑内皮细胞和周细胞、星形胶质细胞、神经元突起、基底膜共同构成NVU^[6],在调节微血管通透性、离子梯度、物质运输和脑血流动力学方面发挥重要的生理作用^[9]。急性缺血性脑卒中后,血管内皮细胞功能受损,BBB通透性增加,活化的血管相关小胶质细胞具有吞噬清除受损的血管内皮细胞的能力^[10],从而影响BBB的结构与功能。小胶质细胞还可以在发生急性血管损伤时通过

延伸突起,堵塞血管渗漏从而恢复血管完整性^[14]。选择性消融VAM可以减轻BBB通透性的改变和脑损伤程度^[15]。此外,Kerkhofs等^[16]用CSF1R抑制剂PLX5622清除小胶质细胞后发现,VAM的减少阻止了BBB渗漏,改善了血管认知性障碍的预后。Haruwaka等^[15]以系统性红斑狼疮的小鼠疾病模型为研究对象,证实了在系统性炎症的条件下小胶质细胞和脑血管的共定位,进一步确定了VAM的存在。在炎症早期,小胶质细胞在血管内皮细胞分泌的趋化因子配体5(CCL5)的趋化作用下向血管周边迁移,VAM数量显著增加。活化的VAM在CCL5-CCR5通路的激活,高表达紧密连接蛋白Claudin5并过向基底膜伸出突起与脑内皮细胞直接接触从而增加BBB的完整性。注射CCR5抑制剂DAPTA将会延迟疾病早期小胶质细胞向血管迁移和CLAudin5的表达,导致VAM显著减少和BBB渗漏增加。随着炎症进展,小胶质细胞向更为活跃的形态学发生改变并逐渐转化为高表达CD68的吞噬表型,由于过度吞噬星形胶质细胞终足从而导致BBB通透性增加,加重了神经炎症水平。研究报道,活化的小胶质细胞还可能通过下调Claudin5、Occludin、ZO-1等紧密连接相关蛋白导致BBB受损。这些研究结果表明,VAM对于BBB通透性的改变具有双向作用。疾病早期VAM对于BBB具有保护作用;随着疾病进展,吞噬表型小胶质细胞的表达会导致BBB通透性的增加和脑损伤的产生。

3 小胶质细胞在缺血性卒中时参与调控脑血流

Bisht等^[17]使用体内双光子成像技术发现一类分枝状CX3CR1⁺小胶质细胞的胞体和脑毛细血管存在直接接触,PLX3397清除小胶质细胞后毛细血管直径发生增加,说明小胶质细胞参与调节血管结构。此外,小胶质细胞可以通过受嘌呤激活后由P2X1通道释放的P2Y12来调控血管功能,在生理状态下维持血管的舒缩反应性和脑血流动力学。Császár等^[12]在研究神经血管耦合机制的小鼠胡须刺激模型中,通过CSF1R抑制剂PLX5622消融小胶质细胞后发现小胶质细胞缺失导致对侧皮质脑血流反应性降低,抑制P2Y12R可以得到与之一致的结果。在吸入10% CO₂ 2 min后的血管舒张反应中,小动脉和微血管旁小胶质细胞形态发生明显改变、钙活动显著增强,小胶质细胞突起和血管周星形胶质细胞终足存在大量接触,脑内皮细胞、小胶质细胞生成不同嘌呤能产物,而小胶质细胞P2Y12R可以聚集在血管周释放的ATP。用PLX5622清除小胶质细胞后高碳酸血症引起的血管舒张显著减少,这说明小胶质细胞可以调节血管的舒缩反应^[12]。

此外,在颈总动脉闭塞低灌注模型中发现,病理状态下VAM活性显著增强,突起形态明显改变,清除VAM会影响脑血流恢复。从遗传学和药理学方面抑制P2Y12R时得到了一致的结果,这表明小胶质细胞P2Y12R参与了低灌注后脑血流的恢复过程^[12]。因此,小胶质细胞不仅在生理情况下可以和NVU的脑内皮细胞建立直接的嘌呤能接触,通过P2Y12R参与调节脑血管的结构与舒缩功能,还可能在脑血管疾病低灌注的病理状态下实现对脑血流的调控。

