

# 巨噬细胞诱导型 C 型凝集素受体在脑梗死中的研究进展

王琳 刘彦虹

【中图分类号】 R743.3    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2018)06-0733-03  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.06.029

脑卒中是全球死亡和致残的主要原因,其中脑梗死发病率占有所有脑卒中的近 80%<sup>[1]</sup>。目前应用最广泛的脑梗死治疗手段是溶栓,但需在 4.5 h 的时间窗内完成,并且仍伴随着神经元缺血损伤和再灌注引起的脑组织损伤,因此需要一种可以靶向调节神经保护且不只是溶解凝块的有效治疗方法<sup>[2]</sup>。缺血性中枢神经系统损伤后通过激活先天性免疫应答发生局部炎症反应,在此复杂过程中有各种免疫细胞参与,例如小胶质细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞及脑血管周围的巨噬细胞<sup>[2]</sup>。这些免疫细胞上存在多种模式识别受体,可以与相应的损伤相关分子模式(DAMPs)结合,产生促炎细胞因子,导致血脑屏障破坏和脑组织损伤<sup>[3]</sup>。大量研究表明可以通过调节模式识别受体,从而调控脑梗死过程中免疫应答引起的脑组织损伤及血脑屏障破坏,其中研究较多的有 Toll 样受体(TLRs),NOD 样受体(NLRs)和 C 型凝集素受体(CLRs)等。最近研究发现巨噬细胞诱导型 C 型凝集素(Macrophage-inducible C-type lectin,Mincle)受体,属于 C 型凝集素样受体家族成员,在脑梗死及损伤后机制中也发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。本研究将详细介绍 Mincle 受体及其信号转导通路在脑梗死中的研究进展。

## 1 Mincle 受体的结构及信号转导通路

Mincle 受体属于一种含有 219 个氨基酸的 II 型跨膜受体,包括 21 个残基的氨基末端胞质区,跨膜区域及 169 个氨基酸的胞外羧基末端区,其中细胞质区域不含酪氨酸残基,表明 Mincle 受体不能介导有效的内吞作用;细胞外域具有高度保守的单个碳水化合物识别结构域(CRD)<sup>[6-7]</sup>。Mincle 受体本身并不表达细胞内信号传导结构域,而是通过 Fc 受体  $\gamma$  链(Fc $\gamma$ )跨膜区域所含的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)将信号转导至细胞内。Fc $\gamma$  作为 Mincle 受体的适配体分子与其成对出现,当相应配体与 Mincle 受体结合时 Fc $\gamma$  将信号传递至细胞内,Src 家族激酶使 ITAM 酪氨酸残基磷酸化,引起 Syk 活化并募集到磷酸化的 ITAM 处<sup>[8]</sup>。随后通过活化 Card9 依赖的级联信号,从而激活 NF- $\kappa$ B,最终诱导依赖核因子(NF)- $\kappa$ B 的细胞因子如 TNF $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等的表达<sup>[7]</sup>。其中在激活 Mincle 受体最终分泌成熟 IL-1 $\beta$  的过程中可通过 2 个相互独立的途径 CARD9 / Bcl-10 和 NLRP3 / caspase-1 进行调节<sup>[9]</sup>。

## 2 Mincle 受体的表达及相应配体

Mincle 受体在稳态条件下呈低水平表达,在受到细胞应激或者一些炎性细胞因子如 TNF- $\alpha$ ,IL-6 或 IFN- $\gamma$  等的刺激下 Mincle 的表达水平明显上调<sup>[7,10]</sup>。Mincle 受体可表达于先天性免疫细胞包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞等,还可以表达于中枢系统神经元及小胶质细胞中<sup>[4]</sup>,这些细胞都参与到脑梗死后脑损伤的重要过程中。目前已明确参与脑梗死后脑损伤的 DAMPs 有热休克蛋白、高迁移率族蛋白 1、乙酰透明质酸、硫酸肝素、DNA 或 RNA 免疫复合物、氧化低密度脂蛋白等,它们均可以刺激活化 TLRs。剪接体相关蛋白 130 (Spliceosome-associated protein 130, SAP130)位于正常活细胞的细胞核内,当细胞坏死后 SAP130 被释放进入细胞外,由于细胞坏死过程中会发生如磷酸化、糖基化或甲基化等的蛋白质修饰,SAP130 经修饰后可与 Mincle 受体结合,促进炎症细胞浸润到受损组织中并释放各种细胞因子<sup>[7-8]</sup>。

