

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.18.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 18-0036-07

实验研究·论著

Robo4在脑缺血再灌注损伤大鼠小胶质细胞极化中的作用及其机制研究*

曹天然¹, 刘青芳², 潘美民¹, 陈勇³

(长沙市第一医院 1. 临床试验研究中心, 2. 神经医学中心, 3. 皮肤科, 湖南 长沙 410005)

摘要: **目的** 探讨环形交叉轴突导向受体同源物4(Robo4)蛋白对脑缺血再灌注损伤(CIRI)后小胶质细胞M1/M2极化的影响。**方法** 选取60只SD大鼠, 随机分为假手术(Sham)组、大脑中动脉短暂性闭塞/再灌注(tMCAO/R)组、tMCAO/R联合过表达Robo4慢病毒阴性载体(tMCAO/R+Lv-scramble)组、tMCAO/R联合过表达Robo4慢病毒载体(tMCAO/R+Lv-Robo4)组, 每组15只。tMCAO/R+Lv-scramble组及tMCAO/R+Lv-Robo4组在复制tMCAO前7d于脑室内注射慢病毒载体。Longa评分评估神经功能缺损, TTC法检测脑梗死面积, 实时荧光定量聚合酶链反应及Western blotting检测大脑组织中Robo4的表达, Western blotting检测M1小胶质细胞标志物(iNOS和CD86)、M2小胶质细胞标志物(Arg-1和CD206)和Notch通路蛋白(Notch-1、Hes1和Hes5)表达。酶联免疫吸附试验检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-10和TGF- β 水平。**结果** tMCAO/R组Longa评分较Sham组高($P < 0.05$), tMCAO/R+Lv-scramble组较tMCAO/R+Lv-Robo4组高($P < 0.05$)。tMCAO/R组Robo4 mRNA和蛋白相对表达量较Sham组低($P < 0.05$), tMCAO/R+Lv-Robo4组较tMCAO/R+Lv-scramble组高($P < 0.05$)。tMCAO/R组脑梗死面积较Sham组大($P < 0.05$), tMCAO/R+Lv-Robo4组较tMCAO/R+Lv-scramble组小($P < 0.05$)。tMCAO/R组较Sham组高($P < 0.05$), tMCAO/R+Lv-Robo4组iNOS、CD86较tMCAO/R+Lv-scramble组低, Arg-1、CD206较tMCAO/R+Lv-scramble组高($P < 0.05$)。tMCAO/R组较Sham组高($P < 0.05$), tMCAO/R+Lv-Robo4组TNF- α 、IL-1 β 较tMCAO/R+Lv-scramble组低, IL-10、TGF- β 较tMCAO/R+Lv-scramble组高($P < 0.05$)。tMCAO/R组Notch-1、Hes1和Hes5相对表达量较Sham组高, tMCAO/R+Lv-Robo4组较tMCAO/R+Lv-scramble组低($P < 0.05$)。**结论** Robo4可调控CIRI后小胶质细胞极化向M2表型转移, 并调控Notch信号通路, 缓解CIRI。

关键词: 脑缺血再灌注损伤; 环形交叉轴突导向受体同源物4; Notch信号通路; M1/M2极化; 小胶质细胞
中图分类号: R743.31 **文献标识码:** A

Role of Robo4 in the polarization of microglia after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its underlying mechanisms*

Cao Tian-ran¹, Liu Qing-fang², Pan Mei-min¹, Chen Yong³

(1. Clinical Trial Research Center, 2. Department of Dermatology, 3. Neurology Center, The First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To explore the role of roundabout guidance receptor 4 (Robo4) in M1/M2 polarization of microglia after cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** Sixty SD rats were selected and divided into Sham group, transient middle cerebral artery occlusion/reperfusion (tMCAO/R) group, tMCAO/R combined with Robo4 negative control lentiviral vectors (tMCAO/R + Lv-scramble) group, and tMCAO/R combined with Robo4 overexpression lentiviral vectors (tMCAO/R + Lv-Robo4) group via the random number table method, with

收稿日期: 2023-06-14

* 基金项目: 湖南省自然科学基金-科卫联合项目(No:2022JJ70129)

