

小胶质细胞激活与脑出血后继发性脑损伤机制的研究进展

管栋 综述 张相彤*, 梁洪生 审校

哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科急诊绿色通道, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要:最近研究发现,小胶质细胞激活参与了脑出血后的继发性损伤。激活的小胶质细胞大量分泌促炎性因子、基质金属蛋白酶和血红素加氧酶-1 等,这些物质加重了脑出血后的炎症反应和氧化应激,导致明显的脑水肿和神经功能障碍。应用药物抑制小胶质细胞激活,减少上述物质的表达,明显减轻了脑出血大鼠的脑水肿和提高了行为学评分。本文对小胶质细胞激活参与脑出血继发性损伤的机制作一综述,以期对脑出血的治疗提供新的思路。

关键词:小胶质细胞激活;脑出血;炎症反应;细胞外蛋白酶

脑出血是一种严重的中枢神经系统损伤,具有极高的病死率和致残率,然而目前尚缺乏有效的治疗手段。实验研究表明,出血性脑损伤不仅由于血肿的占位效应及其对周围脑组织的直接破坏,继发性损伤也是出血性脑损伤的主要原因。近期研究发现,脑出血产生的凝血酶等物质强烈激活小胶质细胞,激活的小胶质细胞大量分泌促炎性因子和蛋白水解酶。这些物质加重了脑出血后的继发性损伤。本文对其研究进展综述如下。

1 脑出血后小胶质细胞激活

小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞,它通常被认为是大脑中的巨噬细胞。在正常情况下,小胶质细胞处于一种所谓的“静息”状态,主要特点是胞体很小带有“分枝样”突起且低表达细胞表面抗原。脑损伤后,小胶质细胞被激活并发生外形和功能的改变,比如细胞体积增大、发生增殖反应、促炎性蛋白上调和获得吞噬性等。目前关于小胶质细胞激活的机制仍不清楚,但人们普遍认为脑损伤后释放的物质激发了这一过程。Wu 等^[1]在培养的小胶质细胞中加入凝血酶,导致小胶质细胞大量分泌促炎性因子以及引起明显的增殖反应,这恰恰证实了上述观点。Wang 等^[2]在胶原酶诱导的脑出血模型中证实,在胶原酶注射后 1~2 小时,血肿周围小胶质细胞开始激活,1 天后明显增多,第 7 天时达到高峰,到第 21 天恢复正常。而 Xue 等^[3]在自体血脑出血模型中发现,自体血注射后 1~4 小时,血肿周围小胶质细胞开始激活,3~7

天达到高峰,并且可以维持 4 周左右。以上研究表明,小胶质细胞在脑出血的早期即被激活,并且可以维持 3~4 周。虽然激活的小胶质细胞主要作用是清除血肿和组织碎片,但激活的小胶质细胞也表达和释放多种促炎性因子、活性氧、蛋白酶和一氧化氮等,这些物质均可加重脑出血后的大脑损伤^[4,5]。

2 激活的小胶质细胞分泌多种促炎性因子

炎症反应在脑出血后继发性损伤中占据非常重要的地位,其在脑出血损伤中的作用日益受到关注。TNF- α 和 IL-1 β 是两种主要的促炎性因子。体外研究证实,脑出血后释放的凝血酶通过蛋白酶激活受体激活小胶质细胞,激活后的小胶质细胞大量表达和分泌 TNF- α 和 IL-1 β ^[1]。

2.1 肿瘤坏死因子- α (Tumour necrosis factor- α , TNF- α)

TNF- α 是主要的促炎性因子之一,它具有多种生物学活性。其中包括刺激炎症蛋白的分泌、调节血管通透性和诱导星形胶质细胞及内皮细胞表达粘附分子和趋化因子,这些将使血液中的白细胞更容易透过血脑屏障,浸润到大脑组织中,加重神经系统炎症。另外,Bezzi 等^[6]研究发现,激活后的小胶质细胞通过分泌 TNF- α 增加星形胶质细胞分泌谷氨酸盐,这种激活小胶质细胞通过 TNF- α 诱导的反应被认为是大脑从生理状态到兴奋性中毒的一个开关。最近研究还发现,小胶质细胞来源的 TNF- α 可以直接激活小胶质细胞或通过诱导 IL-6、

基金项目:国家自然科学基金(81041082)