## 3 Mincle 受体与 TLR4

已知 TLR4 可通过结合其内源性配体来调节脑缺血和再灌注引起的炎症反应及神经损伤<sup>[11]</sup>。近年来,Mincle 受体与 TLR4 之间的相互作用机制已渐清晰。以往研究证明,饱和脂肪酸可通过激活 TLR4 / NF- $\kappa$ B 途径活化脂肪组织来源的巨噬细胞中 Mincle mRNA 的表达<sup>[9]</sup>。Lin 等<sup>[12]</sup>利用单侧输尿管梗阻和顺铂诱导的急性肾炎模型明确 Mincle 受体在肾小管上皮细胞、内皮细胞及系膜细胞中无明显表达,而是选择性的在巨噬细胞中表达。急性肾炎早期 TLR4 和 Mincle 受体同时被活化,Mincle 受体的激活可使巨噬细胞向 M1 表型转变,TLR4 / NF- $\kappa$ B 信号通路可严格调控 M1 型巨噬细胞上的 Mincle 表达及 M1 型巨噬细胞活化产生的 iNOS,MCP-1,IL-1 $\beta$ ,说明通过 Syk / NF- $\kappa$ B 依赖性机制可以维持和加速 M1 型巨噬细胞的炎症反应。故 TLR4 / NF- $\kappa$ B-Mincle 途径是急性肾炎时 M1 型巨噬细胞活化的关键机制。目前并无此通路在中枢神经系统的研究。

Stephanie 等<sup>[13]</sup>研究显示经体内及体外实验证实 Mincle 基因敲除(Mincle<sup>-/-</sup>)小鼠体内 TLR4 介导的信号转导通路比野生小鼠的活化程度更高且炎症反应也更为剧烈,Mincle 与其相应配体结合后会抑制 TLR4 介导的 IL-6 的产生,同时明确 Mincle 是特异性调节 TLR4 介导的无菌炎症反应,对其他替代的炎症反应模型无明显差异。由于 IL-10 属于

抗炎细胞因子,研究者推测 Mincle 是通过促进 TLR4 产生 IL-10 来减轻 TLR4 介导的应答反应,但并无此效应。相应配体与在骨髓来源的巨噬细胞中 Mincle 结合后 TLR4 的表达水平降低,同样与 LPS 结合的 TLR4 亦降低 Mincle 的表达水平,这表明 2 个受体之间可相互调节。然而, Mincle 缺失并未上调 TLR4 的表达,但 Mincle 可以通过抑制 TLR4 共同受体 CD14 表达来调节 TLR4 的免疫应答。

