

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2019)27-08-0674-06

## 从 ROR $\alpha$ 调控的小胶质细胞 M1/M2 表型转换的角度 探讨脑梗死发生的分子生物学机制

李 熹<sup>1</sup>, 张 旭<sup>2</sup>, 吴曙智<sup>3</sup>, 吴程程<sup>3</sup>, 王 笑<sup>3</sup>, 杨晓国<sup>3</sup>

(1. 温州医科大学温州市第三临床学院 温州市人民医院神经内科; 2. 温州医科大学附属第一医院神经内科;

3. 温州市人民医院神经内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] ROR $\alpha$ ; 小胶质细胞 M1; 小胶质细胞 M2; 脑梗死

[摘要] 目的 研究维甲酸相关孤儿核受体  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ) 调控小胶质细胞 M1/M2 表型转换在脑梗死发病中的作用机制。方法 ①定向诱导原代小胶质细胞向 M1/M2 型转化, Western blot 检测细胞内 ROR $\alpha$  及 M1 标记物诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、M2 标记物精氨酸酶 1 (Arg-1) 的表达。②建立大脑中动脉栓塞 (MCAO) 小鼠模型, Western blot 检测各个时间点 (6 h、24 h、3 天和 7 天) 脑组织中 iNOS、Arg-1、ROR $\alpha$  的表达。③小鼠侧脑室注射 ROR $\alpha$ -siRNA, 72 h 后构建 MCAO 模型, 缺血再灌注后 3 天, 神经行为学评分 (Longa 评分) 对脑功能进行评估, 取脑组织, Western blot 检测脑组织中 iNOS、Arg-1、ROR $\alpha$  的表达。④侧脑室注射 ROR $\alpha$  过表达慢病毒, 于 7 天后构建 MCAO 模型, 缺血再灌注后 3 天, 神经行为学评分 (Longa 评分) 评估小鼠脑功能。结果 脂多糖/ $\gamma$  干扰素 (LPS/IFN- $\gamma$ ) 可诱导小胶质细胞向 M1 型转化, 白细胞介素 4/白细胞介素 13 (IL-4/IL-13) 可诱导小胶质细胞向 M2 型转化, 与对照组比较, ROR $\alpha$  在 M2 型小胶质细胞中表达显著升高, 在 M1 型小胶质细胞表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。脑缺血再灌注后, 与假手术组比较, iNOS 在 6 h 明显升高并达到高峰, 随后表达逐渐下降, Arg-1 在 3 天、7 天逐渐升高, ROR $\alpha$  在脑缺血再灌注后 3 天达到最高, 7 天时明显降低, 说明脑缺血损伤后早期以 M1 型小胶质细胞为主, 脑缺血损伤晚期以 M2 型小胶质细胞为主, ROR $\alpha$  在脑缺血损伤中期即 M1/M2 型小胶质细胞共存期呈现高表达。下调 ROR $\alpha$  表达后, MCAO 小鼠神经行为学评分显著升高, 脑功能损伤较为严重。下调 ROR $\alpha$  后, Arg-1、ROR $\alpha$  蛋白表达量显著下降, 而 iNOS 蛋白表达明显增加; 上调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠神经行为学评分明显下降, 脑功能损伤得到改善; 过表达 ROR $\alpha$  后, Arg-1 的表达量显著升高, 而 iNOS 的表达明显较少。结论 ROR $\alpha$  可通过调控小胶质细胞由 M2 型向 M1 转化参与脑梗死后脑损伤机制。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

### The molecular biological mechanism of cerebral infarction based on the regulation of microglia M1/M2 phenotypic transformation by ROR $\alpha$

LI Xi<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>2</sup>, WU Shuzhi<sup>3</sup>, WU Chengcheng<sup>3</sup>, WANG Xiao<sup>3</sup>, YANG Xiaoguo<sup>3</sup>

