

• 论 著 •

# 芬戈莫德调控小胶质细胞表型转化 对少突胶质前体细胞的影响

李瑾 樊文慧 杨园 潘邓记

**【摘要】 目的** 研究芬戈莫德(FTY720)对原代培养的小胶质细胞表型的影响及干预后的小胶质细胞对少突胶质前体细胞分化成熟的影响。**方法** 体外培养原代小胶质细胞及少突胶质前体细胞(OPCs),采用 RT-PCR 法检测 FTY720 干预后小胶质细胞 M1 及 M2 型指标的变化;ELISA 法检测小胶质细胞上清 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 分泌量的变化;将干预后的小胶质细胞上清液加入纯化后的少突胶质前体细胞中采用 Olig2 与 MBP 共染免疫荧光染色方法观察 FTY720 对少突胶质前体细胞分化成熟的影响。**结果** 向 M2 型转化;FTY720 干预后的小胶质细胞促进少突胶质前体细胞的分化成熟。**结论** FTY720 通过促进小胶质细胞向 M2 型转化,从而促进少突胶质前体细胞的分化。

**【关键词】** FTY720 小胶质细胞 表型转化 少突胶质前体细胞

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0383-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.001

**The effect of Fingolimod-mediated microglial polarization on oligodendrocyte precursor cells** Li Jin, Fan Wenhui, Yang Yuan, et al. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of S1P receptor agonist Fingolimod (FTY720) on microglial polarization and the effect of FTY720-mediated microglia polarization on maturation of oligodendrocyte precursor cells. **Methods** RT-PCR was used to examine the polarization of microglia in vitro. ELISA was used to detect the supernatant of microglial cells in order to measure the levels of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  and IL-13. The supernatant of microglial cells was added to the purified oligodendrocyte precursor cells, and then the differentiation of oligodendrocyte precursor cells was detected by immunofluorescence staining. **Results** FTY720 promoted the microglia toward M2 polarization, promotes differentiation of oligodendrocyte. **Conclusion** FTY720 promoted the differentiation of oligodendrocyte precursor cells by promoting the microglia toward M2 polarization.

**【Key words】** FTY720 Microglial polarization Oligodendrocyte precursor cells

小胶质细胞是中枢神经系统中定居的巨噬细胞,是对抗损伤的第一道防线<sup>[1-2]</sup>。小胶质细胞在中枢神经系统中调节免疫和炎症反应。对各种微环境信号小胶质细胞可以表达特定的功能反应程序,存在两种极化状态<sup>[3-4]</sup>,即经典(促炎,M1)型及替代(抗炎,M2)型,参与组织的修复或损伤过程<sup>[5-7]</sup>。小胶质细胞表型主要呈现为各种细胞表面受体的表达及特定功能的可溶性细胞因子等及释放;在 LPS 和 IFN- $\gamma$  的刺激下小胶质细胞可以极化 M1 型小胶

质细胞(促炎型、经典激活型),而在 IL-4 刺激下小胶质细胞可以极化为 M2 型小胶质细胞(抗炎型、替代激活型)。M1 型小胶质细胞可以分泌各种炎症因子如 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2, 及 CXCL10, 还可以分泌 ROS, NO 和基质金属蛋白酶-9、基质金属蛋白酶-3<sup>[8-12]</sup>。M1 型小胶质细胞的功能是抗原提呈作用并杀伤细胞内的病原体以维持环境稳态<sup>[13]</sup>。M2 型小胶质细胞表现为 Arginase-1, Ym1, IGF-1, CD206 等表达水平增高,主要抑制炎症反应和发挥神经保护作用<sup>[14-15]</sup>。