[通信作者] 陈勇, E-mail: panmeiming1027@163.com

15 rats in each group. The tMCAO/R + Lv-scramble group and the tMCAO/R + Lv-Robo4 group were injected with 5 μ L of Lv-scramble (4×10^8 TU/mL) or Lv-Robo4 (1×10^9 TU/mL) 7 days before the induction of tMCAO. After 24 hours of tMCAO/R induction, the Longa score was applied to evaluate neurological deficits of rats. Besides, the cerebral infarct size was measured via the 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) method after 5 days of tMCAO/R induction. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of Robo4 in brain tissues, and the expressions of M1 microglia markers (iNOS and CD86), M2 microglia markers (Arg-1 and CD206) and proteins associated with the Notch signaling pathway (Notch-1, Hes1 and Hes5) were detected by Western blotting. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) were detected by ELISA. **Results** Compared with the Sham group, the tMCAO/R group had higher Longa score, larger cerebral infarction size, higher protein expressions of iNOS, CD86, Arg-1, CD206, Notch-1, Hes1 and Hes5 in the brain tissues, higher levels of TNF- α , IL-1 β , IL-10 and TGF- β , and lower expressions of Robo4 ($P < 0.05$). Compared with the tMCAO/R + Lv-scramble group, the tMCAO/R + Lv-Robo4 group had lower Longa score, smaller cerebral infarct size, lower protein expressions of iNOS, CD86, Notch-1, Hes1 and Hes5 in the brain tissues, lower levels of TNF- α and IL-1 β , higher expressions of Robo4, higher protein expressions of Arg-1 and CD206, and higher levels of IL-10 and TGF- β ($P < 0.05$). **Conclusions** Robo4 regulates the polarization of microglia after CIRI through the Notch signaling pathway, thereby promoting the recovery of neurological function.

Keywords: cerebral ischemia-reperfusion injury; Robo4; notch signaling pathway; M1/M2 polarization; microglia

缺血性脑卒中(ischemic stroke, ICH)是临床多发病,具有发病率、病死率、致残率和复发率高等特点,给家庭和社会带来了沉重负担^[1]。对于 ICH 的干预,目前国际研究金标准是溶解血栓以恢复血流^[2],实现再灌注是治疗这类疾病的必要条件。然而,再灌注可能会进一步加重缺血性脑损伤,即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)^[3-4]。CIRI 涉及多种病理、生理过程,包括氧化应激、炎症反应、神经元死亡和细胞凋亡等,在 CIRI 的发生、发展中起着关键作用^[5-6]。目前的干预手段是针对 CIRI 进行多靶点干预,即对神经损伤的多个途径进行阻断。但该病尚缺乏有效的治疗药物,故研究 CIRI 的病因及寻找药物新靶点具有重要意义。

小胶质细胞是中枢神经系统中主要的固有免疫细胞,在维持中枢内环境的稳定、防止病原的入侵、调节神经系统病理生理过程中起着重要作用^[7]。研究表明,脑部驻留的小胶质细胞在脑梗死后被募集到病变部位后再激活,激活后的小胶质细胞可以极化为“经典激活”的巨噬细胞 M1 和“交替激活”的巨噬细胞 M2 两种表型^[8]。其中,巨噬细胞 M1 产生促炎细胞因子,例如 CD16、CD32、CD86 和诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),被认为对脑梗死组织恢复有害。相比之下,巨噬细胞 M2 合成抗炎介质,包括白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)、IL-10、IL-13 和转化生长因子- β (transforming growth

factor- β , TGF- β)被认为是有益的^[9]。基于小胶质细胞的激活和极化在脑缺血再灌注恢复过程中的动态变化,调整 M1/M2 细胞比率可能有助于 CIRI 后脑炎症反应。因此,探索在急性缺血性半影区平衡小胶质细胞表型的新型免疫调节可能为预防或减少 CIRI 提供可行的策略。

环形交叉轴突导向受体同源物 4(Robo4)蛋白环是一种跨膜受体,在调节血管内皮细胞功能和炎症中起着至关重要的作用^[10]。但其是否在脑缺血再灌注小胶质细胞极化中发挥调控作用暂不清楚。因此本研究观察了 Robo4 在脑缺血后小胶质细胞极化过程中的作用,以期为 CIRI 的治疗探索新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