(1. Wenzhou Third Clinical College of Wenzhou Medical University &amp; Department of Neurology, Wenzhou People's Hospital; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University; 3. Department of Neurology, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] ROR $\alpha$ ; microglial cell M1; microglial cell M2; cerebral infarction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of cerebral infarction on regulating microglia M1/M2 phenotypic transformation by retinoid acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ). **Methods** (1) Directionally transform microglia into the M1 state and the M2 state, the expression of ROR $\alpha$ , M1 marker inducible nitric oxide synthase (iNOS) and M2 marker arginase-1 (Arg-1) were detected by Western blot. (2) Middle cerebral artery embolism (MCAO) model were established, the protein expression of ROR $\alpha$ , iNOS, Arg-1 in brain tissues were detected by Western blot after ischemic brain injury at different time points (6 h, 24 h, 3 d and 7 d). (3) ROR $\alpha$ -siRNA was injected intracerebroventricularly of mice and MCAO model were established 72 h later, brain function was evaluated by neurobehavioral score (Longa

[收稿日期] 2019-02-03

[修回日期] 2019-04-02

[作者简介] 李熹, 主治医师, 研究方向为脑血管病、眩晕, E-mail 为 lixi265@126.com。通信作者张旭, 主任医师, 教授, 研究方向为脑血管病神经免疫疾病方向。

score), the protein expressions of iNOS, Arg-1 and ROR $\alpha$  in brain tissues were detected by Western blot. (4) ROR $\alpha$ -overexpressed lentivirus was injected intracerebroventricularly of mice, MCAO model were established 7 d later, brain function was evaluated by neurobehavioral score (Longa score), the protein expressions of iNOS, Arg-1 in brain tissues were detected by Western blot.

**Results** Microglia can transform to M1 state induced by LPS/IFN- $\gamma$  and transform to M2 state induced by IL-4/IL-13. Compared with the control group, ROR $\alpha$  expression was significantly increased in M2 state microglia and significantly decreased in M1 state microglia ( $P<0.01$ ). After cerebral ischemia reperfusion, compared with the Sham group, protein expression of iNOS were significantly increased and peaked in 6 h, then gradually decreased, protein expression of Arg-1 gradually increased in 3 d and 7 d, protein expression of ROR $\alpha$  were increased and peaked in 3 d, then significantly decreased in 7 d, the results suggested that M1 state microglia were dominant in cerebral ischemia injury early stage, and M2 state microglia were dominant in cerebral ischemia injury late stage, ROR $\alpha$  was highly expressed in the medium stage of cerebral ischemia reperfusion. After down-regulation of ROR $\alpha$  expression, the neurobehavioral score was significantly increased, brain function were injured seriously, the protein expression of Arg-1, ROR $\alpha$  were significantly decreased and the protein expression of iNOS were significantly increased in MCAO group. After up-regulation of ROR $\alpha$  expression, the neurobehavioral score of MCAO group were decreased significantly, the brain function injury was improved. The protein expression of Arg-1 were significantly increased and the protein expression of iNOS were significantly decreased in MCAO group.

**Conclusion** ROR $\alpha$  was involved in brain injury after cerebral infarction by regulating the transformation of microglia from M2 state to M1 state.

脑卒中是一种较为常见的神经系统疾病,具有较高的发病率、致残率、死亡率,其中约 87% 是缺血性卒中<sup>[1-2]</sup>。目前,脑梗死的发病率呈逐年升高,但由于其病后恢复时间长,预后不理想,给家庭带来很大的经济负担。维甲酸相关孤儿核受体  $\alpha$  (retinoid acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ , ROR $\alpha$ ) 是近年来研究较多的一种核受体,它在人体中枢包括小脑普肯耶细胞、嗅球、海马、丘脑、大脑皮层、下丘脑-视交叉上核、视网膜神经节细胞中均有不同程度的表达,具有多方面的生理功能。诸多研究显示, ROR $\alpha$  与体内其他生物活性因子共同调节细胞的生长、增殖、分化、凋亡<sup>[3-4]</sup>,参与调节多种组织器官的发育过程。本研究以调控 ROR $\alpha$  的表达为干预措施,从小胶质细胞 M1/M2 表型转化的角度探索 ROR $\alpha$  调控小胶质细胞 M1/M2 表型转换在缺血性脑损伤中的作用,为阐明缺血性脑损伤的其他关键分子和作用机制提供新的理论依据,也为其防治提供新的作用靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株与实验动物