收稿日期:2012-06-13;修回日期:2012-08-09

作者简介:管栋(1985-),男,在读硕士研究生,主要从事脑出血疾病的基础研究。

通讯作者:张相彤(1967-),男,哈医大附属一院神经外科绿色通道主任,博士学位,主要从事脑出血疾病的基础与临床研究。

IL-1 β 、NO 和 ROS 进一步激活小胶质细胞,这一正反馈作用在维持小胶质细胞激活状态和加重其病理条件下的破坏活性起到关键作用^[7]。Mayne 等^[8]发现,降低小胶质细胞来源的 TNF- α 表达水平,明显减少了脑出血动物的出血量和提高了神经行为学评分。Miao 等^[9]应用去铁胺抑制小胶质细胞激活,减少其 TNF- α 的表达,明显改善了脑出血大鼠神经元损伤和神经功能缺陷。

2.2 白细胞介素-1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)

IL-1 主要由单核巨噬细胞产生,因等电点不同分为 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1 γ 。人体内 IL-1 活性主要由 IL-1 β 介导。在中枢神经系统中,激活的小胶质细胞是 IL-1 β 的主要来源。Liesz 等^[10]在两种脑出血模型中皆发现,IL-1 β 在脑出血后 3h 即开始增加,至 24h 达到高峰,可达到正常值的几百倍。如此高表达的 IL-1 β 对大脑存在多种有害效应,比如神经毒性、提高血脑屏障通透性、诱导凋亡和白细胞浸润等^[11]。因为 IL-1 β 在正常大脑中作用很小,所以阻断它的活性引起大脑损害的可能性很小。正因为如此,抑制 IL-1 β 的活性治疗脑出血成为了近年研究的热点。Wu 等^[12]应用药物抑制 IL-1 β 的活性,明显减轻了脑出血大鼠的大脑水肿和神经功能缺陷。

3 激活的小胶质细胞分泌基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP)

基质金属蛋白酶是一组降解细胞外基质分子的锌依赖性肽链内切酶。它主要以酶原形式分泌至细胞外,需在激活剂的作用下脱去前肽,才具有酶活性。在正常稳定状态的大脑中,MMP 表达量极少;当大脑损伤时,MMP 表达升高,并参与了神经炎症、血脑屏障破坏、脱髓鞘和轴突损伤等病理过程^[13]。脑出血后,表达增加的 MMP 主要有 MMP-2, -3, -9, -12^[5,14-16]。研究发现,这些表达增多的 MMP 主要来源于激活的小胶质细胞,且对大脑具有多种有害效应。

3.1 MMP-3

MMP-3 是一种间质溶解素,它的底物主要包括蛋白聚糖、层粘连蛋白、明胶和 III, IV, V, IX 型胶原等。Power 等^[15]发现脑出血后 24 小时 MMP-3 的 mRNA 水平即开始升高,并可持续到脑出血后 28 天。多项研究显示,激活的小胶质细胞是 MMP-3 的主要来源,星形胶质细胞不表达 MMP-3^[17]。而激活小胶质细胞分泌的 MMP-3 与脑出血后的炎症

反应、大脑水肿和细胞凋亡密切相关,这可能与 MMP-3 激活 MMP-9 和 IL-1 β , 促进细胞外基质降解和炎症反应有关^[18]。Kim 等^[19]证实 MMP-3 还可以激活小胶质细胞,激活的小胶质细胞大量分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎性因子,加重脑损伤后的炎症反应。研究还发现,应用 MMP-3 抑制剂或敲除小鼠的 MMP-3 基因可以终止小胶质细胞激活,同时伴随促炎性因子和超氧化物产生量的下降^[17,19]。另外,Xue 等^[18]在培养的神经元中加入人类重组 MMP-3,发现 MMP-3 可以直接杀死培养的神经元,并且 MMP-3 联合 MMP-9 或凝血酶导致了更多的神经元死亡。而 MMP-3 基因敲除小鼠与野生型相比,神经元死亡数目减少且大脑损伤范围明显减小。由此可见,抑制 MMP-3 的活性可以减轻脑出血后的炎症反应和神经元损伤,为脑出血患者带来益处。但目前为止还没有应用 MMP-3 抑制剂治疗脑出血的报道。

