

- [25] Caplan R , Siddarth P , Bailey CE. Thought disorder: A developmental disability in pediatric epilepsy. *Epilepsy Behav* , 2006 , 8(4) : 726-735.
- [26] Camfield CS , Camfield PR. Long-term social outcomes for children with epilepsy. *Epilepsia* , 2007 , 48(Suppl 9) : 3-5.
- [27] Shinnar S , Pellock JM. Update on the epidemiology and prognosis of pediatric epilepsy. *J Child Neurol* , 2002 , 17(Suppl 1) : S4-S17.
- [28] Buelow JM , Perkins SM , Johnson CS , et al. Adaptive Functioning in Children With Epilepsy and Learning Problems. *Child Neurol* , 2012 , 27(10) : 1241-1249.
- [29] 童玉翠 ,周农. 癫痫对儿童学习障碍发生的影响. *国际神经病学神经外科学杂志* , 2011 , 38(3) : 230-232.
- [30] Guo WC , Wu JZ , Wang WZ , et al. The stigma of people with epilepsy is demonstrated at the internalized , interpersonal and institutional levels in a specific sociocultural context: Findings from an ethnographic study in rural China. *Epilepsy Behav* , 2012 , 25(2) : 282-288.
- [31] Leaffer EB , Hesdorffer DC , Begley C , et al. Psychosocial and sociodemographic associates of felt stigma in epilepsy. *Epilepsy Behav* , 2014 , 37(8) : 104-109.
- [32] Rood JE , Janet R , Schultz JR , et al. Examining perceived stigma of children with newly-diagnosed epilepsy and their caregivers over a two-year period. *Epilepsy Behav* , 2014 , 39(10) : 38-41.
- [33] Austin JK , MacLeod J , Dunn DW , et al. Measuring stigma in children with epilepsy and their parents: instrument development and testing. *Epilepsy Behav* , 2004 , 5(4) : 472-482.
- [34] Bautista RE , Shapovalov D , Saada F. The societal integration of individuals with epilepsy: Perspectives for the 21st century. *Epilepsy Behav* , 2014 , 35(7) : 42-49.
- [35] Chapieski L , Brewer V , Evankovich K , et al. Adaptive functioning in children with seizures: impact of maternal anxiety about epilepsy. *Epilepsy Behav* , 2005 , 7(2) : 246-252.
- [36] Bozkaya IO , Arhan E , Serdaroglu A , et al. Knowledge of , perception of , and attitudes toward epilepsy of schoolchildren in Ankara and the effect of an educational program. *Epilepsy Behav* , 2010 , 17(1) : 56-63.
- [37] Austin JK. Concerns & fears of children with seizures. *Clin Nurs Pract Epilepsy* , 1993 , 1(4) : 4-6.

巨噬细胞和缺血性脑卒中

朱锡群 易伟 熊晓星 综述 简志宏 审校
武汉大学附属人民医院神经外科 430060

摘要: 巨噬细胞在脑缺血损伤后引起的一系列反应中起着重要作用,缺血发生区域聚集的巨噬细胞有两种,一个是血液来源的巨噬细胞,另一类是脑内的小胶质细胞,这两种激活的巨噬细胞又可分为 M1、M2 型巨噬细胞。本文主要讨论不同种类的巨噬细胞对缺血性脑卒中的作用及治疗意义。

关键词: 巨噬细胞; 缺血性脑卒中; 炎症; 胶质细胞

脑卒中是危及人类健康的重要疾病,特别是老年人脑卒中的发病率、病死率及致残率高,且易复发,给社会及家庭带来沉重负担,全球每年约有五百万患者死于脑卒中。脑卒中包括缺血性脑卒中(脑梗死)和出血性脑卒中(脑出血),其中缺血性脑卒中发病率占 85% 左右。脑卒中后可导致继发性脑损伤并可导致多器官功能障碍,而炎症介质

失控性释放是导致这种改变的基础^[1]。脑缺血后,引起神经元坏死,释放炎症介质,进而诱导中枢胶质细胞激活及外周免疫细胞,包括血液来源的单核/巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等在缺血区域聚集并激活,从而介导脑组织炎症瀑布效应,加速和扩大或者延缓与减轻原有的缺血性脑损伤^[2]。在这些细胞中,巨噬细胞占有重要地位。卒中后浸