## 4 Mincle 与脑梗死

### 4.1 脑梗死及缺血后损伤机制

脑梗死发生时脑组织血流灌注不足,严重缺血导致脑组织中缺氧和葡萄糖剥夺、小胶质细胞活化、免疫细胞浸润、细胞因子产生等一系列过程,最终导致血脑屏障破坏和神经元功能障碍<sup>[14-17]</sup>。在脑梗死后损伤的早期 ROS 的产生激活血小板和内皮细胞,导致微血管闭塞,同时 ROS 还可以激活驻存脑细胞以增加促炎细胞因子的产生和释放,这可引起脑细胞损伤并诱导内皮细胞和白细胞上的细胞粘附分子的表达,通过细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的内皮表达和白细胞  $\beta 2$  整联蛋白的相互作用,血管内白细胞牢固地粘附于活化的内皮细胞上,从而促进白细胞在再灌注过程中渗入局部缺血区释放更多的促炎细胞因子和 ROS。在血管周围空间中缺血和再灌注激活血管周围巨噬细胞和肥大细胞。肥大细胞脱颗粒释放血管活性介质如组胺、蛋白酶和肿瘤坏死因子,而激活的巨噬细胞释放促炎细胞因子,这些促炎介质促进粘附分子在血管内皮上表达并促进嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞浸润致使血脑屏障受损<sup>[18]</sup>。趋化因子可以由活化的脑细胞释放并有助于诱导白细胞向缺血组织迁移<sup>[19]</sup>。细胞坏死时各种损伤相关分子从细胞内释放或是某些基质蛋白通过裂解酶的作用从坏死细胞中逃逸出来譬如基质金属蛋白酶(MMP)是促进血脑屏障损伤和缺血后炎症的重要神经毒性介质,诱导凋亡性神经元死亡、加剧脑水肿和促进白细胞浸润,可以激活 TLRs,促进脑组织损伤<sup>[19]</sup>。减少白细胞流入到缺血性损伤部位可减少炎症和侧支血管闭塞的形成,并减轻脑组织损伤的严重程度<sup>[20-22]</sup>。

### 4.2 Mincle 与 NETs

嗜中性粒细胞是人体免疫系统抵抗病理性损伤的第一应答细胞,嗜中性粒细胞激活诱导中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的形成。NETs 由 DNA、组蛋白和嗜中性粒细胞颗粒蛋白如弹性蛋白酶、髓过氧化物酶和组织蛋白酶 G 及解聚染色质纤维组成<sup>[23-24]</sup>。微生物组分如  $\beta$ -葡聚糖和 LPS 等可刺激中性粒细胞产生 NETs,其可捕获和消灭细胞外病原体<sup>[23]</sup>。有研究表明在急性脑梗死患者中 NETs 水平均显著升高,且与脑梗死发作时 NIHSS 评分评估脑梗死严重程度相关<sup>[25]</sup>。Elodie Laridan 等<sup>[26]</sup>获取应用血管内介入治疗的缺血性脑梗死患者的血栓证明嗜中性粒细胞和 NETs 是构成脑血栓的重要成分。

Atul Sharma 等<sup>[27]</sup>于 2014 年首次确定了 Mincle 受体通过调控中性粒细胞吞噬作用和 NETs 形成可抑制肺炎克雷伯菌肺炎形成。研究发现在肺炎克雷伯菌感染期间 Mincle 在肺中高度表达。Mincle<sup>-/-</sup>小鼠对于肺炎克雷伯菌高度易

感且小鼠体内细菌负荷增加,加重肺部炎症反应。在感染肺炎克雷伯菌 Mincle<sup>-/-</sup>小鼠中可以观察到大量中性粒细胞聚集,其吞噬细菌能力缺陷伴 NETs 形成受损。故 Mincle 通过中性粒细胞细菌清除机制来抵御肺炎克雷伯菌肺炎,从中起到保护作用。这与上述在肝损伤小鼠模型中 Mincle 受体可促进中性粒细胞的募集的结果相悖,推测 Mincle 受体根据结合的配体不同而发挥不同的免疫作用。

