

中图分类号: R743.3  
UDC: 616.831  
学科专业代码: 105107

学校代码: 10660  
学 号: 2021020020074  
密 级: 公开

# 貴州醫科大學

## 2025 届博士学位论文

(专业学位)



### PD-L1 介导的免疫调控在缺血性卒中后的作用及机制

### The Role and Mechanisms of PD-L1-Mediated Immune Regulation after Ischemic Stroke

研 究 生: 杭航

指导教师: 伍国锋 教授

年 级: 2021 级

专 业: 急诊医学

提交日期: 二〇二五年五月

# **The Role and Mechanisms of PD-L1-Mediated Immune Regulation after Ischemic Stroke**

by

Hang Hang

A dissertation submitted in partial fulfillment  
of the requirements for the degree of  
Doctor of Medicine

School of Clinical Medicine  
Guizhou Medical University

Major: Emergency Medicine

Supervisor: Prof. Guofeng Wu

May, 2025

中图分类号: R743.3  
UDC: 616.831  
学科专业代码: 105107

学校代码: 10660  
学号: 2021020020074  
密级: 公开

# 贵州医科大学

## 2025 届 博 士 学 位 论 文

(专业学位)

PD-L1 介导的免疫调控在缺血性卒中后的作用及机制  
The Role and Mechanisms of PD-L1-Mediated Immune  
Regulation after Ischemic Stroke

论文作者: 杭航

指导教师: 伍国锋 教授

申请学位: 医学博士

培养单位: 临床医学院

学科专业: 急诊医学

研究方向: 急性脑血管疾病

研究起止日期: 2021年9月至2025年3月

答辩委员会主席: 沈祥春 教授

论文答辩日期: 2025年5月28日

# 目 录

第一部分 绪论.....	1
第二部分 缺血性卒中后外周单核细胞 PD-1/PD-L1 表达特征及其动态变化研究.....	6
前言.....	6
1 材料与方法.....	8
1.1 材料.....	8
1.2 方法.....	11
2 结果.....	18
2.1 免疫检查点在缺血性卒中患者单核细胞中的表达特征及功能相关性分析.....	18
2.2 基于 CyTOF 的缺血性卒中患者循环免疫细胞时间序列分析及免疫检查点动态变化研究.....	22
3 讨论.....	29
3.1 免疫细胞构成的变化及其临床意义.....	29
3.2 髓系免疫检查点 PD-1/PD-L1 表达变化及其免疫调控意义..	31
4 结论.....	32
第三部分 PD-L1 调控单核来源巨噬细胞功能介导缺血性卒中后神经保护的作用研究.....	33
前言.....	33
1 材料与方法.....	35
1.1 材料.....	35
1.2 方法.....	39
2 结果.....	57
2.1 体外构建细胞模型证实 PD-L1 对单核来源巨噬细胞(MoDM)功能表型的影响.....	57
2.2 缺血性卒中对单核细胞迁移与 PD-L1 表达的影响.....	64
2.3 PD-L1 单克隆抗体(PD-L1 mAb)在缺血性卒中模型中的治疗效果.....	70
2.4 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后紧密连接相关基因及蛋白的年龄差异性调控作用.....	80
2.5 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后外周免疫及促炎因子的年龄差异性影响.....	88
3 讨论.....	92
3.1 缺血性卒中后 MoDM 中 PD-L1 表达的动态变化及意义..	92

3.2 PD-L1 mAb 对缺血性卒中神经保护作用的年龄差异 .....	93
3.3 PD-L1 mAb 介导免疫调节与血管保护作用的机制探索 .....	94
4. 结论.....	95
第四部分 PD-L1 通过单核来源巨噬细胞介导缺血性卒中后免疫调 控与神经保护的作用及机制研究.....	97
前言.....	97
1 材料与方法.....	99
1.1 材料.....	99
1.2 方法.....	99
2 结果.....	104
2.1 缺血性卒中后 MoDM 募集及其 PD-L1 表达上调.....	104
2.2 Clo-Lip 选择性清除 MoDM 并有效抑制脑组织 PD-L1 信号 活性 .....	107
2.3 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 介导的神经保护作用 .....	109
2.4 MoDM 清除对 PD-L1 mAb 介导转录应答与免疫微环境调节 的影响 .....	117
2.5 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 对促炎极化及 PI3K/Akt 信号 通路的调节作用 .....	120
3 讨论.....	122
3.1 MoDM 在 PD-L1 介导的缺血性卒中神经保护中的关键作用 .....	122
3.2 MoDM 参与 PD-L1 调控的 PI3K/Akt 通路及巨噬细胞活化 机制 .....	123
3.3 MoDM 介导 PD-L1 相关免疫细胞浸润与炎症通路调控 ...	124
4 结论.....	126
第五部分 结论与展望 .....	128
参考文献.....	130
综述 单核细胞与巨噬细胞亚群的多样性解析：标志物特征与功能研 究 .....	142
参考文献.....	165