60 只健康雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2022-0052],体重 250 ~ 280 g,购买于北京维通利华有限公司。动物实验通过医院医学伦理委员会科学研究项目审批[No:(2021)伦理(临研)第 61 号]。BCA 试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶和聚偏二氟乙烯膜购自美国 Millipore 公司。RIPA 缓冲液和 BCA 蛋白测定试剂盒购自中国 Beyotime 公司。IL-1 β 和 IL-10、

TNF- α 、TGF- β 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitroge 公司。Prime Script™ RT 试剂盒购自日本 TaKaRa 株式会社。Robo4、iNOS、CD86、Arg-1、CD206、Notch-1、Hes1 和 Hes5 抗体购自美国 Abcam 公司。慢病毒载体及其阴性对照购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.2 动物分组与模型复制

所有大鼠被随机分为假手术 (Sham) 组、大脑中动脉短暂性闭塞/再灌注 (tMCAO/R) 组、tMCAO/R 联合过表达 Robo4 慢病毒阴性载体 (tMCAO/R+Lv-scramble) 组、tMCAO/R 联合过表达 Robo4 慢病毒载体 (tMCAO/R + Lv-Robo4) 组, 每组 15 只。将 5 μ L Robo4 过表达慢病毒载体 (1×10^9 TU/mL) 或 Robo4 过表达慢病毒阴性载体 (4×10^8 TU/mL) 于 tMCAO 前 7 d 注入大鼠左侧脑室, 24 h 后取脑组织待测。

小心分离出大鼠左侧颈总动脉、颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 和颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 并将其完全暴露。在结扎 ECA 及其分支的远端后, 将硅胶涂层尼龙单丝通过 ECA 插入 ICA 并轻轻推进到大脑中动脉。大脑中动脉短暂性闭塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 1.5 h 后, 恢复脑灌注 (再灌注 24 h)。在整个手术和闭塞期间, 用加热灯将体温保持在 (37.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。Sham 组大鼠除置入尼龙单丝外, 其余操作同上。大鼠清醒后, 如果出现站立不稳, 左侧肢体瘫痪, 提尾时向一侧转圈则说明 tMCAO 模型复制成功^[8]。

1.3 神经功能检测

再灌注后 24 h 后根据 Longa 评分法评估神经功能缺损^[11]。无神经功能缺陷计 0 分; 右前爪不能完全伸展计 1 分; 爬行时瘫痪侧转圈计 2 分; 爬行时向瘫痪侧倾倒计 3 分; 不能自发行走, 意识水平低下或死亡计 4 分。得分为 1~3 分、无癫痫发作或脑出血的大鼠视为模型复制成功。共有 Sham 组 (15 只)、tMCAO/R 组 (13 只)、tMCAO/R + Lv-scramble 组 (12 只)、tMCAO/R + Lv-Robo4 组 (13 只) 纳入后续研究。同时, 每组随机选取 6 只大鼠检测脑梗死面积, 其余大鼠脑组织用于实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、Western blotting、ELISA 检测。

1.4 2,3,5-三苯基氯化四氮唑法检测大鼠脑梗死面积

取出大鼠大脑, 切除嗅球、小脑和脑干, 并以 2 mm 的间隔进行冠状切片。然后将切片浸入 1% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 溶液 20 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 4% 多聚甲醛固定 24 h。脑组织未梗死部分呈红色, 梗死部分呈白色。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算脑切片的梗死面积和总面积。

1.5 qRT-PCR 检测大鼠脑组织中 Robo4 mRNA 表达

使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。然后将各组大鼠 RNA 用 PrimeScript™ RT 试剂盒逆转录成 cDNA。qRT-PCR 使用 iQ SYBR Green Supermix 试剂盒在 Light Cycler 热循环仪系统下进行。Robo4 正向引物: 5'-GGCCCCACCTCCTGCTGAAAAC-3', 反向引物: 5'-G GACGGCACCCTGGCAATGACT-3', 均 329 bp; GAPDH 正向引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 反向引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3', 均 70 bp。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量。