小胶质细胞 BV2 细胞系,购于中科院上海细胞生物学研究所。无特定病原体 (SPF) 级健康成年 C57BL/6 小鼠,雌雄各半,体质量 22 ~ 25 g,自由饮食,温度 20 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 60%,适应性喂养 1 周后用于实验。

### 1.2 试剂与仪器

DMEM 细胞培养基及胎牛血清 (FBS) (Gibco &

Hyclone); 脂多糖 (LPS)、 $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素 13 (interleukin-13, IL-13) (美国 Sigma); RNA 提取试剂盒 (Promega); RIPA 裂解液 (南京碧云天生物技术有限公司); Trizol (日本 TaKaRa Bio 株式会社); PMSF (美国 Thermo Scientific 公司); ROR $\alpha$  基因沉默试剂盒及 ROR $\alpha$  基因过表达慢病毒 (Ambion); ECL 显影试剂盒 (Promega); Western blot 试剂盒 (赛默飞世尔科技中国有限公司); 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1)、ROR $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 一抗及 HRP 标记的二抗 (Millipore)。MCO175 型  $\text{CO}_2$  培养箱、荧光倒置显微镜及超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); 低温离心机 (Eppendorf 公司); 电热恒温水浴箱 (国华电器有限公司); 超净工作台 (德国 Heraeus 公司); Western blot 蛋白显影仪 (美国 Protein Simple 公司)。

### 1.3 小胶质细胞培养

复苏细胞,在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,1 ~ 2 天传代一次,取对数生长期的细胞接种于 6 孔板,调节其浓度均为  $5 \times 10^7/\text{L}$ ,待细胞生长至约 70% ~ 80% 时,更换培养液为普通培养基继续培养。

### 1.4 定向诱导激活小胶质细胞向不同功能活化状态转变

取对数生长期的的小胶质细胞分为对照组、LPS/IFN- $\gamma$  组和 IL-4/IL-13 组, LPS/IFN- $\gamma$  组在含 LPS/IFN- $\gamma$  (LPS 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ , IFN- $\gamma$  10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 的 DMEM 培

培养基中培养 24 h, 诱导小胶质细胞向 M1 型转变, IL-4/IL-13 组在含 IL-4/IL-13 (IL-4 10  $\mu\text{g/L}$ , IL-13 10  $\mu\text{g/L}$ ) 的 DMEM 培养基中培养 24 h, 诱导小胶质细胞向 M2 型转变, 对照组在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中正常培养 24 h; 采用 Western blot 检测细胞内 ROR $\alpha$  及 M1 型小胶质细胞标记物 iNOS、M2 型小胶质细胞标记物 Arg-1 的蛋白表达。

### 1.5 制备小鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery embolism, MCAO) 模型

C57BL/6 小鼠术前 12 h 禁食。腹腔注射 10% 水合氯醛将小鼠麻醉, 仰卧固定于恒温手术台, 剪掉颈部毛发, 碘伏消毒, 在颈部偏右行纵向切口, 钝性分离皮下组织, 依次分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。在颈总动脉分叉近端约 5 mm 处剪一小口, 将线栓插入颈内动脉, 感觉到有明显阻力时停止, 迅速结扎颈总动脉和颈外动脉, 然后将线栓与颈内动脉一起结扎固定, 逐层缝合, 碘伏消毒, 缺血 1 h 后拔出线栓进行再灌注。假手术组手术过程同模型组, 但是不插线栓。

**1.5.1 MCAO 模型小鼠 ROR $\alpha$ 、iNOS 和 Arg-1 蛋白表达情况** 将 50 只 C57BL/6 小鼠随机分为假手术 (Sham) 组 ( $n=10$ ) 和 MCAO 组 ( $n=40$ ), 其中 MCAO 组再次随机分为 4 组, 于缺血再灌注后 6 h、24 h、3 天、7 天分别取小鼠脑组织, Western blot 检测半暗带脑组织中 ROR $\alpha$ 、iNOS 和 Arg-1 蛋白表达。