# PD-L1 介导的免疫调控在缺血性卒中后的作用及机制

专业：急诊医学 学号：2021020020074 研究生：杭航

导师：伍国锋 教授

## 摘要

缺血性卒中是最常见的致残性脑血管疾病之一，炎症与免疫响应在其发病与修复过程中发挥着重要调节作用。近年来研究发现，单核细胞及其分化的单核来源巨噬细胞（MoDM）在缺血性卒中后免疫应答中具有关键功能，而程序性死亡配体1（PD-L1）作为典型的免疫检查点分子，其在缺血性卒中相关免疫调控中的作用机制尚不明确。本研究围绕PD-L1的表达动态、功能调控及干预潜力，系统探讨其在缺血性卒中后免疫调节与神经保护中的作用基础和机制路径。

### 目的：

1. 明确缺血性卒中后外周单核细胞中程序性死亡受体1（PD-1）/PD-L1通路的动态变化特征，结合转录组与质谱流式分析，描绘外周髓系免疫构成及检查点分子表达谱。
2. 探讨PD-L1在调控MoDM功能中的作用，评估其在缺血性卒中后神经保护过程中的调节效应及年龄相关差异。
3. 验证MoDM在PD-L1介导免疫调控及神经保护中的关键作用，解析其分子机制并评估干预效果。

### 方法：

1. 利用公开人类缺血性卒中外周血转录组数据库，筛选单核细胞中差异表达的免疫检查点基因，分析PD-L1在不同MoDM亚型中的表达特征。收集10例缺血性卒中患者第1、3、7天外周血单个核细胞（PBMC）样本，结合5名对照，采用质谱流式细胞术（CyTOF）分析CD45<sup>+</sup>细胞中髓系亚群构成（经典单核细胞cMono、中间单核细胞iMono、非经典单核细胞ncMono、树突状细胞DC、浆细胞样树突状细胞pDC）及PD-1/PD-L1

表达动态。

2. 在小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDMs) 体外构建 MoDM 模型, 通过小干扰 RNA (siRNA) 敲低及质粒过表达干预 PD-L1 表达, 检测其对 M1/M2 型相关因子表达的调节作用; 并在青年与老年 C57BL/6J 小鼠中分别建立 tMCAO 与 dMCAO 模型, 给予 PD-L1 中和抗体 (PD-L1 mAb) 干预, 系统评估其神经保护、炎症抑制与血脑屏障完整性效应。
3. 采用氯膦酸脂质体 (Clo-Lip) 选择性清除缺血性卒中后脑组织 MoDM, 并联合 PD-L1 mAb 治疗。通过 TTC、HE、Nissl、TUNEL 染色, 行为学测试、流式细胞术、免疫荧光、Western blot 及 RNA 测序等手段, 系统评估 MoDM 在 PD-L1 介导的神经保护、炎症调控及免疫微环境重塑中的作用。

