

## • 综 述 •

## 脑出血患者免疫相关治疗靶点的研究进展

何佳 穆琼

【中图分类号】 R743.34 【文献标识码】 A

【文章编号】 1007-0478(2022)03-0281-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.03.017

脑出血(Intracerebral hemorrhage, ICH)是常见的脑卒中类型之一,严重危及患者的生命安全;免疫反应存在于脑出血后继发性脑损伤的各种病理生理过程,两者有着密切的联系,如脑水肿、神经炎症以及神经元损伤中均贯穿着免疫反应,因此本研究针对脑出血患者中免疫相关治疗靶点进行总结,探讨更多有效的方法治疗脑出血,促进患者脑功能的恢复,改善其预后。

脑出血(Intracerebral hemorrhage, ICH)是脑卒中的一种亚型,其发病率仅次于缺血性脑卒中,占所有脑卒中类型的 10%~15%,具有发病率、致残率和病死率均较高的特点,常导致患者遗留不同的神经功能损伤<sup>[1]</sup>。以前 ICH 患者的管理措施主要为血压控制、外科手术和局部止血<sup>[2]</sup>;促进 ICH 后脑功能恢复的治疗非常有限<sup>[3]</sup>。目前免疫系统被认为是 ICH 后脑损伤和脑功能恢复的主要参与者。

## 1 ICH 后免疫反应

脑出血后脑损伤分为原发性损伤和继发性损伤两类,其中继发性脑损伤主要由血液进入脑组织和脑细胞所引起的一系列理化及生物学变化导致的脑损伤;原发性脑损伤主要由血肿占位效应所致<sup>[4]</sup>。免疫反应在血管破裂后最初几分钟之内被激活,受损的组织释放损伤相关的分子模式(Damage associated molecular patterns, DAMPs),其通过与模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)如甘露糖受体(Mannose receptor, MR)、清道夫受体(Scavenger receptor, SR)、Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)结合来激活天然免疫反应。随后,ICH 发病后 24 h 红细胞溶解释放出大量血红蛋白和珠蛋白<sup>[5]</sup>,同时激活的小胶质细胞通过吞噬作用使病变的周围高度表达血红素加氧酶-1,其分解产物为铁、胆红素和一氧化碳,它们引起脑损伤的潜在机制是通过产生自由基<sup>[6]</sup>。这些细胞毒性产物通过吞噬作用而逐渐被巨噬细胞/小胶质细胞清除。在 ICH 患者的早期就会发生凝血块溶解和脑功能修复,尽管神经功能恢复是不完整的。但是,在 ICH 亚急性期脑损伤抑制了外周免疫反应,它的潜在机制暂未明确。

## 2 与免疫系统相关的 ICH 治疗靶点

针对 ICH 相关的分子治疗靶点在动物模型的中得到了广泛的研究,甚至在某些临床试验中也得到了广泛的研究。

### 2.1 鞘氨醇-1-磷酸受体(Sphingosine-1 phosphate receptor, S1PR)

鞘氨醇-1-磷酸(Sphingosine-1 phosphate, S1P)是一类重要的具有生物活性的脂质小分子,鞘氨醇-1-磷酸受体家族的成员包括五种已知的受体(Sphingosine-1 phosphate receptor 1-Sphingosine-1 phosphate receptor 5, S1PR1-S1PR5),它们参与调节免疫细胞的运动、分化<sup>[7]</sup>以及血管生成等多种生理过程<sup>[8]</sup>。S1PR 激动剂芬戈莫德(Fingolimod, FTY720)于 2010 年由美国食品药品监督管理局(Food and drug administration, FDA)批准用于治疗多发性硬化;多项研究表明芬戈莫德可使 CD4 + T 淋巴细胞(CD4T)、CD8T 淋巴细胞(CD8T)、CD19B 淋巴细胞(CD19B)、自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)等免疫细胞的数量减少,停药后很快恢复<sup>[9]</sup>。FTY720 由于其副作用多,限制了其在 ICH 中的使用<sup>[10]</sup>;西尼莫德(Siponimod, BAF312)是新一代 S1PR1 调节药,与 S1PR1 和 S1PR5 结合有较高亲和力,能下调促炎因子的表达水平,如白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)、 $\gamma$ -干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN $\gamma$ )、细胞间黏附分子-1(Intercellular Cell adhesion molecule-1, ICAM-1)等<sup>[11-12]</sup>, Rolland 等在动物实验中得出芬戈莫德可以减少脑水肿,改善神经功能<sup>[13]</sup>。有动物实验得出 1 个潜在和选择性的 S1PR1/5 受体调节剂 BAF312 治疗 ICH,其机制主要是减少大脑中淋巴细胞的浸润,延缓炎症反应的进展<sup>[14]</sup>。目前,一项关于脑出血患者 BAF312 与安慰剂比较的疗效、安全性和耐受性实验正在进行<sup>[15]</sup>。此外,一种选择性 S1PR1 调节剂 RP101075 亦是针对 S1PR 靶点研制的药物,对 S1PR1 高度选择,是一种选择性的 S1PR1 激动剂;Sun 等人实验得出在小鼠模型中 RP101075 显著减轻神经功能缺损和脑水肿程度,增强血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)的完整性<sup>[16-17]</sup>。