Dr. Atul Sharma 等<sup>[28]</sup>应用 PMA 或 fMLP 激活 WT 及 Mincle<sup>-/-</sup>小鼠的原代中性粒细胞后发现以下现象:(1)Mincle<sup>-/-</sup>的中性粒细胞产生的 NETs 受损;(2)Mincle<sup>-/-</sup>小鼠的原代中性粒细胞中 ROS 产生与 WT 小鼠中相比并无明显差别;(3)Mincle<sup>-/-</sup>小鼠的原代中性粒细胞中的自噬特异性标志物 LC3II 水平降低;(4)此过程自噬水平无法通过应用雷帕霉素(rapamycin, mTOR 抑制剂)恢复,但是可以由他莫昔芬(一种选择性雌激素受体调节剂)拯救。尽管他莫昔芬在自噬途径中的确切分子靶点没有确定,但是他莫昔芬可增加细胞内神经酰胺水平,其反过来在多个水平上调节自噬。故 Mincle 受体通过激活自噬过程中 mTOR 的下游通路介导中性粒细胞产生 NETs,具体结合位点还尚待探讨,其过程中不依赖于活性氧的产生。目前尚无 Mincle 受体结合 SAP130 是否可以促进 NETs 形成的研究,同时其是否促进了缺血性脑卒中的发生和梗死后炎症的进展还有待进一步研究。

### 4.3 Mincle 与脑梗死

作为细胞坏死的危险信号, SAP130 可以与 Mincle 结合并将其活化,这也成为 Mincle 参与脑卒中后脑损伤机制的基础。有研究显示 Mincle 在脑缺血再灌注过程中可在免疫细胞、内皮细胞及神经元上表达;缺血再灌注后 2 h Mincle 和内源性 SAP130 表达水平达到峰值,下游通路因子 p-Syk 和 Syk 表达在缺血再灌注后 2 h 增加,并且在再灌注后 22 h 维持在相同水平。应用 Syk 抑制剂可使细胞间黏附分子-1 水平下调,并且显著减少缺血再灌注后脑组织损伤,减少梗死体积和脑组织肿胀。故 Mincle/Syk 信号转导通路作为先天免疫反应的关键组分参与脑缺血再灌注后的损伤机制中,可以促进白细胞粘附于内皮细胞,加重炎症程度,促进脑缺血再灌注后脑组织损伤<sup>[29]</sup>。

Thiruma V Arumugam 等<sup>[30]</sup>发现应用的小鼠模型可改善脑梗死后的神经功能结局,并可减少梗死体积。缺血性脑卒中 3 d 后 Mincle<sup>-/-</sup>小鼠组的梗死体积是野生对照组小鼠的 50%,并且获得相对更低神经功能缺损评分。在脑缺血再灌注后 Mincle 及其下游分子 Syk 可诱导白细胞浸润。实验证实 Mincle 受体在大脑中的表达限定于特定的细胞类型,永久性大脑中动脉闭塞后大鼠中 Mincle 受体表达在 CD163<sup>+</sup>的血管周围巨噬细胞上,在非骨髓细胞上不广泛表达,并且在短暂性大脑中动脉闭塞后数天内不在小胶质细胞上表达。故得出结论 Mincle 受体不可能直接作用于神经元存活或小胶质细胞活化过程,同时外周免疫细胞缺少 Mincle 对大脑中动脉闭塞的严重程度影响相对较小,表明 Mincle 主要作用于中枢神经系统的功能的某些特定方面。

## 5 展 望

综上所述, Mincle/Syk 信号转导通路作为先天性免疫反应的关键组分, 缺血性脑血管病发生后抑制此通路可以减轻神经功能障碍, 同时可以缩小脑缺血区域, 但对于 Mincle 的研究尚不完善。在中枢神经系统中 Mincle 受体与 TLR4 的相互调节关系需要进一步明确; 研究 Mincle 受体促进 NETs 形成的过程是否参与血栓形成及在自噬过程中如何作用。在动物蛛网膜下腔出血模型中 Mincle/Syk/IL-1 $\beta$  信号通路可增加脑水肿程度并伴有神经功能下降, 在早期先天免疫反应和神经炎症中发挥重要作用<sup>[31]</sup>, 但在其他中枢神经系统疾病中尚未见研究。