## 结果:

1. 转录组分析显示, 缺血性卒中患者外周单核细胞中多个免疫检查点基因表达异常, 其中 PD-L1 (CD274) 在 PPI 网络中居核心位置, 且在 M1 型 MoDM 中表达高于 M2 型。CyTOF 结果表明缺血性卒中后外周血 CD45<sup>+</sup> 细胞中 cMono 比例升高、iMono 比例下降, PD-1/PD-L1 在 cMono 中表达显著低于对照组, iMono 及 DC 中亦呈下调趋势。
2. 体外实验表明, PD-L1 上调促进 BMDM 向 M1 型极化, 敲低 PD-L1 增强 M2 型表型。动物实验中, PD-L1 mAb 可改善青年和老年小鼠缺血性卒中后的神经功能、组织结构和血脑屏障完整性, 并降低炎症水平及细胞凋亡程度, 青年组改善幅度更大。转录组与免疫荧光结果显示, PD-L1 mAb 显著上调紧密连接 (Tight junction) 相关基因和蛋白 (Claudin-5、ZO-1、Occludin) 表达, 降低伊文氏蓝 (Evans blue) 渗漏, 青年小鼠血脑屏障修复能力优于老年组。ELISA 和 TUNEL 检测显示, PD-L1 mAb 可降低肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 表达及脑组织凋亡水平, 青年小鼠中抗炎和抗凋亡效果更显著。
3. 免疫荧光和流式细胞术显示, 缺血性卒中模型小鼠脑组织中 PD-L1 主要表达于 CD68<sup>+</sup> MoDM。Clo-Lip 处理可显著减少 MoDM 浸润并下调其 PD-L1

表达。MoDM清除后，PD-L1 mAb对神经功能、脑组织结构和凋亡蛋白的保护作用减弱。RNA-seq分析显示，MoDM缺失后PI3K/Akt通路激活受阻，促炎趋化因子表达增加。免疫浸润和流式分析结果显示MoDM清除影响巨噬细胞亚群比例分布，并削弱PD-L1 mAb对M1活化及p-Akt表达的调节作用。

### 结论：

1. 缺血性卒中后外周单核细胞中 PD-1/PD-L1 表达水平下调，伴随髓系构成改变，提示免疫检查点调控失衡及髓系免疫调节能力减弱。
2. PD-L1 可调控 MoDM 促炎/抗炎表型，阻断 PD-L1 信号在动物模型中发挥显著神经保护作用，并呈年龄相关差异。
3. MoDM 是缺血性卒中后脑组织中 PD-L1 的主要表达细胞，其参与 PD-L1 信号介导的免疫调控及神经保护过程，MoDM 清除显著削弱 PD-L1 mAb 治疗效果，支持其作为缺血性卒中免疫干预关键靶点的潜力。

### 关键词：

程序性死亡配体 1；缺血性卒中；单核细胞；单核来源巨噬细胞；神经保护

# The Role and Mechanisms of PD-L1-Mediated Immune Regulation after Ischemic Stroke

## ABSTRACT

Major: Emergency Medicine    Student ID: 2021020020074    Candidate: Hang Hang

Supervisor: Prof. Guofeng Wu

Ischemic stroke is one of the most common causes of disability among cerebrovascular diseases. Inflammation and immune responses play critical regulatory roles during its onset and recovery. Recent studies have highlighted the essential role of monocytes and their differentiated counterparts, monocyte-derived macrophages (MoDM), in post-ischemic stroke immune responses. However, the regulatory function of programmed death-ligand 1 (PD-L1), a classical immune checkpoint molecule, in ischemic stroke-related immune modulation remains incompletely understood. This study systematically investigates the expression dynamics, functional roles, and therapeutic potential of PD-L1 in post-ischemic stroke immune regulation and neuroprotection.

### Objective:

1. To delineate the dynamic changes in programmed cell death protein 1 (PD-1)/PD-L1 signaling in peripheral monocytes after ischemic stroke and characterize the expression profiles of immune checkpoint molecules and myeloid composition using transcriptomics and high-dimensional flow cytometry.
2. To investigate the role of PD-L1 in regulating MoDM function and evaluate its effect on post-ischemic stroke neuroprotection and age-related differences.
3. To validate the critical role of MoDM in PD-L1-mediated immune regulation and neuroprotection, elucidate downstream mechanisms, and assess the

therapeutic efficacy of targeting this pathway.