**1.5.2 下调 ROR $\alpha$  表达对 MCAO 小鼠脑功能及 iNOS、Arg-1 蛋白表达的影响** 将 30 只 C57BL/6 小鼠随机分为 MCAO 组、siRNA 组和 scrRNA 组, MCAO 组按 1.5 项下方法造模; siRNA 组和 scrRNA 组侧脑室分别注射 ROR $\alpha$ -siRNA 和 control-siRNA, 并于 72 h 后建造 MCAO 模型, 于缺血后再灌注 3 天后取脑组织, Western blot 检测半暗带脑组织中 ROR $\alpha$ 、iNOS 和 Arg-1 蛋白表达, 并通过神经行为学评分 (Longa 评分) 对脑功能进行评估。

**1.5.3 上调 ROR $\alpha$  表达对 MCAO 小鼠脑功能及 iNOS、Arg-1 蛋白表达的影响** 将 20 只 C57BL/6 小鼠随机分为 MCAO 组和 LV+MCAO 组, MCAO 组按 1.5 项下方法造模; LV+MCAO 组侧脑室注射 ROR $\alpha$  过表达慢病毒, 并于 7 天后建造 MCAO 模型, 于缺血后再灌注 3 天后取脑组织, Western blot 检测半暗带脑组织中 iNOS、Arg-1 蛋白表达, 并通过神经行为学评分 (Longa 评分) 方法评估脑功能。

### 1.6 Western blot

**1.6.1 细胞蛋白提取及定量** 取定向诱导后的

小胶质细胞, 按照  $1 \times 10^7/\text{L}$  的密度接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后, 弃培养基, 离心, PBS 漂洗 3 次, 加入裂解液置冰上充分裂解, 14 000 r/min 离心 10 min (4  $^{\circ}\text{C}$ ), 吸取上清液即为蛋白质提取物, 采用 BCA 试剂盒测量蛋白质含量, 加蛋白上样缓冲液, 95  $^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min, 调整蛋白浓度后上样, SDS 凝胶电泳, 转移到 PVDF 上, 5% FBS 室温封闭, 加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TPBS 清洗, 加入抗鼠的 IgG 二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 加入 ECL, 在暗室中曝光显影。

**1.6.2 组织蛋白提取及定量** 取 MCAO 小鼠完整的脑组织置于小鼠脑槽中, 额叶前极向后 4 mm 作冠状面切片, 后数 4 mm 再次进行冠状切片, 两次冠状切片之间脑组织, 以脑中线腹侧一端为顶点, 右开 30 $^{\circ}$  切取, 即为缺血半暗带组织。1 g/L 组织蛋白裂解液匀浆脑组织, 加蛋白上样缓冲液, 95  $^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min, 调整蛋白浓度后上样, SDS 凝胶电泳, 转移到 PVDF 上, 5% FBS 室温封闭, 加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TPBS 清洗, 加入抗鼠的 IgG 二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 加入 ECL, 在暗室中曝光显影。

### 1.7 神经行为学评分

采用双盲法, 由其他知道实验分组的人员对 MCAO 小鼠进行神经行为学评分。Longa 评分标准: 0 分: 正常; 1 分: 左爪前爪不能完全伸直, 轻度神经功能缺损; 2 分: 行走时, 向左侧 (瘫痪侧) 转圈, 中度神经功能缺损; 3 分: 行走时, 向左侧 (瘫痪侧) 倾倒, 重度神经功能缺损; 4 分: 不能自发行走, 有意识丧失。

### 1.8 统计学方法

数据分析使用 SPSS19.0 数据包, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析及  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 体外定向诱导激活小胶质细胞后 iNOS、Arg-1 及 ROR $\alpha$ 蛋白表达

不同细胞因子定向诱导激活小胶质细胞 24 h 后, Western blot 检测 ROR $\alpha$  及 M1 型标记物 iNOS 和 M2 型标记物 Arg-1 表达, 结果表明, 与对照组比较, iNOS 在 LPS/IFN- $\gamma$  组表达最多, Arg-1 在 IL-4/IL-13 组表达最多, ROR $\alpha$  在 IL-4/IL-13 组表达显著升高, 在 LPS/IFN- $\gamma$  组表达显著降低 (图 1)。