芬戈莫德(Fingolimod, FTY720)作为一种口服的免疫抑制剂,被美国食品和药物管理局批准作为

基金项目:国家自然科学基金项目(NSFC) 81571206 资助

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

多发性硬化的一线治疗药物<sup>[16]</sup>;在多发性硬化动物模型中通过促进少突胶质细胞生长、成熟及髓鞘再生而发生保护作用<sup>[17]</sup>。最近研究表明,FTY720 在脑血管疾病中也可以发挥抗炎和神经保护作用<sup>[18-19]</sup>。本研究通过体外培养原代小胶质细胞及少突胶质前体细胞(OPCs),探讨 FTY720 对小胶质细胞表型的调控,进而观察不同表型的小胶质细胞对少突胶质前体细胞分化成熟的影响,并探讨 FTY720 发挥中枢神经损伤后髓鞘修复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生 0~3 d 的 SPF 级 C57 乳鼠,从华中科技大学附属同济医学院动物实验中心获得。

1.2 主要试剂 FTY720(美国 Cayman 生物公司),LPS、T3(Sigma 公司),IL-4、IFN- $\gamma$ 、Human PDGF-AA、Mouse-FGF-Basic、Mouse-CNTF(Peorotech 公司),N2 supplement (100  $\times$ ),B27supplement (50 $\times$ )(GIBCO 公司),DMEM/F12 细胞培养基,DMEM/F12 高糖培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(四季青公司),多聚 L- 赖氨酸(PLL, Sigma 公司),兔抗小鼠 Olig2 多克隆抗体(Millipore 公司),兔抗 Iba-1 单克隆抗体(wako 公司),大鼠抗 MBP 单克隆抗体小鼠(Millipore 公司),IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  ELISA 检测试剂盒(深圳达科为公司),小鼠 IL-13 ELISA 检测试剂盒购自(Abcam 公司),Trizol Reagent(Invitrogen 公司),逆转录 kit、SYBR gene PCR Master Mix (TOYOBO 公司),引物 GAPDH(武汉谷歌生物公司)。

1.3 Real-time PCR 引物见表 1

1.4 方法

1.4.1 混合胶质细胞原代培养 根据文献<sup>[24-25]</sup>方

法改进,原代培养小鼠小胶质细胞及少突胶质前体细胞。取出生 0~3 d 的 C57 乳鼠,在无菌条件下取出小鼠全脑,去脑膜和血管,PBS 液冲洗后留大脑半球及中脑,保留胼胝体,放入预先已加入 2 mL PBS 液中,剪碎后加入 2 mL 0.25%的胰酶,在 37  $^{\circ}$ C 条件下消化 15 min,用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,终止消化后用 200 目钢丝筛网过滤细胞悬液,800 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心过滤后的细胞悬液 8 min,弃去上清后用含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬沉淀的细胞,按照 106 密度将细胞悬液接种于 T75 细胞培养瓶中,95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 的 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养,每 3~4 d 换液 1 次(更换为含 20%胎牛血清 DMEM/高糖培养基),当细胞 100%汇合后进行下面的分离纯化步骤。

1.4.2 小胶质细胞及少突胶质前体细胞的分离纯化 原代培养的混合胶质细胞长满后拧紧瓶盖,放到恒温水平摇床上振摇纯化小胶质细胞,37  $^{\circ}$ C 下 250 r/min 震摇 1.5 h,取振摇后的细胞上清 4  $^{\circ}$ C 800 r/min 离心 8 min,弃上清,用含 20%胎牛血清的 DMEM/高糖培养基重悬细胞,接种于 6 孔培养板或铺有盖玻片(多聚赖氨酸包被)24 孔板中,用于下游实验。分离后的小胶质细胞使用 Iba1(1:200)抗体进行免疫荧光法检测纯度。按上述方式纯化小胶质细胞后更换培养基,继续 37  $^{\circ}$ C 恒温摇床振摇(180 r/min,18 h),然后按照差速贴壁方法去除多余的星形胶质细胞及小胶质细胞,后将悬浮细胞 800 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 8 min,弃上清,用 OPCs 培养基重悬细胞沉淀,细胞按 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 密度接种于铺有用多聚赖氨酸包被过的盖玻片的 24 孔板中,分离后的 OPCs 细胞使用 Olig2(1:200)抗体进行免疫荧光法检测纯度。纯化 3 d 后的 OPCs 细胞更换为分化培养基及干预培养基,诱导分化 3 d,收集细胞爬片用于免疫荧光染色。