### **Methods:**

1. Public transcriptomic datasets from human ischemic stroke peripheral blood were analyzed to identify differentially expressed immune checkpoint genes in monocytes, with a focus on PD-L1 expression across MoDM subtypes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from 10 ischemic stroke patients on days 1, 3, and 7 after onset and from 5 healthy controls. Mass cytometry (CyTOF) was used to assess the composition of myeloid subpopulations (cMono, iMono, ncMono, DCs, pDCs) and PD-1/PD-L1 protein expression dynamics within CD45<sup>+</sup> cells.
2. In vitro MoDM models were constructed using mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs). PD-L1 expression was modulated via siRNA knockdown and overexpression, and M1/M2 polarization markers were quantified under LPS or IL-4 stimulation. In vivo, tMCAO and dMCAO models were established in young and aged C57BL/6J mice, respectively, and treated with PD-L1 neutralizing antibody (PD-L1 mAb) to evaluate neuroprotection, inflammation suppression, and blood-brain barrier (BBB) integrity.
3. Clodronate liposomes (Clo-Lip) were used to selectively deplete MoDMs from ischemic brain tissue, combined with PD-L1 mAb administration. TTC, HE, Nissl, and TUNEL staining, behavioral assessments, flow cytometry, immunofluorescence, Western blotting, and bulk RNA sequencing were applied to evaluate the role of MoDMs in PD-L1-mediated neuroprotection, inflammation control, and immune microenvironment remodeling.

### **Results:**

1. Transcriptomic analysis revealed abnormal expression of multiple immune checkpoint genes in peripheral monocytes from ischemic stroke patients, among which PD-L1 (CD274) occupied a central position in the PPI network

and was more highly expressed in M1-type MoDMs than in M2-type. CyTOF analysis showed that, after ischemic stroke, the proportion of cMono increased while iMono decreased in peripheral CD45<sup>+</sup> blood cells. PD-1 and PD-L1 expression levels in cMono were significantly lower than in controls, with similar downregulation trends observed in iMono and DCs.

2. In vitro experiments showed that PD-L1 overexpression promoted BMDM polarization toward the M1 phenotype, while PD-L1 knockdown enhanced the M2 phenotype. In vivo, PD-L1 neutralizing antibody treatment improved neurological function, preserved brain tissue structure and BBB integrity, and reduced inflammation and apoptosis in both young and aged ischemic stroke mice, with more pronounced effects in the young. Transcriptomic and immunofluorescence results indicated that PD-L1 mAb significantly upregulated tight junction-related genes and proteins (Claudin-5, ZO-1, Occludin), and reduced Evans Blue leakage. Young mice exhibited superior BBB restoration compared to aged mice. ELISA and TUNEL analyses demonstrated that PD-L1 mAb reduced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  expression and neuronal apoptosis, with stronger anti-inflammatory and anti-apoptotic effects observed in the young group.
3. Immunofluorescence and flow cytometry showed that PD-L1 was mainly expressed in CD68<sup>+</sup> MoDMs within ischemic brain tissue. Clo-Lip treatment significantly reduced MoDM infiltration and downregulated PD-L1 expression. After MoDM depletion, the neuroprotective effects of PD-L1 mAb on neurological function, brain structure, and apoptosis-related proteins were weakened. RNA-seq analysis showed impaired activation of the PI3K/Akt pathway and increased expression of pro-inflammatory chemokines in the absence of MoDMs. Immune infiltration and flow cytometry results demonstrated that MoDM depletion altered the distribution of macrophage subpopulations and reduced PD-L1 mAb-mediated regulation of M1 polarization and p-Akt expression.

**Conclusions:**

1. PD-1/PD-L1 expression is downregulated in peripheral monocytes after ischemic stroke, accompanied by alterations in myeloid composition, indicating immune checkpoint dysregulation and weakened myeloid immune modulation.
2. PD-L1 regulates the pro- and anti-inflammatory phenotypes of MoDMs; PD-L1 blockade exerts significant neuroprotective effects in ischemic stroke models, with evident age-related differences.
3. MoDMs are the primary PD-L1-expressing cells in post-ischemic stroke brain tissue and play a central role in PD-L1-mediated immune regulation and neuroprotection. MoDM depletion markedly weakens the therapeutic effects of PD-L1 mAb, supporting MoDMs as potential targets for ischemic stroke immunotherapy.