### 2.2 ROR $\alpha$ 对 MCAO 小鼠脑功能的影响

**2.2.1 缺血再灌注损伤后不同时间点 iNOS、Arg-1、ROR $\alpha$  的表达变化** 与假手术组比较, iNOS 的

表达在脑缺血再灌注后 6 h 明显升高并达到高峰( $P < 0.01$ ),随后表达逐渐下降;Arg-1 的表达在脑缺血再灌注后 3 天、7 天显著升高( $P < 0.05$ );ROR $\alpha$  的表达在脑缺血再灌注后 3 天明显升高,在 7 天时却明显降低;说明脑缺血损伤早期以 M1 型小胶质细胞为主,所以 iNOS 表达在脑缺血再灌注后 6 h、24 h 显著升高,随着再灌注时间的延长其表达逐渐降低,脑缺血损伤晚期以 M2 型小胶质细胞为主,所以 Arg-1 表达在脑缺血再灌注后 7 天表达量达到最高, ROR $\alpha$  在缺血再灌注中期即 M1/M2 型小胶质细胞共存期呈现高表达(图 2)。

2.2.2 下调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠脑功能评价 侧脑室注射 ROR $\alpha$ -siRNA 72 h 后,与 MCAO 组相比,ROR $\alpha$ -siRNA 组小鼠神经行为学评分显著升高,脑功能损伤较为严重(图 3);抑制 ROR $\alpha$  表达后,ROR $\alpha$ 、Arg-1 蛋白表达明显下降,iNOS 蛋白表达明显增加(图 4)。

2.2.3 上调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠脑功能评价 与 MCAO 组相比,ROR $\alpha$  过表达慢病毒组神经行为学评分明显下降,表明通过上调 ROR $\alpha$  的表达可以改善 MCAO 小鼠的神经功能,发挥神经保护的作用(图 5)。过表达 ROR $\alpha$  后,Arg-1 的表达量显著升高,而 iNOS 的表达明显较少(图 6)。

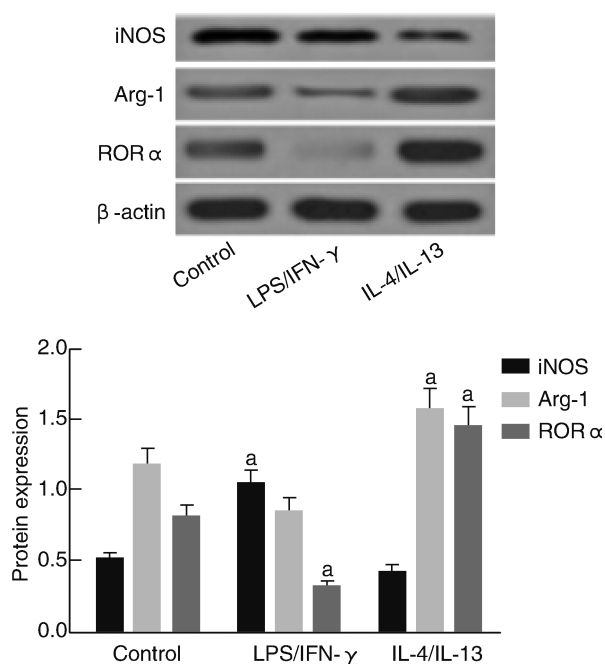


图 1. 定向诱导激活小胶质细胞后 iNOS、Arg-1 及 ROR $\alpha$  蛋白表达 a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 1. Protein expression of iNOS, Arg-1 and ROR $\alpha$  after targeted activation of microglia cells