表 1 Real-time PCR 引物

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	AGGAGCGAGACCCCACTAACA	AGGGGGGCTAAGCAGTTGGT
iNOS <sup>[20]</sup>	GCTTGCTCTGGGTCTCTCTG	CTCACTGGGACAGCACAGAA
CD32 <sup>[21]</sup>	AATCCTGCCGTTCTACTGATC	GTGTCACCGTGCTTCTCTTGAG
CD86 <sup>[21]</sup>	GACCGTTGTGTGTGTTCTGG	GATGAGCAGCATCACAAAGGA
TNF- $\alpha$ <sup>[22]</sup>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
IL-1 $\beta$ <sup>[22]</sup>	TGTCCTTGGCCGAGGACTAAGG	TGGGCTGGACTGTTCTTAATGC
CD206 <sup>[23]</sup>	TCAGCTATTGGACGCGAGGCA	TCCGGGTTGCAAGTTGCCGT
Arg1 <sup>[23]</sup>	TTAGGCCAAGGTGCTTGCTGCC	TACCATGGCCCTGAGGAGGTTT
IL-10 <sup>[23]</sup>	GGCAGAGAACCATTGGCCCAGAA	AATCGATGACAGCGCCTCAGCC
TGF- $\beta$ <sup>[21]</sup>	TGCGCTTGCAGAGATTAATAA	CGTCAAAAGACAGCCACTCA
Ym1/2 <sup>[23]</sup>	ACCCCTGCCTGTGTACTCACCT	CACTGAACGGGGCAGGTCCAAA

### 1.4.3 小胶质细胞及少突胶质前体细胞的干预

(a)纯化后的小胶质细胞种植于 6 孔板中 24 h 后按如下分组进行干预:未刺激组(M0 组),LPS + IFN $\gamma$  组(M1 组),LPS plus IFN $\gamma$  + FTY720 组,IL-4 组(M2 组),干预 24 h 后收集细胞及细胞上清用于下游实验;(b)纯化 3 d 后的 OPCs 细胞用干预后的小胶质细胞上清(MG 培养基)和 OPCs 分化培养基(比例为 1:1)培养 3 d,分组如下:OPCs 分化培养基组;M0 小胶质细胞上清液 + OPCs 分化培养基;M1 小胶质细胞上清液 + OPCs 分化培养基;M1 + FTY720 小胶质细胞上清液 + OPCs 分化培养基;M1 小胶质细胞上清液 + 单独预处理后的 FTY720 培养基 + OPCs 分化培养基;M2 小胶质细胞上清液 + OPCs 分化培养基,OPCs 细胞干预 3 d 后收集细胞爬片用于免疫荧光染色。

1.4.4 免疫荧光染色 干预后的小胶质细胞及 OPCs 细胞,按以前的方法<sup>[26]</sup>,弃去上清,以 4%多聚甲醛固定 15 min 后用 0.25% Triton X-100 破膜液室温破膜 15 min,再用封闭液(PBS 含 1%BSA,0.1% Triton)室温下封闭 60 min,加入兔抗小鼠 Iba1 抗体(1:200)、兔抗小鼠 Olig2 抗体(1:200)、大鼠抗小鼠 MBP 抗体(1:200)4 °C 孵育过夜,用 PBS 洗 3 遍,每遍 10 min,之后以相应的二抗(Cy3 标记的山羊抗兔 IgG、Cy3 标记的山羊抗大鼠 IgG、FITC 标记的驴抗兔 IgG 1:200)室温下避光孵育 1 h,PBS 洗 3 遍,每遍 10 min;DAPI 染色 10 min,PBS 洗 3 遍,每遍 10 min;甘油封片,荧光倒置显微镜下观察。

1.4.5 RT-PCR 小胶质细胞干预 24 h 后弃去培养基,按照先前的方法<sup>[27]</sup>用 Trizol 溶液裂解细胞提取 RNA。提取出的 RNA 按照逆转录试剂盒说明书方法将 RNA 逆转录为 cDNA,然后将逆转录出的 cDNA 用实时荧光定量试剂盒检测 mRNA 的表达水平,以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAD1PH)作为内参对照。反应参数:94 °C 预变性 10 min;(94 °C 变性 45 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s)×35 个循环;72 °C 延伸 10 min。每个样本设置 3 个复孔,CT 值代表荧光实时定量 PCR 的水平, $\Delta CT = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因})$ , $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{实验组}) - \Delta CT(\text{对照组})$ 。根据公式可以算出各组细胞中目的基因表达/对照组细胞中目的基因表达 =  $2 - \Delta\Delta CT$ <sup>[28]</sup>。