**Key Words:**

Programmed death-ligand 1 (PD-L1); Ischemic stroke; Monocytes; Monocyte-derived macrophages (MoDMs); Neuroprotection

## 缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
Akt	Protein Kinase B	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B
AP	PD-L1 mAb-treated group	PD-L1 单抗处理组
AMP	Clo-Lip pretreated + PD-L1 mAb-treated group	Clo-Lip 预处理后 PD-L1 单抗处理组
Arg-1	Arginase-1	精氨酸酶-1
Bax	Bcl-2-Associated X Protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
BBB	Blood Brain Barrier	血脑屏障
C-Cas3	Cleaved Caspase-3	裂解型半胱天冬酶-3
Cas3	Caspase-3	半胱天冬酶-3
CD11b	Integrin $\alpha$ M subunit	整合素 $\alpha$ M 链
CD31	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	血小板内皮细胞黏附分子-1
CD45	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C	蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C 型
CD68	Cluster of Differentiation 68	分化簇 68
CD172a	Signal Regulatory Protein Alpha	信号调节蛋白 $\alpha$
cDC	Conventional Dendritic Cell	经典树突状细胞
cMono	Classical Monocytes	经典单核细胞
Clo-Lip	Clodronate Liposomes	氯膦酸脂质体
CLDN-5	Tight Junction Protein Claudin-5	紧密连接蛋白 Claudin-5
CyTOF	Cytometry by Time-of-Flight; Mass Cytometry	质谱流式细胞术
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns	损伤相关分子模式
DCs	Dendritic Cells	树突状细胞

缩略词表(续表)

缩略词	英文全称	中文全称
DEGs	Differentially Expressed Genes	差异表达基因
dMCAO	Distal Middle Cerebral Artery Occlusion	远端大脑中动脉闭塞模型
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	流式细胞分选
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis	基因集富集分析
HE	Hematoxylin-Eosin Staining	苏木精-伊红染色
Iba-1	Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 1	电离钙结合适配分子 1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 Beta	白细胞介素-1 $\beta$
IL-10	Interleukin-10	白细胞介素-10
ICOS	Inducible T-cell COStimulator	可诱导 T 细胞共刺激因子
iMono	Intermediate Monocytes	中间单核细胞
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	诱导型一氧化氮合酶
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3	淋巴细胞活化基因 3
Ly6C	Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus C	淋巴抗原 6 复合体 C
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion	大脑中动脉闭塞
MCODE	Molecular Complex Detection	分子复合体检测算法
mNSS	Modified Neurological Severity Score	改良神经功能缺损评分
MoDM	Monocyte-Derived Macrophages	单核细胞来源的巨噬细胞
ncMono	Non-Classical Monocytes	非经典单核细胞

缩略词表(续表)

缩略词	英文全称	中文全称
ncMono	Non-Classical Monocytes	非经典单核细胞
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B	核因子- $\kappa$ B
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale	美国国立卫生研究院缺血性卒中量表
Nos2	Nitric Oxide Synthase 2	一氧化氮合酶 2
OCLDN	Tight Junction Protein Occludin	紧密连接蛋白 Occludin
p-Akt	Phosphorylated Protein Kinase B	磷酸化 Akt
pDCs	Plasmacytoid Dendritic Cells	浆细胞样树突状细胞
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCA	Principal Component Analysis	主成分分析
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1	程序性死亡配体 1
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PPI	Protein-Protein Interaction	蛋白互作
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	定量实时聚合酶链式反应
RNA-seq	RNA Sequencing	RNA 测序
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	信号转导及转录激活因子 3
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins	交互基因/蛋白检索工具
TIGIT	T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains	免疫球蛋白 ITIM 结构域 T 细胞免疫受体

缩略词表(续表)

缩略词	英文全称	中文全称
Tim-3	T-cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3	T 细胞免疫球蛋白黏 蛋白结构域 3
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alpha	肿瘤坏死因子 $\alpha$
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride Staining	2,3,5-三苯基四氮唑 氯化物染色
tMCAO	Transient Middle Cerebral Artery Occlusion	短暂性大脑中动脉 闭塞模型
VISTA	V-domain Ig Suppressor of T-cell Activation	T 细胞活化 V 结构域 Ig 抑制因子
WB	Western Blot	蛋白质印迹
ZO-1	Zonula Occludens-1	紧密连接蛋白 ZO-1