4 小胶质细胞促进缺血性卒中时内皮细胞增殖和血管新生

Zhao等^[18]通过药理学和遗传学的方法说明了小胶质细胞在生理情况下可以促进血管新生,并且在疾病状态下小胶质细胞的这种功能尤为突出。研究发现,缺血性卒中时血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)持续、显著上调,与邻近血管内皮细胞上的受体结合,引发血管生成反应^[19]。在卒中恢复期给予rhVEGF165可有效促进缺血半暗带的血管形成和神经修复^[20]。此外,有研究表明在缺血性卒中疾病模型的第7~14天,梗死边缘区基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase, MMP)-9的上调与神经元重塑、血管再生的标记物发生了共定位。如果在卒中后第7天抑制MMP-9的活性,第14天时观察到神经血管重塑不良、梗死灶增加^[21],并且MMP-13也有相似的双向作用^[22]。Giulian等^[23]认为小胶质细胞活化后大量释放的IL-1 β 可能在缺血性卒中的恢复期也发挥了促血管生成作用。此外,小胶质细胞所分泌的脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)等神经营养因子可以通过促进轴突重塑和神经修复,对神经周围血管的再生间接发挥积极作用^[24]。总之,在缺血性卒中发生时,抗炎表型的小胶质细胞会大量分泌VEGF、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、颗粒蛋白前体(progranulin)、MMP-9等具有血管重塑作用的分子,脑室内注射抗炎表型小胶质细胞也可以观察到这些物质的明显上调和显著的血管生成反应^[25]。

5 小结

小胶质细胞是缺血性卒中发生时抵御脑损伤的第一道防线。研究结果表明,CNS疾病早期小胶质细胞对于BBB具有保护作用。当疾病进展,吞噬表型小胶质细胞的产生会导致BBB通透性增加和脑损伤。血管相关的小胶质细胞还可以通过P2Y12R和脑内皮细胞建立直接接触从而参与疾病状态下血管的舒缩和脑血流的调控,提示通过调控小胶质细胞和脑内皮细胞相互作用所依赖的关键信号通路可以影响BBB通透性和缺血性卒中预后。随着在缺血性卒中发生时,异质性活化的VAM对脑血管内皮细胞作用的进一步研究,有望在疾病状态下对这群异质性活化的小胶质细胞实现靶向干预,为研发缺血性卒中的治疗开拓新思路。

参考文献

[1] Dal-Ré R. Worldwide clinical interventional studies on leading causes of death: a descriptive analysis[J]. Ann Epidemiol, 2011, 21: 727-731.
[2] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 137: e67-e492.
[3] Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 119-145.
[4] Hu XM, Liou AKF, Leak RK, et al. Neurobiology of microglial action in CNS injuries: Receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles[J]. Prog Neurobiol, 2014, 119-120: 60-84.
[5] Li QY, Cheng ZL, Zhou L, et al. Developmental Heterogeneity of

表3 卒中严重程度与血清 ox-LDL、Lp-PLA2水平的关系($\bar{x}\pm s$)

亚组组别	例数	ox-LDL/(mg/mL)	Lp-PLA2/(ng/mL)
中度卒中亚组	21	42.45±7.28	218.56±16.75
中重度卒中亚组	34	50.76±7.71 ^①	296.37±16.88 ^①
重度卒中亚组	8	63.49±8.41 ^{①②}	325.81±17.60 ^{①②}

注：与中度卒中亚组比较，^① $P<0.05$ ；与中重度卒中亚组比较，^② $P<0.05$

率、病情严重程度及预后的关系研究[D]. 河北北方学院, 2020.

[3] 许慎, 卢春燕, 王覃, 等. 住院骨质疏松症患者共病分析研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23: 2621-2630.

[4] Kucharska-Newton AM, Monda KL, Campaell S, et al. Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study[J]. Atherosclerosis, 2011, 216: 151-156.

[5] 余浩佳, 王赛男, 陈星弛, 等. HR-MRI 血管壁成像技术联合血清 ox-LDL、Lp-PLA2 水平对大脑中动脉粥样硬化性狭窄患者预后的评估价值[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29: 423-427.