1.6 Western blotting 检测大鼠脑组织中 Robo4、iNOS、CD86、Arg-1、CD206、Notch-1、Hes1 和 Hes5 蛋白表达

脑组织在 RIPA 缓冲液中裂解后, 通过 BCA 蛋白测定试剂盒测定上清液中的总蛋白浓度。8% SDS-PAGE 电泳后转移到聚乙烯二氟胺膜上。在室温下于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h 后, 将膜与一抗孵育过夜。用吐温-20 羟甲基氨甲烷缓冲液洗涤 3 次后, 将印迹与偶联辣根过氧化物酶的抗兔或抗大鼠免疫球蛋白 G 在室温下孵育 1.5 h, 条带曝光, 最后凝胶成像系统分析图像并计算光密度值, 以 β -actin 为内参。

1.7 ELISA 检测脑组织炎症因子表达

将脑组织在磷酸盐缓冲盐溶液 (pH 7.4) 中研磨成匀浆。将匀浆液放置离心管中以 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。根据制造商的方案, 使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 和 TGF- β 水平。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析或 *t* 检验, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Longa 评分比较

Sham 组、tMCAO/R 组、tMCAO/R + Lv-scramble 组、tMCAO/R + Lv-Robo4 组大鼠 Longa 评分分别为 (0.00 ± 0.00)、(2.86 ± 0.58)、(2.98 ± 0.49)、(1.32 ± 0.38) 分, 经 *H* 检验, 差异有统计学意义 ($H=45.740$, $P=0.000$), tMCAO/R 组 Longa 评分较 Sham 组高。tMCAO/R + Lv-Robo4 组较 tMCAO/R + Lv-scramble 组 Longa 评分低。

2.2 各组大鼠脑梗死面积比较

Sham 组、tMCAO/R 组、tMCAO/R + Lv-scramble 组、tMCAO/R + Lv-Robo4 组大鼠脑梗死面积分别为 (0.00 ± 0.00)%、(35.64 ± 1.58)%、(37.18 ± 1.35)%、(12.12 ± 1.31)%, 经 *H* 检验, 差异有统计学意义 ($H=20.291$, $P=0.000$), tMCAO/R 组较 Sham 组脑梗死面积大, tMCAO/R + Lv-Robo4 组较 tMCAO/R + Lv-scramble 组脑梗死面积小。见图 1。



1: Sham 组; 2: tMCAO/R 组; 3: tMCAO/R + Lv-scramble 组; 4: tMCAO/R + Lv-Robo4 组。

图 1 各组大鼠脑组织横切面图 (TTC 染色)

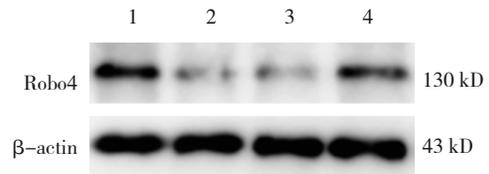
2.3 各组大鼠脑组织 Robo4 mRNA 和蛋白相对表达量比较

各组大鼠脑组织 Robo4 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步两两比较, tMCAO/R 组大鼠脑组织 Robo4 mRNA 和蛋白相对表达量较 Sham 组低, tMCAO/R + Lv-Robo4 组 Robo4 mRNA 和蛋白相对表达量较 tMCAO/R + Lv-scramble 组高。见表 1 和图 2。

表 1 各组大鼠 Robo4 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | Robo4 mRNA | Robo4 蛋白 |
|-------------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Sham 组 | 9 | 1.00 ± 0.13 | 0.51 ± 0.07 |
| tMCAO/R 组 | 7 | 0.27 ± 0.12 ^① | 0.15 ± 0.04 ^① |
| tMCAO/R + Lv-scramble 组 | 6 | 0.22 ± 0.09 | 0.12 ± 0.03 |
| tMCAO/R + Lv-Robo4 组 | 7 | 0.67 ± 0.15 ^② | 0.34 ± 0.05 ^② |
| <i>F</i> 值 | | 64.941 | 92.723 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.000 |

注: ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 tMCAO/R + Lv-scramble 组比较, $P < 0.05$ 。