收稿日期: 2015-06-01; 修回日期: 2015-08-07

作者简介: 朱锡群(1991-) 男,在读硕士,主要从事脑血管病研究。

通讯作者: 简志宏(1970) 男,副教授,博士,主要从事颅底肿瘤脑血管疾病的研究。

润于缺血区的巨噬细胞有两种来源,即胚胎卵黄囊起源,血-脑脊液屏障形成之后留存并分布于脑组织,功能类似于巨噬细胞的小胶质细胞(microglia derived macrophages, MiDM)^[3]和骨髓前体细胞起源,循环于血液的外周单核巨噬细胞(monocytes derived macrophages, MoDM)^[4]。脑卒中后,外周单核细胞在细胞黏附分子及趋化因子作用下,通过血脑屏障募集进入脑缺血区。巨噬细胞在脑卒中后发生变化和作用较为复杂和重要,因此,本文就关于巨噬细胞的这一变化和作用做一综述。

1 激活的小胶质细胞与血源性巨噬细胞在损伤区域聚集的时间

在正常情况下,脑组织内的小胶质细胞与巨噬细胞是有形态学差异的^[5]。脑内的小胶质细胞与巨噬细胞可通过表达 CD45 程度的不同而区分:小胶质细胞是 CD11b⁺ 类细胞,同时表达中量的 CD45 (CD45^{int}),巨噬细胞虽亦是 CD11b⁺,但高表达 CD45 (CD45^{high})^[6],即通过 CD45^{inter}/CD11b⁺ 和 CD45^{high}/CD11b⁺ 标记,可区分鉴定 MiDM 和 MoDM。

然而,激活的小胶质细胞与血源性的巨噬细胞在形态和功能上是相似的^[6,7]。在脑组织内区别这两种细胞是困难的,因为这两种细胞间缺少一种明显不同的细胞标记物^[7,8]。不过,我们可以通过向大鼠骨髓注射绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记血液来源的巨噬细胞,以区别两者在缺血性脑卒中的所扮演的角色和作用^[8]。当前的大部分研究表明,血液来源的巨噬细胞大量聚集于脑组织的时间在卒中 3~7 d 后(在 3 天前聚集不明显)^[9]。Schilling 等^[9]指出,小胶质细胞的激活在巨噬细胞浸润至缺血区之前,在短暂性大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的大鼠模型上,相较于血源性巨噬细胞,脑内小胶质细胞的作用占主要地位。脑缺血后第一天,脑组织小胶质细胞(GFP-negative)已经迅速激活,甚至在缺血 4~7 d,仍可观察到大量 GFP-negative 巨噬细胞,表明它们是小胶质细胞。他们同时发现,在缺血损伤后第 2 天,缺血区很少能观察到血源性的巨噬细胞(GFP-positive),然而,在 MCAO 后第 7 天,这些细胞在缺血区浸润达到高峰,并在此之后逐渐减少。另有一些研究通过在短暂性 MCAO^[10]和永久性 MCAO^[11]的大鼠模型观察到,血源性的巨噬细胞(Iba1-positive)在脑缺血损伤后 24~48 h 开始浸润入脑,但数量少于激活的小胶质细胞。总之,当

前大部分数据支持这样一种猜想:出现在脑缺血损伤区域的巨噬样细胞大部分是活化的小胶质细胞,特别是脑损伤后的前几天。虽然在缺血损伤时,脑实质内小胶质细胞相对于血源性巨噬细胞占主导地位,但两者在脑缺血损伤中都发挥着重要作用^[7]。

2 小胶质细胞和巨噬细胞极化后的类型和作用

一旦组织发生损伤,周围血液中的单核细胞能够转化为巨噬细胞,并极化为几种有着特定功能的细胞亚型,包括产生炎症介质和吞噬的功能。巨噬细胞极化的种类受损伤的类型、免疫刺激、病原特性等所影响。之前研究关于组织内巨噬细胞的亚型主要有两种:M1/经典激活的巨噬细胞(classical activated macrophage)和 M2/选择性活化巨噬细胞(alternative activated macrophage),其生理活动都是在体外和非神经组织中观察到的。近来,在缺血损伤的脑组织内也检测到了这两种细胞。依靠 γ 干扰素(IFN- γ)和脂多糖(LPS)的刺激^[12],M1 能够对抗小胶质细胞活化、分泌促炎因子以及分泌活性氧产物(reactive oxygen species, ROS),表达主要组织相容性复合体 II(MHC-II)分子,并具有抗原提呈功能;另一方面,M2 在 IL-4、IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β)刺激下极化,表达大量甘露醇受体和清道夫受体,促进抗炎和组织修复过程^[13]。Hu 等^[14]在大鼠体内检测到了几种调节基因与巨噬细胞的极化有关,并且藉此来区分这两种不同的极化类型,包括与 M1 型相对应的 IgG Fc 受体 CD16/CD32、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase enzyme, iNOS),与 M2 相对应的甘露糖受体 CD206、精氨酸酶 1(Arg1)、类几丁质酶 3 样分子(chitinase 3 like-3, Chi313 或 Ym1)和 IL-10。另外,小胶质细胞也可分为 M1 和 M2 两种类型^[15]。在体外,把原始小胶质细胞放入含有 LPS 或者 IFN- γ 的培养基中培养,会产生吞噬能力下降且分泌 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 M1 细胞亚型;IL-4 会使小胶质细胞向 M2 亚型转化,同时 Arg1、Ym1 和抵抗素 a 的表达会增加^[15]。Cirard 等^[16]发现大鼠骨髓来源的巨噬细胞和 BV2 小胶质细胞系在含有 LPS 或者 IL-4 的环境中培养后只能成为 M1 或 M2 细胞亚型中的一种。相反的。Durafour 等^[17]发现人类小胶质细胞对导致极化成 M1 或 M2 亚型的刺激物起反应,并可同时形成此两种亚型,但是在极化的 M2 亚型细胞上表达的标记物只有 CD209、CD23、CD163,而 CD206 的表达并不增加。在分化成 M1 或 M2 细胞