[6] 张军, 卢祖能. 脑梗死患者血清 ox-LDL IL-18 Lp-PLA2 水平与颈动脉硬化斑块的相关性分析[J]. 河北医学, 2020, 26: 1-4.

[7] Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment[J]. Calcif Tissue Int, 2013, 93: 365-373.

[8] Koh JM, Lee YS, Kim YS, et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through

increased intracellular ROS generation[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21: 1003-1011.

[9] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国各类主要脑血管病诊断要点 2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52: 710-715.

[10] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10: 413-426.

[11] 洪卫军, 黄琴. 急性脑梗死患者血清 ox-LDL、Lp-PLA₂ 水平变化及临床意义[J]. 中国医药导报, 2019, 16: 72-75.

[12] 席海洋, 王君豪, 张凯, 等. 球囊扩张椎体后凸成形术治疗老年骨质疏松性椎体压缩性骨折合并急性或亚急性脑梗死患者的效果[J]. 河南医学研究, 2019, 28: 3475-3478.

[13] Lentz SR, Erger RA, Dadyal S, et al. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and Vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279: H970-H975.

[14] 牛利红. 强化抗骨质疏松方案治疗老年急性脑梗死偏瘫伴骨质疏松症的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25: 1458-1462.

[15] Warrington S, Nagakawa S, Hounslow N. Comparison of the pharmacokinetics of pitavastatin by formulation and ethnic group: an open-label, single-dose, two-way crossover pharmacokinetic study in healthy Caucasian and Japanese men[J]. Clin Drug Investig, 2011, 31: 735-743.

[16] 李思. 腔隙性脑梗死患者同型半胱氨酸、尿酸水平与骨质疏松症的相关性研究[D]. 青海大学, 2020.

[17] Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, et al. The role of homocysteine in bone remodeling[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51: 579-590.

(上接第 592 页)

Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing[J]. Neuron, 2019, 101: 207-223.

[6] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease[J]. Neuron, 2017, 96: 17-42.

[7] Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18: 2135.

[8] Rawlinson C, Jenkins S, Thei L, et al. Post-ischaemic immunological response in the brain: targeting microglia in ischaemic stroke therapy[J]. Brain Sci, 2020, 10: 159.

[9] Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke[J]. Neurobiol Dis, 2008, 32: 200-219.

[10] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo[J]. Science, 2005, 308: 1314-1318.

[11] Koizumi T, Kerkhofs D, Mizuno T, et al. Vessel-associated immune cells in cerebrovascular diseases: from perivascular macrophages to vessel-associated microglia[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1291.

[12] Császár E, Lénárt N, Cserép C, et al. Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions[J]. J Exp Med, 2022, 219: e20211071.

[13] Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model[J]. Nat Commun, 2019, 10: 3758.

[14] Lou N, Takano T, Pei Y, et al. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113: 1074-1079.

[15] Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation[J]. Nat Commun, 2019, 10: 5816.

[16] Kerkhofs D, van Hagen BT, Milanova IV, et al. Pharmacological depletion of microglia and perivascular macrophages prevents vascular cognitive impairment in ang II-induced hypertension[J]. Theranostics, 2020, 10: 9512-9527.

[17] Bisht K, Okojie KA, Sharma K, et al. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12: 5289.

[18] Zhao XL, Eyo UB, Murugan M, et al. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology[J]. Dev Neurobiol, 2018, 78: 604-617.

[19] Plate KH, Beck H, Danner S, et al. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999, 58: 654-666.

[20] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain[J]. J Clin Invest, 2000, 106: 829-838.

[21] Zhao BQ, Wang S, Kim HY, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke[J]. Nat Med, 2006, 12: 441-445.

[22] Ma F, Martínez-San Segundo P, Barceló V, et al. Matrix metalloproteinase-13 participates in neuroprotection and neurorepair after cerebral ischemia in mice[J]. Neurobiol Dis, 2016, 91: 236-246.

[23] Giulian D, Woodward J, Young D G, et al. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization[J]. J Neurosci, 1988, 8: 2485-2490.

[24] Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18: 2135.

[25] Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, et al. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42582.

(本文编辑:唐颖馨)