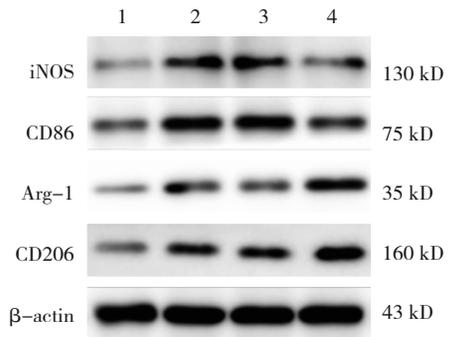


1: Sham 组; 2: tMCAO/R 组; 3: tMCAO/R + Lv-scramble 组; 4: tMCAO/R + Lv-Robo4 组。

图 2 各组大鼠脑组织 Robo4 蛋白条带图

2.4 各组大鼠脑组织 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD206 蛋白相对表达量比较

各组大鼠脑组织 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD206 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), tMCAO/R 组大鼠脑组织 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD206 蛋白相对表达量较 Sham 组高, tMCAO/R + Lv-Robo4 组大鼠脑组织 iNOS、CD86 较 tMCAO/R + Lv-scramble 组低, Arg-1、CD206 较 tMCAO/R + Lv-scramble 组高。见图 3 和表 2。



1: Sham 组; 2: tMCAO/R 组; 3: tMCAO/R + Lv-scramble 组; 4: tMCAO/R + Lv-Robo4 组。

图 3 各组大鼠 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD206 蛋白条带图

2.5 各组大鼠脑组织 Notch-1、Hes1 和 Hes5 蛋白相对表达量比较

各组大鼠脑组织 Notch-1、Hes1 和 Hes5 相对表

表 2 各组大鼠 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD206 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

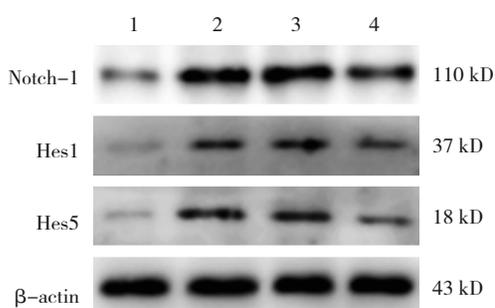
| 组别 | n | iNOS | CD86 | Arg-1 | CD206 |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sham 组 | 9 | 0.16 ± 0.06 | 0.34 ± 0.04 | 0.16 ± 0.04 | 0.21 ± 0.08 |
| tMCAO/R 组 | 7 | 0.50 ± 0.09 ^① | 0.74 ± 0.14 ^① | 0.39 ± 0.11 ^① | 0.36 ± 0.03 ^① |
| tMCAO/R+Lv-scramble 组 | 6 | 0.46 ± 0.08 | 0.73 ± 0.14 | 0.29 ± 0.09 | 0.39 ± 0.08 |
| tMCAO/R+Lv-Robo4 组 | 7 | 0.32 ± 0.06 ^② | 0.47 ± 0.09 ^② | 0.56 ± 0.08 ^② | 0.54 ± 0.09 ^② |
| F 值 | | 35.612 | 26.742 | 33.621 | 26.390 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 tMCAO/R+Lv-scramble 组比较, $P < 0.05$ 。

达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), tMCAO/R 组较 Sham 组高, tMCAO/R + Lv-Robo4 组较 tMCAO/R + Lv-scramble 组低。见图 4 和表 3。

2.6 各组大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 水平比较

各组大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β



1: Sham 组; 2: tMCAO/R 组; 3: tMCAO/R + Lv-scramble 组; 4: tMCAO/R + Lv-Robo4 组。

图 4 各组大鼠 Notch-1、Hes1 和 Hes5 蛋白条带图

水平比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), tMCAO/R 组较 Sham 组高, tMCAO/R + Lv-Robo4 组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 水平较 tMCAO/R + Lv-scramble 组低, IL-10、TGF- β 水平较 tMCAO/R + Lv-scramble 组高。见表 4。