亚型的条件下,相较大鼠,人类小胶质细胞的吞噬能力较强,IL-10 的表达较高,这表明即使在促炎的环境下,人类小胶质细胞也具有一定的抗炎功能,这对于神经的保护是非常重要的。

脑缺血发生后,若血流没有迅速恢复,缺血损伤将加重,损伤的神经元释放损伤相关蛋白使促炎症介质分泌和 ROS 形成^[18]。产生于血管和脑实质内的促炎细胞因子和 ROS 将会破坏血脑屏障(blood brain barrier, BBB),促进循环中的巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞募集进入脑组织,因此导致了缺血后的炎症反应^[19]。另一方面,在极易发生脑卒中的自发性高血压大鼠中,巨噬细胞在卒中发生之前就已存在于脑组织之内^[20]。这些结果表明,在脑卒中发生之前,血脑屏障的通透性就已经发生了变化,并且巨噬细胞也早已被激活,而这些改变,也可诱导脑卒中的发生。由此可看出,脑卒中可以导致巨噬细胞激活,同时,激活的巨噬细胞也能导致脑卒中的发生。另外,在缺血性脑卒中中,小胶质细胞也能够通过激活免疫细胞而发挥作用。在大鼠缺血性脑卒中模型中发现,巨噬细胞在缺血发作 12 h 后出现,而淋巴细胞(T 和 B)和嗜中性粒细胞则在第三天明显增加^[21],巨噬细胞可产生炎症因子以及促进内皮细胞产生黏附分子,从而促进嗜中性粒细胞聚集和迁移到脑组织^[22]。这些结果表明,巨噬细胞的渗入发生于免疫细胞之前,并且巨噬细胞的激活促进了其他免疫细胞进入缺血脑组织。不同的类型的 T 淋巴细胞在脑卒中中也有着不同的作用,CD4⁺TH1(CD4⁺ 辅助性 T 细胞 1) 通过促进促炎细胞因子(如 IL-2、IL-12、IFN- γ 、TNF- α) 的释放来使卒中进展。然而 CD4⁺TH2(CD4⁺ T 辅助性 T 细胞 2) 细胞通过释放抗炎因子如(IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13) 起到神经保护作用,而他们的不同作用可能也与巨噬细胞的不同极化状态相关。脑缺血的发生与动脉粥样硬化有着重大联系。众所周知,粥样硬化是一种炎症性疾病并且巨噬细胞在粥样硬化的发生和扩大中起着重要作用,巨噬细胞能够吞噬脂质形成泡沫细胞,泡沫细胞的增多加速斑块形成^[23]。在动脉粥样硬化的区域,巨噬细胞通过形成不稳定斑块和使斑块破裂而影响脑血流^[24],同时,在研究巨噬细胞对动脉粥样硬化的影响中,Cardilo-Reis 等^[25]发现 IL-13 可以增加粥样斑块的胶原含量,使血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 相

关的巨噬细胞的聚集反应减少,最终有效地调整了斑块的形成和斑块的稳定性,同时又伴随着 M2 巨噬细胞的增多。因此,M2 巨噬细胞可能对粥样斑块的稳定和抑制斑块形成发挥一定作用。国内学者也通过体外细胞培养证实辛伐他汀可通过诱导 M1 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞转化而发挥抗炎作用^[26]。故而,M2 巨噬细胞不仅可以减轻脑缺血导致的脑损伤,也可能防止脑缺血的发生。