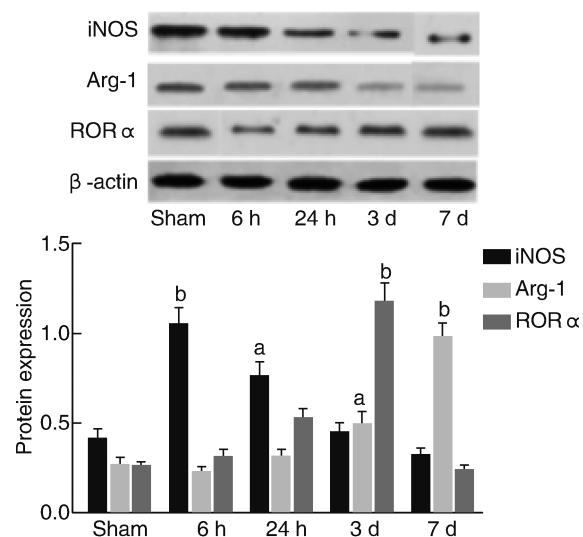


图 2. 缺血再灌注损伤后不同时间点 iNOS、Arg-1 和 ROR $\alpha$  蛋白表达 a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较。

Figure 2. Protein expression of iNOS, Arg-1 and ROR $\alpha$  at different time after ischemia reperfusion injury

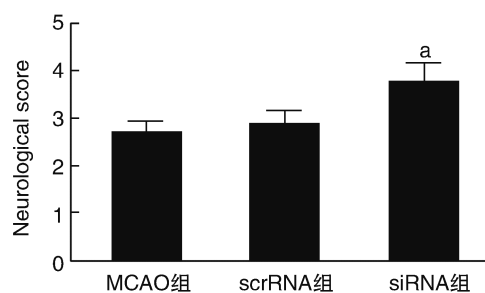


图 3. 下调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠神经行为学评分变化 a 为  $P < 0.01$ , 与 MCAO 组比较。

Figure 3. Neurobehavioral scores of MCAO mice after down-regulated ROR $\alpha$  expression

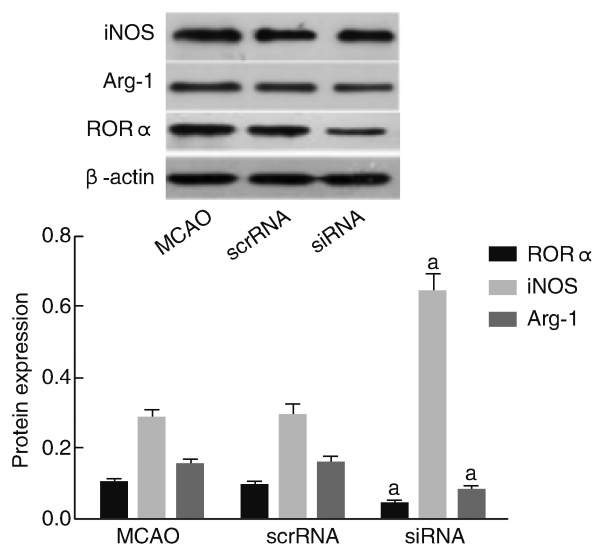


图 4. 下调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠 iNOS、Arg-1 和 ROR $\alpha$  蛋白表达 a 为  $P < 0.01$ , 与 MCAO 组比较。

Figure 4. Protein expression of iNOS, Arg-1 and ROR $\alpha$  in MCAO mice after down-regulated ROR $\alpha$  expression



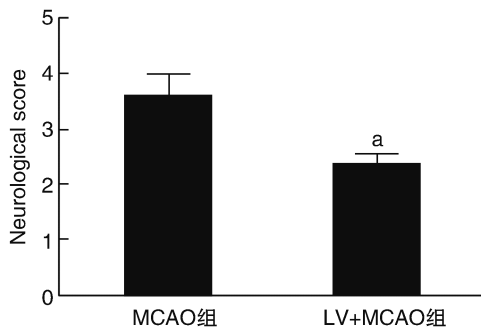


图5. 上调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠神经行为学评分变化  
a 为  $P < 0.01$ , 与 MCAO 组比较。

Figure 5. Neurobehavioral scores of MCAO mice after up-regulated ROR $\alpha$  expression