表 3 各组大鼠 Notch-1、Hes1 和 Hes5 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Notch-1 | Hes1 | Hes5 |
|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sham 组 | 9 | 0.31 ± 0.12 | 0.08 ± 0.03 | 0.05 ± 0.02 |
| tMCAO/R 组 | 7 | 0.93 ± 0.04 ^① | 0.32 ± 0.05 ^① | 0.37 ± 0.08 ^① |
| tMCAO/R + Lv-scramble 组 | 6 | 0.94 ± 0.13 | 0.38 ± 0.07 | 0.38 ± 0.06 |
| tMCAO/R + Lv-Robo4 组 | 7 | 0.73 ± 0.11 ^② | 0.24 ± 0.03 ^② | 0.17 ± 0.08 ^② |
| F 值 | | 61.751 | 62.823 | 50.012 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 tMCAO/R + Lv-scramble 组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 相对表达量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | TNF- α | IL-1 β | IL-10 | TGF- β |
|-------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Sham 组 | 9 | 56.29 ± 17.12 | 36.17 ± 16.91 | 52.38 ± 16.11 | 26.18 ± 4.19 |
| tMCAO/R 组 | 7 | 152.28 ± 19.76 ^① | 82.41 ± 17.28 ^① | 123.72 ± 20.38 ^① | 62.85 ± 8.62 ^① |
| tMCAO/R + Lv-scramble 组 | 6 | 141.51 ± 22.61 | 92.16 ± 16.37 | 118.32 ± 18.42 | 53.66 ± 4.25 |
| tMCAO/R + Lv-Robo4 组 | 7 | 101.22 ± 21.59 ^② | 48.49 ± 17.29 ^② | 192.13 ± 28.11 ^② | 80.15 ± 5.20 ^② |
| F 值 | | 37.220 | 18.094 | 58.622 | 122.201 |
| P 值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 tMCAO/R + Lv-scramble 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

CIRI 是一个复杂的病理、生理过程, 涉及到自由基的过度积累、钙超载、兴奋氨基酸的毒性作用、炎症反应和细胞炎症因子的大量释放, 以及细胞凋

亡的加剧等^[12]。目前, 普遍认为炎症在 CIRI 中起着关键作用, 其在脑缺血急性期会促进炎症级联反应, 进而引起脑水肿出血, 增加血脑屏障损伤, 促进更多神经元死亡^[13-14], 而在脑缺血晚期, 神经炎症通路对组织修复和功能恢复有益^[15-16]。而小胶质细胞

作为脑内的常驻免疫细胞被认为在炎症反应中发挥重要作用^[17]。当接触到内源性信号(如神经元死亡)或外源性刺激信号(如感染)时,脑损伤组织的小胶质细胞会激活和迁移,且伴随有炎症因子水平升高的迹象^[18]。激活的小胶质细胞有 M1 和 M2 两种极化表型: M1 型促炎小胶质细胞的吞噬作用减少,促炎介质分泌增加,而 M2 型抗炎小胶质细胞能清除缺血组织,并显著抑制脑损伤^[19]。与之一致,本研究结果中的 tMACO/R 组大鼠脑组织 M1 小胶质细胞标志物(iNOS 和 CD86)及 M2 小胶质细胞标志物(Arg-1 和 CD206)的蛋白相对表达量显著上升,说明小胶质细胞迁移至脑损伤组织并被激活。此外, tMACO/R 组大鼠脑组织炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 水平升高。在各种脑损伤发展过程中,免疫系统被激活,免疫细胞产生细胞因子参与协调脑损伤免疫反应。细胞因子通常分为促炎症因子,如 TNF- α 和 IL-1 β ,或抗炎因子,如 IL-10 和 TGF- β 。急性脑损伤后引起细胞因子发生动态变化,这些变化部分依赖于激活的小胶质细胞和巨噬细胞,其释放促炎因子和抗炎因子,促进或解决脑损伤后的炎症反应^[20]。因此,本课题组认为,在治疗脑缺血早期,通过改变小胶质细胞的极化状态,可能是一种有前景的脑缺血脑卒中的治疗策略,小胶质细胞也成为一个重要靶点。