1.4.6 ELISA 小胶质细胞干预 24 h 后收集细胞

上清液,按照试剂盒说明书检测上清液中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-13、IL-1 $\beta$  的表达水平,显色后在酶标仪 450 nm 处测吸光度值,建立标准曲线,根据标准曲线计算表达水平。

### 1.4.7 统计学处理法

采用实验数据用均数  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SEM)表示,SPSS 19.0 进行单因素方差分析及 t 检验,组间比较用 SNK 法。以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小胶质细胞及少突胶质前体细胞的鉴定

采用 Iba1 与 DAPI 免疫荧光共染法鉴定小胶质细胞的纯度显示小胶质细胞的纯度可达 99%;Olig2 与 DAPI 免疫荧光共染法鉴定 OPCs 的纯度显示 OPCs 的纯度可达 95%(图 1)。

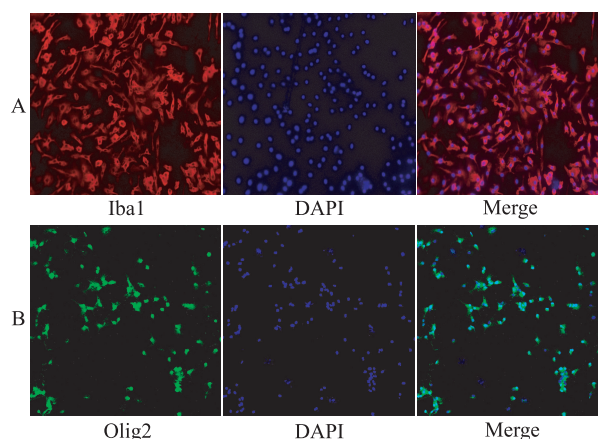


图 1 免疫荧光双标染色技术鉴定小胶质细胞及 OPCs 的纯度 A 为 Iba1 与 DAPI 共染鉴定小胶质细胞纯度;B 为 Olig2 与 DAPI 共染鉴定 OPCs 纯度

### 2.2 FTY720 在体外细胞实验中对小胶质细胞表型的影响

通过 RT-PCR 检测显示:LPS + IFN $\gamma$  + FTY720 干预较 LPS + IFN $\gamma$  刺激组的 M1 型小胶质细胞生物学标志物 iNOS,CD86,TNF- $\alpha$ ,CD32 及 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达水平低,LPS + IFN $\gamma$  + FTY720 干预较 LPS + IFN $\gamma$  刺激组 M2 型小胶质细胞生物学标志物 Arg 1,CD206,YM,IL-10,TGF- $\beta$  的 mRNA 表达水平高;与 IL-4 组比较,这 2 组的 M1 型小胶质细胞生物学标志物 mRNA 表达水平都较之要高,而 M2 型小胶质细胞生物学标志物的 mRNA 表达水平较之要低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (表 2)。

表 2 在体外细胞实验中 FTY720 干预后小胶质细胞细胞表型的变化(Mean ± SEM,pg/mL)