3.2 MMP-9

MMP-9 又称明胶酶 B,它可以水解明胶、弹性蛋白、层粘连蛋白、IV 和 V 型胶原等多种物质。早在 1997 年,Rosenberg 和 Navratil 首次验证在脑出血后 24 小时 MMP-9 发生激活。随后,Wang 等^[2]证实了脑出血后这一增加的胶原酶活性,并利用原位明胶酶谱法发现 MMP-9 在脑出血后 24 至 72 小时仍明显增高。脑出血后 MMP-9 水平与血肿周围水肿和神经元死亡密切相关。Tejima 等^[20]利用自体血脑出血模型发现,脑内注射含 MMP-9 的自体血诱发了强烈的脑水肿,而注入不含 MMP-9 自体血的小鼠,脑水肿明显减轻。同样,敲除 MMP-9 基因的小鼠与野生型相比,脑出血后脑水肿明显改善。Xue 等^[18,21]报道,当 MMP-9 浓度达到 100ng/ml 时,即可引起人类胎儿神经元发生凋亡且浓度越大其诱导凋亡效应越强。研究还发现,MMP-9 还可加重 MMP-3 和凝血酶的神经毒性,引起更多的神经元死亡。敲除小鼠的 MMP-9 基因,脑出血后神经元死亡和白细胞浸润明显减少,并且脑水肿减轻,同时脑出血损伤范围减小。目前,关于 MMP-9 诱导细胞凋亡的机制尚不明确。最近,王知非等^[22]发现 MMP-9 分解包括血脑屏障在内的细胞外基质和细胞骨架成分,导致细胞内钙超载,激活钙蛋白酶,通过“瀑布”效应,导致细胞凋亡。过去认为病理条件下,星形胶质细胞表达 MMP-9 引起大脑损伤^[20]。最近 Stephen 等^[23]应用纯化的小胶质

细胞和星形胶质细胞研究发现,星形胶质细胞不表达 MMP-9,激活的小胶质细胞才是 MMP-9 的主要来源。由此可见,抑制小胶质细胞激活,降低 MMP-9 的表达可能为脑出血的治疗提供新的思路。

3.3 MMP-12

MMP-12 是一种金属弹性蛋白酶,它的底物主要包括酪蛋白、弹性蛋白、纤维结合蛋白、明胶、层粘连蛋白和蛋白聚糖。Wells 和 Power 等^[14,15]研究发现,MMP-12 mRNA 水平在脑出血后 24 小时开始升高,脑出血后 7 天达到高峰且是脑出血后表达最多的基质金属蛋白酶,可达到正常值的 80 倍。免疫组织化学结果显示,MMP-12 主要出现在血肿周围激活的小胶质细胞内。同其他的 MMP 一样,MMP-12 通过降解细胞外基质成分,促进外周细胞和炎性分子浸润,加重中枢神经系统炎症。Yong 等^[13]报道,MMP-12 还可激活 MMP-2、MMP-9 和 TNF- α 。激活形式的 MMP-2、MMP-9 和 TNF- α 可进一步增加血脑屏障的通透性和加重脑损伤后的炎症反应,这些都将促进脑水肿的发生。Power 等^[15]发现米诺环素可以明显减轻脑出血引起的胶质细胞激活和神经细胞凋亡。与非治疗组对比,米诺环素明显提高了脑出血大鼠的神经行为学评分。同时,他发现米诺环素可以明显减少 MMP-12 的表达,而对 MMP-2,7,9 并无影响。这说明米诺环素对脑出血大鼠的治疗作用是通过抑制 MMP-12 的表达引起的。

4 激活的小胶质细胞表达血红素加氧酶-1 (Heme oxygenase-1, HO-1)

血红素加氧酶系统是在人和哺乳动物中广泛存在的微粒体酶系统。它是血红素降解的主要限速酶,血红素被 HO 降解为等摩尔的胆绿素、二价铁和一氧化碳。迄今发现 HO 有 3 种形式的同工酶。HO-1 是一种诱导型酶,生理情况下脑内很难检测到。当大脑损伤时,激活的小胶质细胞大量表达 HO-1 引起氧化应激。HO-2 结构性表达于脑内大多数神经元,在维持正常生理功能方面起重要作用。HO-3 是新结构型酶,几乎没有催化活性其确切功能尚不清楚。Wang 等^[24]在自体血脑出血模型中发现,HO-1 在脑出血后 24 h 即开始增加,第 3 至 7 天达到高峰,并可维持到脑出血后 14 天,而 HO-2 的表达量几乎没有变化。虽然血红素降解在缺血性脑卒中中被认为具有脑保护作用,但越来越

多的证据显示,它可加重脑出血后的大脑损伤。Wang 等^[4]研究发现,敲除 HO-1 基因的小鼠与野生型相比,脑出血后大脑损伤量和神经功能失调得到明显改善。这可能与基因敲除小鼠白细胞浸润减少、小胶质细胞激活减轻和自由基水平下降有关。Gong 等^[25]在大鼠脑出血后 0~6 h 内给予 HO 抑制剂(锌原卟啉),发现锌原卟啉可以明显减轻脑出血大鼠的大脑水肿和皮质萎缩,并提高脑出血大鼠的行为学评分。以上结果提示,HO-1 可以作为一种治疗脑出血的新靶点。应用药物抑制小胶质细胞激活,减少其 HO-1 的表达,可能为脑出血患者带来益处。