Robo4 蛋白环作为一种跨膜受体,在一些血管疾病进展及炎症反应中起着重要作用^[21-22],参与多个生物学过程,如内皮细胞迁移、增殖和血管生成以及维持脉管系统稳态^[23-26]。但其在缺血性中风病理过程中的作用知之甚少。有研究表明,激活 Robo4-Paxillin 信号转导途径,将会减弱外科脑损伤诱导的血脑屏障破坏,并改善大鼠结局^[27]。而且 Robo4 作为炎症性疾病的潜在治疗靶点,被发现过表达 Robo4 可能抑制血管通透性改善败血症或传染病^[28]。本研究结果发现在 CIRI 24 h 后 Robo4 表达减少,说明 Robo4 可能在 CIRI 中发挥了重要作用。通过外源性于脑室内注入过表达 Robo4 慢病毒载体后,大鼠神经功能障碍得到明显改善,脑梗死面积显著变小。此外,笔者还发现,过表达 Robo4 抑制了 M1 小胶质细胞标志物表达及 IL-10、TGF- β 的表达,却促进了 M2 小胶质细胞标志物表达及 TNF- α 、IL-1 β 的表达。这表明 Robo4 抑制 M1 表型极化小胶质细胞,促进 M2 表型以限制炎症反应。笔者推测,

Robo4 可能通过影响 CIRI 后小胶质细胞活化后表型的动态变化,进一步影响血脑屏障的完整性,从而对 CIRI 具有神经保护作用。在后续研究中,本课题组将会特异性过表达大鼠脑组织小胶质细胞 Robo4,观察其对 CIRI 后血脑屏障破坏的作用,深入研究 Robo4 对 CIRI 神经保护作用的具体机制。

Notch 信号通路是与炎症反应相关的信号通路,与多种炎症性疾病如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、心肌炎发生、发展密切相关。本研究结果发现 Robo4 可以抑制 Notch 信号通路的异常激活。据报道,Notch 信号通路在 CIRI 后被激活,人脂氧素 A4 通过 Notch 信号通路发挥其抗炎作用^[29]。且 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 在模型建立前 3 h 对局灶性脑缺血/再灌注具有神经保护作用^[30]。与其一致的是,笔者发现,与 Sham 组相比, tMACO/R 组大鼠脑组织 Notch-1、Hes1 和 Hes5 蛋白表达水平显著升高,Notch 信号通路在 CIRI 后被异常激活。

综上所述,Robo4 可调控 CIRI 后小胶质细胞极化向 M2 表型转移,进而发挥小胶质细胞抗炎的神经保护作用,且可以调控 Notch 信号通路。

参 考 文 献 :

- [1] BENJAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2019, 139(10): e56-e528.
- [2] CHEN H A, MA Y H, HSU T Y, et al. Preparation of peptide and recombinant tissue plasminogen activator conjugated poly(lactico-glycolic acid) (plga) magnetic nanoparticles for dual targeted thrombolytic therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): DOI: 10.3390/ijms21082690.
- [3] ZHAO X, LI S, MO Y, et al. DCA protects against oxidation injury attributed to cerebral ischemia-reperfusion by regulating glycolysis through pdk2-pdh-nrf2 axis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: DOI: 10.1155/2021/5173035.
- [4] TANG C, HONG J, HU C, et al. Palmatine protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activation of the ampk/nrf2 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: DOI: 10.1155/2021/6660193.
- [5] JIAO Y, WANG J, ZHANG H, et al. Inhibition of microglial receptor-interacting protein kinase 1 ameliorates neuroinflammation following cerebral ischaemic stroke[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12585-12598.
- [6] AJOOLABADY A, WANG S, KROEMER G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107848.