### 2.2 Toll 样受体 4(TLR4)介导的信号通路

Toll 样受体(TLR)是参与非特异性免疫的一类跨膜非催化性蛋白质,是一种模式识别受体,在机体固有免疫反应中起关键作用。Toll 样受体家族由 13 个跨膜受体组成(TLR1-TLR13),其中 TLR2 和 TLR4 与 ICH 患者的预后密切相关<sup>[18]</sup>,相关研究表示存在 TLR2 和 TLR4 基因缺陷的

小鼠较对照组 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF 表达水平均显著下降<sup>[19]</sup>, TIR 信号通路参与 ICH 所致的脑损伤<sup>[20]</sup>, 其中尤以 TLR4 最为重要, TLR4 在 ICH 后第 3d 达高峰<sup>[21]</sup>。TLR4 主要通过 2 个下游蛋白信号, 即髓样分化因子 88(Myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)和 Toll/IR-1 结构域, 其中包括 TLR 相关干扰素活化子, 由  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接的适配器蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ , TRIF), 这两种信号使转录因子 NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) 激活<sup>[22]</sup>。NF- $\kappa$ B 可以调节多种 M1 型特征性基因的表达<sup>[23]</sup>, 编码 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等促炎因子, 最终导致脑损伤。多项研究表明 TLR4 以及其介导的 NF- $\kappa$ B 和 TRIF 信号通路均可作为 ICH 的治疗靶点之一<sup>[24-25]</sup>。目前已研发很多 TLR4 拮抗剂如瑞沙托维 (Resatorvid, TAK-242)、M62812、姜黄素等可以下调 TLR4, MyD88 以及 TRIF 的表达, 使 NF- $\kappa$ B 活性受到抑制, 改善神经功能。Sparstolonin B (SsnB) 是一种从中草药三棱中提取的含有咕吨酮和异香豆素基本母核的天然化合物, 可阻断 TLR4 触发的炎症信号; Zhong 等<sup>[26]</sup> 报道 SsnB 能穿过血脑屏障, 使 ICH 小鼠的脑水肿减轻以及神经功能改善<sup>[27]</sup>。目前, 很多中药及其相关活性成分如藁本内酯、洋川芎内酯 H 和生地黄-大黄酒正在 ICH 小鼠模型中进行研究。

### 2.3 环氧化酶 2(Cyclooxygenase-2, COX-2)

塞来昔布是一种选择性 COX2 抑制剂, 现在被广泛用于各种缓解疼痛及抗炎的疾病中, 在胶原酶诱导的大鼠 ICH 模型中塞来昔布可减轻脑水肿、炎症反应和脑血肿周围细胞死亡, 促进 ICH 动物模型的脑功能恢复<sup>[28]</sup>。2009 年一项回顾性分析纳入 34 例患者, 发现塞来昔布明显降低了脑水肿体积, 药物副作用无明显差异<sup>[29]</sup>。2013 年一项多中心试验也证实, ICH 早期使用塞来昔布在 ICH 中的治疗是安全的, 其减轻了 ICH 患者的脑水肿<sup>[30]</sup>。

### 2.4 程序性死亡受体 1(Programmed death receptor 1, PD-1)

PD-1(CD279)是一种重要的免疫抑制分子和重要的免疫检查点受体, 在淋巴 T 细胞、淋巴 B 细胞、NK 细胞等多种免疫细胞中表达, 主要在肿瘤方面进行运用<sup>[31]</sup>, PD-1 与相应受体如程序性死亡受体-配体 1(Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)、程序性死亡受体-配体 2(Programmed cell death 1 ligand 2, PD-L2)结合可使肿瘤恶化; 反之, 则可对某些肿瘤起到有效的治疗作用。目前, PD-1 在 ICH 中运用仅限于动物实验<sup>[32-33]</sup>; 与肿瘤相反, 实验结果表示在小鼠模型中 PD-L1 治疗可减轻 ICH 小鼠模型的神经功能缺损程度, 减轻脑水肿和减少出血量。