基因	Control 组	LPS + IFN-γ 组	LPS + IFN-γ + FTY720 组	IL-4 组
CD86	1 ± 0 *	2. 971777 ± 0. 6549359	0. 9998289 ± 0. 2248772 *	0. 8021957 ± 0. 3397692 *
iNOS	1 ± 0 ▲	4. 176164 ± 0. 8275524	1. 23427 ± 0. 3994419 ▲	0. 9370453 ± 0. 4881037 ▲
TNF-α	1 ± 0 ▲	5. 49792 ± 0. 9229126	0. 7843879 ± 0. 2663897 ▲	0. 6337013 ± 0. 4255075 ▲
CD32	1 ± 0 ▲	4. 636551 ± 0. 9690894	0. 3655023 ± 0. 0893112 ▲	0. 944936 ± 0. 2215768 ▲
IL-1β	1 ± 0 ▲	3. 856371 ± 0. 6554904	1. 023094 ± 0. 2999669 ▲	0. 5046939 ± 0. 3019959 ▲
TGF-β	1 ± 0 ▲	0. 1758362 ± 0. 0808361	0. 755604 ± 0. 09073149 ▲	0. 9360008 ± 0. 1473853 ▲
YM	1 ± 0 ▲	0. 08195385 ± 0. 0301677	0. 4452601 ± 0. 170769 ▲	0. 795934 ± 0. 1814501 ▲
Arg-1	1 ± 0 *	0. 5906761 ± 0. 1297177	1. 199706 ± 0. 1962038 *	1. 401392 ± 0. 2967001 *
CD206	1 ± 0	0. 761198 ± 0. 3878063	1. 091114 ± 0. 2201486	2. 299029 ± 0. 6269802
IL-10	1 ± 0	0. 8622167 ± 0. 286	1. 128319 ± 0. 221	1. 487014 ± 0. 228

注:与 LPS + IFN-γ 组比较, \*  $P < 0. 05$ , ▲  $P < 0. 01$

2. 3 FTY720 在体外细胞实验中对小胶质细胞上清液炎症因子表达水平的影响

LPS + IFN $\gamma$  + FTY720 干预较 LPS + IFN $\gamma$  刺激组的炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  表达水平显著降低,炎症细胞因子 TGF- $\beta$ , IL-13 表达水平显著增高( $P < 0. 05$ 或  $P < 0. 01$ )(表 3)。

2. 4 小胶质细胞表型转化对少突胶质细胞前体细

胞分化成熟的影响

M1(LPS + IFN- $\gamma$ ) + FTY720 干预后的小胶质细胞条件培养基后的 OPCs 分化较用 M1 型小胶质细胞条件培养基干预的 OPCs 分化增多,提示 FTY720 通过促进 M1 型小胶质细胞向 M2 型小胶质细胞转化而促进 OPCs 的分化(图 2,表 4)。

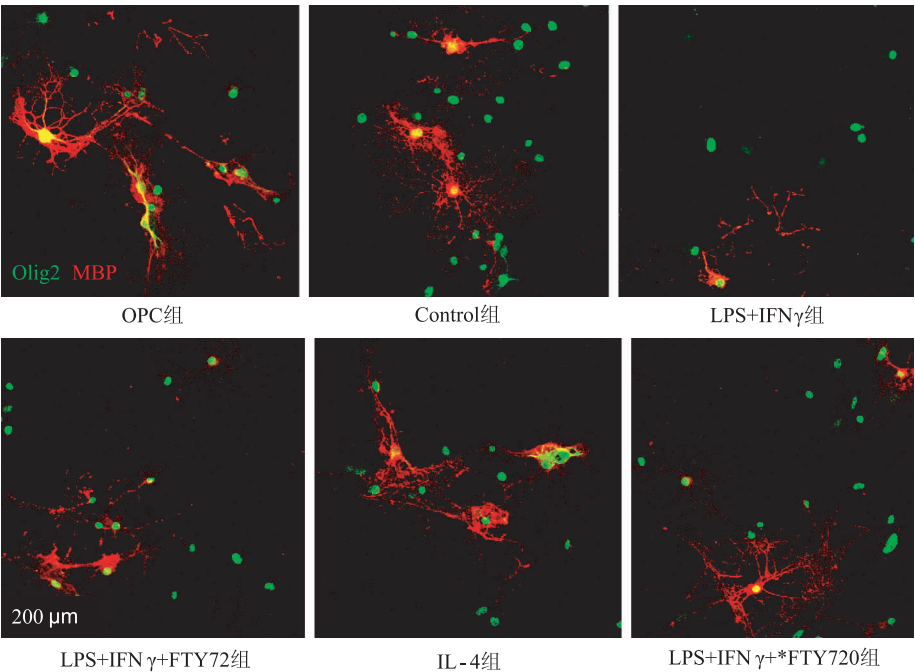


图 2 在体外细胞实验中 FTY720 干预后的小胶质细胞对 OPCs 分化成熟的影响(MBP 与 Olig2 免疫荧光双标染色)