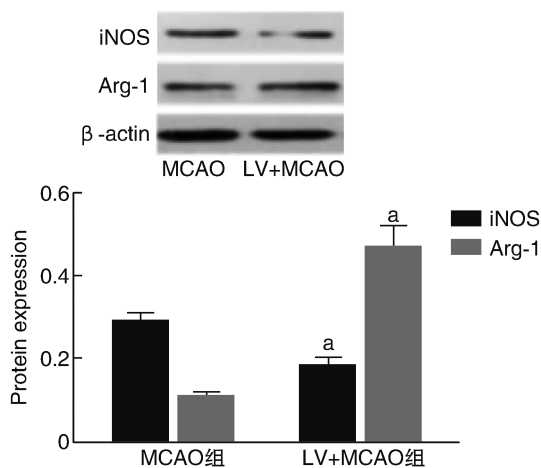


图6. 上调 ROR $\alpha$  表达后 MCAO 小鼠 iNOS、Arg-1 蛋白表达变化  
a 为  $P < 0.01$ , 与 MCAO 组比较。

Figure 6. Protein expression of iNOS, Arg-1 in MCAO mice after up-regulated ROR $\alpha$  expression

### 3 讨论

脑缺血损伤后的神经炎症是脑损伤病理发展重要部分,强烈的神经炎症会引发脑部的继发性损伤,所以抑制脑内神经炎症对脑梗死患者的治疗具有重要意义<sup>[5-6]</sup>。小胶质细胞是脑内固有的免疫细胞,参与神经炎症的发生过程<sup>[7-8]</sup>。脑缺血损伤后,会刺激小胶质细胞迅速由静息状态转化为活化状态,细胞形态和功能发生改变<sup>[9-10]</sup>。M1 型小胶质细胞会释放大量的氧自由基及促炎因子,破坏神经元的结构和功能<sup>[11-13]</sup>;M2 型小胶质细胞则会分泌抗炎因子及神经营养因子<sup>[14-15]</sup>,吞噬或清除坏死的神经元碎片<sup>[16-17]</sup>,起到保护神经元的作用<sup>[18-20]</sup>。因此,调控小胶质细胞的活化状态使其由 M1 型向 M2 型转换,减轻脑内神经炎症反应是防治脑缺血损伤的

新目标<sup>[21]</sup>。ROR $\alpha$  广泛分布于机体脑组织,包括丘脑、海马、大脑皮层、下丘脑-视交叉上核、视网膜神经节细胞等,在对抗心血管疾病尤其是动脉粥样硬化、慢性炎症、免疫功能不全、肿瘤等一些病理过程中发挥作用。研究显示,小鼠胚胎发育早期,ROR $\alpha$ 1 能够诱导普肯耶细胞树突分化,使幼稚的双极神经元逐步发育成为成熟的多极神经元<sup>[22]</sup>。另外,在炎症过程中发挥“负性调节”的有益作用<sup>[23]</sup>。

我们通过体外诱导小胶质细胞定向活化,结果发现,LPS/IFN- $\gamma$  诱导的小胶质细胞向 M1 型转变,IL-4/IL-13 诱导的小胶质细胞向 M2 型转变;检测 M1 型和 M2 型小胶质细胞中 ROR $\alpha$  的表达,结果显示,M2 型小胶质细胞中 ROR $\alpha$  表达较高,而 M1 型小胶质细胞中 ROR $\alpha$  表达较低,这提示 ROR $\alpha$  表达可能与小胶质细胞的活化状态有关,它可能是小胶质细胞 M1/M2 型表型转变的重要靶点。通过体外制造 MCAO 小鼠模型,检测缺血再灌注不同时间小胶质细胞 M1、M2 产物及 ROR $\alpha$  表达情况,结果显示,在脑缺血再灌注后 6 h、24 h,脑组织以 M1 型小胶质细胞为主,3 天时 M1/M2 型小胶质细胞共存,7 天时以 M2 型小胶质细胞为主。而 ROR $\alpha$  却是在脑缺血再灌注后 3 天时表达最高,此时正好是 M1/M2 型小胶质细胞共存并逐步由 M1 型向 M2 型转化的过渡期,与细胞实验的结果不完全相同,分析原因可能是脑缺血后 ROR $\alpha$  的表达受到体内其他因素的影响。当通过注射 siRNA 下调 ROR $\alpha$  的表达后,MCAO 小鼠神经行为学评分显著升高,ROR $\alpha$ 、Arg-1 蛋白表达明显下降,iNOS 蛋白表达明显增加,这说明下调 ROR $\alpha$  的表达会加重缺血再灌注后神经功能的损伤;侧脑室注射 ROR $\alpha$  过表达慢病毒后,MCAO 小鼠神经行为学评分显著降低,Arg-1 蛋白表达明显增加,iNOS 蛋白表达明显降低,这提示上调 ROR $\alpha$  的表达后对缺血再灌注后神经功能有保护作用。