### 2.5 B7-1(CD80)/B7-2(CD86)信号通路

B7-2(CD86)属于免疫球蛋白超家族, 其配体是 CD28 和 CD152 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA4), B7-1(CD80)是 B7-2(CD86)活化 T 淋巴细胞时的协同刺激因子, 两者在树突状细胞、单核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等多种免疫细胞表达, 在免疫反应中发挥重要作用。B7-1 可以下调 IFN- $\gamma$  水平并使 Th1 辅助细胞 (Th1 cell, Th1)/Th2 辅助细胞 (Th2 cell, Th2) 失衡, 其通过逆转

免疫失衡减轻脑损伤<sup>[34]</sup>。

### 2.6 其他免疫相关治疗分子靶点

血红蛋白-血红素-铁代谢轴是 ICH 氧化性脑损伤的重要原因, ICH 后铁离子释放过多, 造成铁负荷过重, 高水平铁使铁蛋白上调, 且可通过芬顿反应产生大量活性氧引起氧化应激来介导神经损伤<sup>[35]</sup>。去铁胺能结合机体中低分子的游离铁离子, 抑制促炎性 M1 型小胶质细胞的激活; 抗炎性 M2 型小胶质细胞数量增多抑制基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases MMPs) 尤其是 MMPs-3、MMPs-9 的表达, 从而保护脑功能<sup>[36]</sup>。米诺环素是四环素类抗生素, 亦可抑制小胶质细胞活化, 通过降低 ICH 后铁负荷<sup>[37]</sup>来减轻脑水肿、BBB 的破坏; 同时通过抗自噬和凋亡系统来减轻脑损伤<sup>[38]</sup>。最近, Chang 等人的研究结果显示米诺环素治疗 ICH 的前 5 d 中 MMP-9 表达水平降低, 且药物安全性高<sup>[39]</sup>。甲磺酸去铁胺是一种铁螯合剂, 能将游离的铁离子结合在稳定的复合物中; Selim 等人一项前瞻性的二期临床试验中得出甲磺酸去铁胺在治疗 ICH 中的 3 个月后获得较好的临床效果<sup>[40]</sup>。

细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域分子 3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-3, Tim-3) 属于 Tim 免疫调节分子家族成员, Tim-3 是 T 细胞免疫球蛋白分子家族之一, 由活化的 Th1 细胞表达的一种调节性 T 细胞分子。除此在外, 在肥大细胞、NK 细胞、CD8T 细胞、单核/巨噬细胞等免疫细胞中亦有表达<sup>[41-43]</sup>。Liu 等人研究报道外周 CD8 细胞 Tim-3 的表达与 ICH 患者疾病严重程度和预后呈负相关<sup>[44]</sup>; 之后有相关研究提出 Tim-3 可促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等表达增加, 加重 ICH 小鼠的脑损伤<sup>[45]</sup>。因此, 在将来的研究领域其中其可为 ICH 的治疗提供更多的治疗途径。

除上述免疫治疗分子靶点外, 干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, IRF3), IL-27 等免疫细胞分子亦作为 ICH 治疗的靶点进行相关研究<sup>[46-48]</sup>。

## 3 结论及展望

ICH 整个过程均涉及到免疫反应, 免疫系统对神经细胞的损伤及保护均起到重要作用。大量研究证明, 免疫应答的靶向治疗是改善 ICH 脑功能的一种可行性方法, 但是目前有很多 ICH 免疫相关靶点的研究是基于动物实验进行的, 其是否对临床中 ICH 患者具有同等的效用, 还需要大量的临床实验来证实。值得注意的是, 我国中药的某些成分可能为探索未知的药物提供新的方向。希望在今后能够把 ICH 后免疫系统研究得更加透彻, 找到更多有效的免疫靶点, 可以在病变中的不同阶段起积极作用, 研制出更多有效的药物治疗 ICH, 使 ICH 的脑功能恢复不再是一个世界难题。

**利益冲突:** 何佳进行文献的收集、整理以及撰写; 穆琼进行研究设计和论文修订。

**作者贡献声明:** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Zhu H, Wang Z, Yu J, et al. Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage.