表 3 在体外细胞实验中 FTY720 干预后小胶质细胞上清释放的炎症因子表达水平的改变(Mean ± SEM,pg/mL)

炎症因子表达水平	Control 组	LPS + IFN-γ 组	LPS + IFN-γ + FTY720 组	IL-4 组
TNF-α	172. 5908 ± 17. 04447 *	1529. 932 ± 114. 1856	225. 1927 ± 20. 04877 ▲	35. 13943 ± 3. 98123 ▲
IL-1β	27. 58614 ± 5. 470443 *	93. 77435 ± 16. 80561	38. 77996 ± 8. 288908 #	13. 69465 ± 4. 368696 ▲
TGF-β	252. 9484 ± 17. 31818 *	150. 7022 ± 27. 55055	322. 425 ± 19. 82601 ▲	420. 8093 ± 28. 27643 ▲
IL-13	310. 5913 ± 9. 864168 #	264. 0796 ± 9. 920721	313. 5777 ± 8. 882356 ▲	321. 4216 ± 9. 108376 ▲

注:与 LPS + IFN-γ 组比较, \*  $P < 0. 01$ , ▲  $P < 0. 01$ , #  $P < 0. 05$

表 4 在体外细胞实验中 FTY720 干预后的小胶质细胞对 OPCs 分化成熟的影响 (Mean ± SEM, %)

指标	OPC 组	Control 组	LPS+ IFN-γ 组	LPS+ IFN-γ + FTY720 组	IL-4 组	LPS+ IFN-γ + * FTY720 组
OLIG2 + MBP 双标	20. 73585 ±	15. 59037 ±	5. 517816 ±	14. 93829 ±	18. 07218 ±	6. 660631 ±
	3. 139993 *	0. 5472532	1. 081617	1. 889179▲	1. 268212	1. 043561▲

注:与 Control 组比较, \*  $P<0. 01$ ;与 LPS + IFN-γ 组比较,▲ $P<0. 01$

3 讨 论

神经炎症被认为是慢性脑灌注不足动物模型中白质损伤的关键病理生理学<sup>[22]</sup>,小胶质细胞在脑白质损伤中是一把双刃剑,在中枢神经系统中调节免疫和炎症反应。小胶质细胞存在两种极化状态<sup>[3-4]</sup>,即经典(促炎,M1)型及替代(抗炎,M2)型,通过产生促炎/抗炎因子而发挥神经损伤/保护作用。

有研究表明芬戈莫德(FTY720)通过防止淋巴细胞从淋巴结中排出而减少循环淋巴细胞的数量,并且可能有助于防止淋巴细胞早期浸润到脑中以及抑制小胶质细胞和巨噬细胞的局部活化。

本研究通过体外培养原代小胶质细胞和少突胶质前体细胞(OPCs),再通过 LPS + IFN-γ 刺激纯化后的小胶质细胞促使小胶质细胞活化为经典的 M1 型,用 FTY720 干预后通过 RT-PCR 技术检测小胶质细胞表型标记物显示 FTY720 干预后小胶质细胞的 M1 型标志物减少而 M2 型标志物增多,表明 FTY720 促使小胶质细胞向 M2 型转化。采用 ELISA 法检测小胶质细胞上清液中的炎性因子的表达水平,结果显示 FTY720 干预后炎性因子 TNF-α,IL-1β 的分泌减少,而 TGF-β,IL-13 的分泌增多。说明 FTY720 可以减少炎性因子的释放,增多抗炎性因子的释放,减轻了神经炎症反应。将小胶质细胞上清液加到纯化后的少突胶质前体细胞(OPCs)中干预 3 d 后采用免疫荧光染色方法探讨 FTY720 干预后小胶质细胞对 OPCs 的影响,结果显示 FTY720 干预后的小胶质细胞上清液促进 OPCs 的分化成熟,从而减轻脑白质的损伤。以上研究结果表明小胶质细胞的表型转化对少突胶质前体细胞(OPCs)的分化成熟有影响。但是关于影响小胶质细胞表型转化进而影响少突胶质细胞的机制尚不清晰,所以还需要进一步实验探讨。

参 考 文 献

[1] Hu,X,Liou,et al. Neurobiology of microglial action in CNS injuries:receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles[Z],2014:60-84.