3 M1 和 M2 亚型出现的时间

Perego 等^[27]在永久性局灶性脑缺血大鼠模型中,通过检测细胞标记物来观察缺血后不同时间不同细胞类型的数量,发现一旦缺血损伤发生,ED-1 阳性吞噬细胞就出现在损伤边界来限制梗死范围的扩大,而表达 Ym1 和 CD206 的 M2 型细胞出现在缺血中心。在脑缺血发生后的 1~3 d, M2 型基因 CD206、Arg1、Ym1/2、IL10 和 TGF- β 表达增加, 3~5 d 达到高峰,第 7 天开始减少,14 d 后减少到受损前的水平; M1 型基因 iNOS、CD11b、CD16、CD32 和 CD86 从第 3 天起才逐渐增加,一直持续到 14 d 以后^[14]。因此认为,在脑缺血早期, M2 型细胞的保护作用占主导地位,而到后期,发挥作用的主要是 M1 型细胞的损伤效应。

4 展望

对于缺血性脑卒中的治疗,唯一成功的措施就是用组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, tPA) 进行溶栓,但由于其 < 4.5 h 治疗时间窗的限制和出于安全考虑,不到 5% 的病人在梗死后选择行溶栓治疗^[28],目前世界上还缺少另外一些具有明显疗效的治疗方法,因此探索如何治疗缺血性脑卒中是一个重要的难题。鉴于 M1 和 M2 型巨噬细胞对于脑缺血损伤后的作用不同,且 M1 和 M2 两者之间可以互相转化,那么我们在缺血后是否能通过基因水平的调控或者其它的方法来抑制 M2 转为 M1 或者是增加 M2 型细胞,减少 M1 型细胞,以此来治疗缺血脑损伤。正如 Han 等在永久性大脑中动脉栓塞的大鼠模型中,通过 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR) 激活剂植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA) 激活 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱($\alpha 7$ nACh),不仅减少了缺血区域的 M1 细胞,而且增加了 M2 型细胞数量,从而促进了大鼠的恢复、减少缺血性脑损伤的体积^[29]。因此,我们可以探索通过提高 M2 细胞的水平,来改善缺血性脑卒中愈后,甚至预防缺血性脑卒中的发生,从而为人类缺血性脑卒

中的治疗提供新颖有效确切的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 邹显巍,吴珊,任骏. 卒中的全身炎症反应. 国际脑血管病杂志, 2006, 14(7): 537-542.
- [2] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1-2): 53-68.
- [3] Tian F, Yu BL, Hu JR. mTOR mediates the cross-talk of macrophage polarization and autophagy in atherosclerosis. *Int J Cardiol*, 2014, 177(1): 144-145.
- [4] Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 669-692.
- [5] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 2005, 308(5726): 1314-1318.
- [6] Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, et al. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *J Immunol*, 1995, 154(9): 4309-4321.
- [7] Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, et al. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 2003, 183(1): 25-33.
- [8] Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, et al. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 2005, 196(2): 290-297.
- [9] Schilling M, Strecker JK, Schabitz WR, et al. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 2009, 161(3): 806-812.
- [10] Kokovay E, Li L, Cunningham LA. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(4): 545-555.
- [11] Denes A, Vidyasagar R, Feng J, et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(12): 1941-1953.
- [12] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6166-6173.
- [13] Mantovani A, Scia A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004, 25(12): 677-686.
- [14] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-3070.
- [15] Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, et al. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*, 2009, 210(1-2): 3-12.
- [16] Meisel C, Schwab JM, Prass K, et al. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(10): 775-786.
- [17] Durafour BA, Moore CS, Zammit DA, et al. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 2012, 60(5): 717-727.
- [18] Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, et al. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol*, 2012, 3: 132.
- [19] Michaud JP, Pimentel-Coelho PM, Tremblay Y, et al. The impact of Ly6Clow monocytes after cerebral hypoxia-ischemia in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(7): e1-e9.
- [20] Yamori Y. Predictive and preventive pathology of cardiovascular diseases. *Acta Pathol Jpn*, 1989, 39(11): 683-705.
- [21] Gelderblom M, Leyppdt F, Steinbach K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 2009, 40(5): 1849-1857.
- [22] Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*, 2006, 66(3): 232-245.
- [23] 李全忠,张雁,钱宗杰,等. 普伐他汀改变小鼠巨噬细胞极性发挥抗炎的机制. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(10): 993-996.
- [24] Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(12): 2108-2114.
- [25] Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier SM, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(10): 1072-1086.
- [26] 施鸿毓,张红旗,孙爱军,等. 树突状细胞来源的泡沫细胞在兔粥样动脉硬化病变中的分布. 中国临床医学, 2006, 13(2): 164-166.
- [27] Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflamm*, 2011, 8: 174.
- [28] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1317-1329.
- [29] Han Z, Shen F, He Y, et al. Activation of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105711.