5 小结和展望

脑出血具有极高的病死率和致残率,但目前尚缺乏有效的治疗手段。动物实验证实,脑出血后激活的小胶质细胞分泌大量毒性物质引起大脑水肿、神经元损伤和神经功能失调等。应用米诺环素抑制小胶质细胞激活可以明显减轻上述有害效应,所以针对小胶质细胞激活的治疗策略可能在以后的临床试验中起到较好的作用。值得关注的是,抑制小胶质细胞激活的治疗策略强调在脑出血的早期实施。长期的小胶质细胞抑制并非完全有益,因为这种抑制作用可能潜在终止了小胶质细胞吞噬细胞碎片和分泌神经营养因子等神经保护作用。

参 考 文 献

- [1] Wu J, Yang S, Xi G, et al. Microglial activation and brain injury after intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 2008,105: 59-65.
- [2] Wang J, Tsirka SE. Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 2005,36: 613-618.
- [3] Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. *Brain Res*, 2000,871: 57-65.
- [4] Wang J, Dore S. Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. *Brain*, 2007,130: 1643-1652.
- [5] Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007,27: 894-908.
- [6] Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF- α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*, 2001,4: 702-710.

- [7] Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, et al. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *J Neuroimmunol*, 2005, 162 : 89-96.
- [8] Mayne M, Ni W, Yan HJ, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 2001, 32 : 240-248.
- [9] Miao XY, Liu XB, Yue Q, et al. Deferoxamine suppresses microglia activation and protects against secondary neural injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012, 32 (7) : 970-975.
- [10] Liesz A, Middelhoff M, Zhou W, et al. Comparison of humoral neuroinflammation and adhesion molecule expression in two models of experimental intracerebral hemorrhage. *Exp Transl Stroke Med*, 2011, 3 (1) : 11.
- [11] Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin-1 in the brain : biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, 2000, 23 (12) : 618- 625.
- [12] Wu B, Ma Q, Khatibi N, et al. Ac-YVAD-CMK Decreases Blood-Brain Barrier Degradation by Inhibiting Caspase-1 Activation of Interleukin-1 β in Intracerebral Hemorrhage Mouse Model. *Transl Stroke Res*, 2010, 1 (1) : 57-64.
- [13] Yong VW, Power C, Forsyth P, et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2 : 502-511.
- [14] Wells JE, Biernaskie J, Szymanska A, et al. Matrix metalloproteinase-12 expression has a negative impact on sensorimotor function following intracerebral haemorrhage in mice. *Eur J Neurosci*, 2005, 21 : 187-196.
- [15] Power C, Henry S, Del Biquio MR, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol*, 2003, 53 : 731-742.
- [16] Shin JW, Kang HC, Shim J, et al. *Scutellaria baicalensis* attenuates blood brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage in rats. *Am J Chin Med*, 2012, 40 (1) : 85-96.
- [17] Woo MS, Park JS, Choi IY, et al. Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *J Neurochem*, 2008, 106 : 770-780.
- [18] Xue M, Fan Y, Liu S, et al. Contributions of multiple proteases to neurotoxicity in a mouse model of intracerebral haemorrhage. *Brain*, 2009, 132 : 26-36.
- [19] Kim YS, Choi DH, Block ML, et al. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J*, 2007, 21 (1) : 179-187.
- [20] Tejima E, Zhao BQ, Tsuji K, et al. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema after brain hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27 (3) : 460-468.
- [21] Xue M, Hollenberg MD, Yong VW. Combination of thrombin and matrix metalloproteinase-9 exacerbates neurotoxicity in cell culture and intracerebral hemorrhage in mice. *J Neurosci*, 2006, 26 : 10281-10291.
- [22] 王知非, 廖达光, 吴浩, 等. 大鼠弥漫性脑损伤中基质金属蛋白酶-9 通过激活钙蛋白酶导致细胞凋亡. *中国现代医学杂志*, 2010, 9 : 1336-1338.
- [23] Crocker SJ, Frausto RF, Whitton JL, et al. A novel method to establish microglia-free astrocyte cultures : comparison of matrix metalloproteinase expression profiles in pure cultures of astrocytes and microglia. *Glia*, 2008, 56 (11) : 1187-1198.
- [24] Wang G, Yang Q, Li G, et al. Time course of heme oxygenase-1 and oxidative stress after experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir*, 2011, 153 (2) : 319-325.
- [25] Gong Y, Tian H, Xi G, et al. Systemic zinc protoporphyrin administration reduces intracerebral hemorrhage induced brain injury. *Acta Neurochir*, 2006, 96 : 232-236.