综上所述,小胶质细胞 M1 型向 M2 型的转化在改善缺血性脑损伤中发挥重要作用,而 ROR $\alpha$  作为调控小胶质细胞 M1/M2 表型转换的新靶点分子为探索脑梗死的作用机制提供了新的研究方向,也为其防治提供了新的作用靶点。

### [参考文献]

- [1] Wang Y, Zhang S. Guidelines for the second level prevention of ischemic stroke and transient ischemic attack in China 2010 [J]. Chin J Neurol, 2010, 43 (2): 154-160.
- [2] Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in

- acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 869-881.
- [3] Moretti RM, Montagnani Marelli M, Sala A, et al. Activation of the orphan nuclear receptor ROR  $\alpha$  counteracts the proliferative effect of fatty acids on prostate cancer cells: crucial role of 5-lipoxygenase [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(1): 87-93.
- [4] Laitinen S, Staels B. Potential roles of ROR- $\alpha$  in cardiovascular endocrinology [J]. *Nucl Recept Signal*, 2003, 1: e011.
- [5] Ryou M. Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway [J]. *Stroke*, 2012, 43(4): 1101-1107.
- [6] Marks MP, Lansberg MG, Mlynash M, et al. Effect of collateral blood flow on patients undergoing endovascular therapy for acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(4): 1035-1039.
- [7] Hu X, Liou AK, 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.
- [8] Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, 7(12): 1028-1048.
- [9] Chhor V, Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarized primary microglia in vitro [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 32: 70-85.
- [10] Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 49: 233-245.
- [11] Hu X, Leak RK, Shi Y, et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(1): 56-64.
- [12] Eyo UB, Dailey ME. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(3): 494-509.
- [13] Fonseca AC, Matias D, Garcia C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 1-13.
- [14] Szalay G, Martinecz B, Lenart N, et al. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11499-11514.
- [15] 纪原, 杨碧莹, 黄小雄, 等. 小鼠脑梗死后小胶质细胞内 Toll 样受体 9 选择性上调 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1): 110-116.
- [16] Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bergersen LH, et al. The glia doctrine: addressing the role of glial cells in healthy brain ageing [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134(10): 449-459.
- [17] Lu YB, Pannicke T, Wei EQ, et al. Biomechanical properties of retinal glial cells: comparative and developmental data [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 113: 60-65.
- [18] 王建平, 陈明, 蒋超, 等. 骨髓单个核细胞移植在脑梗死大鼠脑内分化为小胶质样细胞的实验研究 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(9): 1406-1408.
- [19] Surace MJ, Block ML. Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2409-2427.
- [20] Ma Y, Wang J, Wang Y, et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 82(15): 30070-30078.
- [21] Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives" [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(4): 753-764.
- [22] Boukhtouche F, Janmaat S, Vodjdani G, et al. Retinoid-related orphan receptor  $\alpha$  controls the early steps of purkinje cell dendritic differentiation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(5): 1531-1538.
- [22] Zhao X, Wang H, Sun G, et al. Neuronal interleukin-4 as a modulator of microglial pathways and ischemic brain damage [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(32): 11281-11291.
- [23] Liu X, Liu J, Zhao S, et al. Interleukin-4 is essential for microglia/macrophage M2 polarization and long-term recovery after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 498-504.
- (此文编辑 许雪梅)