[2] Prinz MM,Brain Macrophages in the Molecular Age:From Origin to Neuropsychiatric Disease. Nat[J]. Rev Neurosci,2014, 15(5):300-312.

[3] 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.

[4] Murray PJ,Allen JE,Biswas SK,et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity,2014,41(1):14-20.

[5] Porta C,Rimoldi M,Raes G,et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(35):14978-14983.

[6] Ajmone-Cat MA,Mancini M,Simone RD,et al. Microglial polarization and plasticity:evidence from organotypic hippocampal slice cultures[J]. Glia,2013,61(10):1698-1711.

[7] David S,Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury[J]. Nat Rev Neurosci,2011, 12(7):388-399.

[8] Kettenmann H,Hanisch UK,Noda MA. Physiology of microglia[J]. Physiol Rev,2011,91(2):461-553.

[9] MacMicking,J,Xie,et al. Nitric oxide and macrophage function [J]. Annu Rev Immunol,1997,15:323-350.

[10] Saijo K,Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease[J]. Nat Rev Immunol,2011,11(11):775-787.

[11] Varnum MM,Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2012,60(4):251-266.

[12] Yenari,M A,Kauppinen,et al. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. Neurotherapeutics [J]. Neurotherapeutics,2010,7(4):378-391.

[13] Cherry,D J,Olschowka,et al. Neuroinflammation and M2 microglia:the good,the bad[Z],2014:98.

[14] Latta CH,Sudduth TL,Weekman EM,et al. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid-beta using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice[J]. J Neuroinflammation,2015,4(12):41.

[15] Mecha M,Feliú A,Carrillo-Salinas FJ,et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia [J]. Brain Behav Immun,2015,10(49):233-245.

[16] Brinkmann V,Billich A,Baumrucker T,et al. Fingolimod[J]. Reactions Weekly,2014,1520(1):108-108.

[17] Miron VE,Ludwin SK,Darlington PJ,et al. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices[J]. Am J Pathol,2010,176(6): 2682-2694.

(上接第 387 页)

- [18] Ying F, Hao JW, Zhang NN, et al. Fingolimod for the treatment of Intracerebral hemorrhage A 2-Arm Proof-of-Concept Study[Z], 2014:1065.
- [19] Fu Y, Zhang N, Ren L, et al. Impact of an immune modulator fingolimod on acute ischemic stroke[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(51):18315-18320.
- [20] Nayak D, Huo Y, Kwang WX, et al. Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia[J]. Neuroscience, 2010, 166(1):132-144.
- [21] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2012, 43(11):3063-3070.
- [22] Xu Y, Qian L, Zong G, et al. Class a scavenger receptor promotes cerebral ischemic injury by pivoting microglia/macrophage polarization[J]. Neuroscience, 2012, 30(218):35-48.
- [23] Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia[Z], 2013:e525.
- [24] Hu X, Zhang D, Pang H, et al. Macrophage antigen complex-1 mediates reactive microgliosis and progressive dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease[J]. J Immunol, 2008, 181(10):7194-7204.
- [25] Fu P, Tang R, Yu Z, et al. Bumetanide-induced NKCC1 inhibition attenuates oxygen-glucose deprivation-induced decrease in proliferative activity and cell cycle progression arrest in cultured OPCs via p-38 MAPKs[J]. Brain Res, 2015, 1613(1):110-119.
- [26] Li CY, Xiao L, Liu SF, et al. Inhibition of mTOR pathway restrains astrocyte proliferation, migration and production of inflammatory mediators after Oxygen - glucose deprivation and reoxygenation[Z], 2015:9-18.
- [27] Chomczynski P, N. Sacchi[J]. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Analytical Biochemistry, 1987, 162(1):156-159.
- [28] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

(2017-02-05 收稿)