## 参 考 文 献

- [1] Yong H, Foody JA, Ji L, et al. A systematic literature review of risk factors for stroke in China[J]. *Cardiol Rev*, 2013, 21(2): 77-93.
- [2] Petrovic-Djergovic D, Goonewardena SN, Pinsky DJ. Inflammatory disequilibrium in stroke[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 142-158.
- [3] Wilhelm I, Nyul-Toth A, Kozma M, et al. Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(5): H1000-H1012.
- [4] Vaccari JR, Iii FB, Berti AF, et al. Mincle signaling in the innate immune response after traumatic brain injury[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2015, 32(4): 228-236.
- [5] Smith DG, Williams SJ. Immune sensing of microbial glycolipids and related conjugates by T cells and the pattern recognition receptors MCL and Mincle[J]. *Carbohydr Res*, 2016, 420: 32-45.
- [6] Matsumoto M, Tanaka T, Kaisho T, et al. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages[J]. *J Immunol*, 1999, 163(9): 5039-5048.
- [7] Miyake Y, Ishikawa E, Ishikawa T, et al. Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle[J]. *Self Nonself*, 2010, 1(4): 310-313.
- [8] Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, et al. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(10): 1179-1188.
- [9] Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, et al. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans[J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 819-826.
- [10] Flornes LM, Bryceon YT, Spurkland A, et al. Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex[J]. *Immunogenetics*, 2004, 56(7): 506-517.
- [11] Wang Y, Ge P, Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Mediators Inflamm*, 2013: 124614.
- [12] Lv LL, Tang PM, Li CJ. The pattern recognition receptor, Mincle is essential for maintaining the M1 macrophage phenotype in acute renal inflammation[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(3): 587-602.
- [13] Greco SH, Mahmood SK, Vahle A, et al. Mincle suppresses Toll-like receptor 4 activation[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(1): 185-194.
- [14] Shichita T, Ago T, Kamouchi M, et al. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke[J]. *J Neurochem*, 2012, 123(suppl2): 29-38.
- [15] D. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(18): 2076-2097.
- [16] Friedrich V, Flores R, Muller A, et al. Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 103.
- [17] Frontera JA, Aledort L, Gordon E, et al. Early platelet activation, inflammation and acute brain injury after a subarachnoid hemorrhage: a pilot study[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(4): 711-713.
- [18] Fann DY, Lee SY, Manzanero SA, et al. Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(4): 941-966.
- [19] Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, et al. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 132.
- [20] Mori E, Del Zoppo GJ, Chambers JD, et al. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons[J]. *Stroke*, 1992, 23(5): 712-718.
- [21] Neumann J, Riek-Burchardt M, Herz JA, et al. Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2): 259-277.
- [22] Holloway PM, Durrenberger PF, Trutschl M, et al. Both MC1 and MC3 receptors provide protection from cerebral Ischemia-Reperfusion-Induced neutrophil recruitment[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(9): 1936-1944.
- [23] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [24] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(36): 15880-15885.
- [25] Valles J, Lago A, Teresa Santos M, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(10): 1919-1929.
- [26] Laridan E, Denorme F, Desender L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi[J]. *Ann Neurol*, 2017, 82(2): 223-232.
- [27] Sharma A, Steichen AL, Jondle CN, et al. Protective role of mincle in bacterial pneumonia by regulation of neutrophil mediated phagocytosis and extracellular trap formation[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(11): 1837-1846.
- [28] Sharma AT. Mincle-Mediated neutrophil extracellular trap formation by regulation of autophagy[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2017, 215: 1040-1048.
- [29] Suzuki Y, Nakano Y, Mishihiro K, et al. Involvement of mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 3177.
- [30] Arumugam TV, Manzanero S, Furtado M, et al. An atypical role for the myeloid receptor Mincle in central nervous system injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(6): 2098-2111.
- [31] He YE, Xu L, Li B, et al. Macrophage-Inducible C-Type lectin/spleen tyrosine kinase signaling pathway contributes to neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2015, 46(8): 2277-2286.