- rhage[J]. *Progress in Neurobiol*, 2019, 178: 101610.
- [2] Cordonnier C, Demchuk A, Ziai W, et al. Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management[J]. *Lancet*, 2018, 392(1154): 1257-1268.
  - [3] Morgenstern LB, Hemphill IJ, Anderson C, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage a guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association[J]. *Stroke*, 2010, 41(9): 2108-2129.
  - [4] Lan X, Han X, Li Q, et al. Modulators of microglial activation and po-larization after intracerebral haemorrhage[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(7): 420-433.
  - [5] Zhao J, Chen Z, Xi G, et al. Deferoxamine attenuates acute hydrocephalus after traumatic brain injury in rats[J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(5): 586-594.
  - [6] Keep RF, Hua Y, Xi GH. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(8): 720-731.
  - [7] Aoki M. Sphingosine-1-phosphate signaling in immune cells and inflammation; roles and therapeutic potential[Z], 2016; 8606878.
  - [8] Takabe K, Spiegel S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(9): 1839-1846.
  - [9] Li YJ, Chang GQ, Liu Y, et al. Fingolimod alters inflammatory mediators and vascular permeability in intracerebral hemorrhage[J]. *Neurosci Bull*, 2015, 31(6): 755-762.
  - [10] Ontaneda D, Cohen JA. Potential mechanisms of efficacy and adverse effects in the use of fingolimod (FTY720) [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2011, 4(5): 567-570.
  - [11] Marfia G, Navone SE, Hadi L, et al. The adipose mesenchymal stem cell secretome inhibits inflammatory responses of microglia; evidence for an involvement of sphingosine-1-Phosphate signalling[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(14): 1095-1107.
  - [12] Serdar M, Herz J, Kempe K, et al. Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 52: 106-119.
  - [13] Rolland W2, Manaenko A, Lekic T, et al. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 111: 213-217.
  - [14] Vogelgesang A. Siponimod (BAF312) treatment reduces brain infiltration but not lesion volume in middle-aged mice in experimental stroke[J]. *Stroke*, 2019, 50(5): 1224-31.
  - [15] Efficacy, safety and tolerability of BAF312 compared to placebo in patients with intracerebral hemorrhage (ICH) [J]. Available from: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03338998>
  - [16] Kim GS, Yang L, Zhang GQ, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(8): 7893.
  - [17] Sun N, Shen Y, Han W, et al. Selective sphingosine-1-Phosphate receptor 1 modulation attenuates experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2016, 47(7): 1899-1906.
  - [18] Gang X, Han Q, Zhao X, et al. Dynamic changes in Toll-Like receptor 4 in human perihematoma tissue after intracerebral hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2018, 118(18): e593-e600.
  - [19] Wang Y, Su L, Morin MD, et al. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(7): E884-E893.
  - [20] Sansing LH, Harris TH, Welsh FA, et al. Toll-like receptor 4 contributes to poor outcome after intracerebral hemorrhage [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(4): 646-656.
  - [21] Chang CZ, Wu SC, Kwan AL. A purine antimetabolite attenuates toll-like receptor-2, -4, and subarachnoid hemorrhage-induced brain apoptosis[J]. *J Surg Res*, 2015, 199(2): 676-687.
  - [22] Lin S, Yin Q, Zhong Q, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/ TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9(46): 1-14.
  - [23] Taetzsch T, Levesque S, McGraw C, et al. Redox regulation of NF- $\kappa$ B p50 and M1 polarization in microglia[J]. *Glia*, 2015, 63(3): 423-440.
  - [24] Wang YC, Wang PF, Fang H, et al. Toll-like receptor 4 antagonist attenuates intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. *Stroke*, 2013, 44(9): 2545-2552.
  - [25] Han L, Liu DL, Zeng QK, et al. The neuroprotective effects and probable mechanisms of Ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 43-57.
  - [26] Zhong Q, Zhou K, Liang QL, et al. Interleukin-23 secreted by activated macrophages drives  $\gamma\delta$ T cell production of interleukin-17 to aggravate secondary injury after intracerebral hemorrhage[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(10): e004340.
  - [27] Wang Y, Jiang S, Xiao J, et al. Sparstolonin B improves neurological outcomes following intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5436-5442.
  - [28] Chu K, Jeong SW, Jung KH, et al. Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematoma cell death[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(8): 926-933.
  - [29] Park HK, Lee SH, Chu K, et al. Effects of celecoxib on volumes of hematoma and edema in patients with primary intracerebral hemorrhage[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 279(1/2): 43-46.
  - [30] Hu X, Tao C, Gan Q, et al. Oxidative stress in intracerebral hemorrhage: sources, mechanisms, and therapeutic targets [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016; 3215391.
  - [31] Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(3): 153-167.
  - [32] Han R, Luo J, Shi Y, et al. PD-L1 (programmed death ligand 1) protects against experimental intracerebral Hemorrhage-Induced brain injury[J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2255-2262.
  - [33] Yuan B. Programmed death (PD)-1 attenuates macrophage activation and brain inflammation via regulation of fibrinogen-like protein 2 (Fgl-2) after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Immunol Lett*, 2016 (179): 114-21.
  - [34] Ma L. Blocking B7-1/CD28 pathway diminished long-range brain damage by regulating the immune and inflammatory responses in a mouse model of intracerebral hemorrhage [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(7): 1673-83.