- [7] 方莹莹, 张靖慧. 乳脂球-表皮生长因子8对脑缺血后小胶质细胞极化的调控作用机制研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2021, 43(7): 7.
- [8] XU X, GAO W, LI L, et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX-dependent AMPK-mTOR pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 119.
- [9] YE Y, JIN T, ZHANG X, et al. Meisoindigo protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting nlrp3 inflammasome activation and regulating microglia/macrophage polarization via TLR4/NF-kappaB signaling pathway[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 553.
- [10] XIAO W, PINILLA-BAQUERO A, FAULKNER J, et al. Robo4 is constitutively shed by ADAMs from endothelial cells and the shed Robo4 functions to inhibit Slit3-induced angiogenesis[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): DOI:10.1038/s41598-022-08227-8.
- [11] BU J, SHI S, WANG H Q, et al. Acacetin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(4): 605-612.
- [12] XIE W, ZHU T, DONG X, et al. HMGB1-triggered inflammation inhibition of notoginseng leaf triterpenes against cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK and NF-kappaB signaling pathways[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 512.
- [13] ZHU H, JIAN Z, ZHONG Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing nlrp3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714943.
- [14] YUAN J, LI L, YANG Q, et al. Targeted treatment of ischemic stroke by bioactive nanoparticle-derived reactive oxygen species responsive and inflammation-resolving nanotherapies[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(10): 16076-16094.
- [15] CAI W, HU M, LI C, et al. FOXP3+ macrophage represses acute ischemic stroke-induced neural inflammation[J]. *Autophagy*, 2023, 19(4): 1144-1163.
- [16] JURCAU A, SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 14.
- [17] LI X, LIAO Y, DONG Y, et al. Mib2 deficiency inhibits microglial activation and alleviates ischemia-induced brain injury[J]. *Aging Dis*, 2020, 11(3): 523-535.
- [18] XIA Q, ZHAN G, MAO M, et al. TRIM45 causes neuronal damage by aggravating microglia-mediated neuroinflammation upon cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 180-193.
- [19] LUO L, LIU M, FAN Y, et al. Intermittent theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NF-kappaB/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 141.
- [20] RODNEY T, TAYLOR P, DUNBAR K, et al. High IL-6 in military personnel relates to multiple traumatic brain injuries and post-traumatic stress disorder[J]. *Behavioural Brain Research*, 2020, 392: 112715.
- [21] GONG Q, LI F, XIE J, et al. Upregulated VEGF and Robo4 correlate with the reduction of miR-15a in the development of diabetic retinopathy[J]. *Endocrine*, 2019, 65(1): 35-45.
- [22] SHIRAKURA K, ISHIBA R, KASHIO T, et al. The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(1): DOI: 10.1242/jcs.220228.
- [23] TANG Y, ZHOU X. Antagonistic effects of exogenous Slit2 on VEGF-induced choroidal endothelial cell migration and tube formation[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2443-2450.
- [24] JIANG S, DU Y, LIU D, et al. Inhibitory effect of Slit2-N on VEGF165-induced proliferation of vascular endothelia via Slit2-N-Robo4-Akt pathway in choroidal neovascularization[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(11): 1241-1253.
- [25] ROMANO E, MANETTI M, ROSA I, et al. Slit2/Robo4 axis may contribute to endothelial cell dysfunction and angiogenesis disturbance in systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(11): 1665-1674.
- [26] SHIRAKURA K, ISHIBA R, KASHIO T, et al. Endothelial Robo4 regulates IL-6 production by endothelial cells and monocytes via a crosstalk mechanism in inflammation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 801-806.
- [27] SHERCHAN P, HUANG L, AKYOL O, et al. Recombinant slit2 reduces surgical brain injury induced blood brain barrier disruption via Robo4 dependent rac1 activation in a rodent model[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 746.
- [28] MORITA M, YONEDA A, TOKUNOH N, et al. Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and mortality in endotoxemia and COVID-19 models[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(3): e2213317120.
- [29] LI Q Q, DING D H, WANG X Y, et al. Lipoxin A4 regulates microglial M1/M2 polarization after cerebral ischemia-reperfusion injury via the Notch signaling pathway[J]. *Exp Neurol*, 2021, 339(11): 36-45.
- [30] WANG J J, ZHU J D, ZHANG X H, et al. Neuroprotective effect of Notch pathway inhibitor DAPT against focal cerebral ischemia/reperfusion 3 hours before model establishment[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(3): 452-461.

(李科 编辑)

本文引用格式: 曹天然, 刘青芳, 潘美民, 等. Robo4在脑缺血再灌注损伤大鼠小胶质细胞极化中的作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(18): 36-42.

Cite this article as: CAO T R, LIU Q F, PAN M M, et al. Role of Robo4 in the polarization of microglia after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its underlying mechanisms[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(18): 36-42.