## 第一部分 绪论

### 1 研究背景

卒中是全球人口死亡的第二大原因，也是中国成人致残的主要病因<sup>[1]</sup>。随着中国人口老龄化加剧，缺血性卒中的发病率和死亡率持续上升<sup>[2]</sup>，其中缺血性卒中（ischemic stroke, IS）占有所有卒中的85%以上<sup>[3]</sup>。目前，缺血性卒中的主要治疗手段包括静脉溶栓和机械取栓<sup>[4]</sup>，但由于治疗时间窗短暂以及取栓技术的限制，仅约10%的患者能够接受有效治疗<sup>[5]</sup>。即便接受治疗，许多患者仍面临长期神经功能障碍。因此，探索新的治疗策略以改善缺血性卒中预后仍是当前研究的重要方向。

近年来，免疫检查点（immune checkpoints）在维持免疫稳态与调节炎症反应中的关键作用日益受到重视，相关阻断疗法已广泛应用于肿瘤免疫治疗领域<sup>[6]</sup>。相比之下，其在非肿瘤性疾病，尤其是缺血性卒中中的作用机制尚未被充分阐明。本课题组长期致力于单核细胞（monocytes）在缺血性卒中后炎症反应与神经修复中的功能研究<sup>[7-11]</sup>，并关注其在缺血性卒中免疫调控中的潜在靶点价值。鉴于单核细胞及其分化的单核来源巨噬细胞（monocyte-derived macrophages, MoDM）在缺血性卒中后免疫应答中的核心地位，以及程序性死亡配体1（programmed cell death ligand 1, PD-L1）作为典型免疫检查点分子的调节功能，本研究围绕PD-L1在缺血性卒中后的表达特征、细胞功能调控及干预效果进行系统探讨，旨在揭示其在缺血性卒中相关免疫调控和神经保护中的作用机制，为拓展缺血性卒中免疫干预策略提供理论支持。

### 2 缺血性卒中脑损伤与外周免疫系统的相互作用

缺血性卒中导致局部脑组织缺氧、能量代谢受损及神经细胞死亡，进而触发中枢和外周免疫系统的级联反应<sup>[12]</sup>。在缺血性卒中后数小时内，小胶质细胞和星形胶质细胞迅速被激活，释放促炎细胞因子和趋化因子，如肿瘤细胞坏死因子 $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）、白细胞介素-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ），从而招募大量炎症细胞（如中性粒细胞、单核/巨噬细胞、T细胞等）渗入病灶<sup>[13, 14]</sup>。近年来，越来越多的证据表明，控制缺血性卒中后的神经炎症有助于促进神经修复和功能恢复。

然而，缺血性卒中不仅影响中枢神经系统，还可能导致外周免疫抑制<sup>[15, 16]</sup>。

缺血性卒中后，患者常表现出淋巴细胞减少、T 细胞活性受损及单核细胞功能异常，使其易感染继发性肺炎和泌尿道感染<sup>[17, 18]</sup>。当缺血性卒中发生时，坏死细胞释放损伤相关分子模式（damage-associated molecular patterns, DAMPs），激活先天免疫系统，触发炎症反应和免疫细胞的级联效应<sup>[19, 20]</sup>。这些 DAMPs 刺激小胶质细胞活化为促炎表型，释放大量促炎因子，从而加重脑损伤，并进一步招募外周单核细胞浸润病灶<sup>[21]</sup>。

尽管外周和中枢免疫系统在缺血性卒中后的炎症反应中紧密相互作用，但目前其具体的免疫调控机制仍不明确。因此，研究缺血性卒中后中枢和外周免疫反应之间的相互作用，并探索免疫检查点在其中的调控作用，对于缺血性卒中治疗策略的制定具有重要意义。

### 3 单核细胞在缺血性卒中后脑损伤和外周免疫系统中的作用

单核细胞作为先天免疫系统的关键组成部分，在缺血性卒中后的炎症反应中发挥重要的双重作用。它们既可通过清除坏死组织、促进组织修复发挥保护作用，也可能通过释放促炎因子、破坏血脑屏障（blood brain barrier, BBB）加重缺血性卒中病理过程<sup>[22]</sup>。在缺血性卒中早期，外周单核细胞通过 CC 型趋化因子受体 2（C-C chemokine receptor type 2, CCR2）介导的趋化作用被招募至缺血脑区，并分化为促炎（M1 型）或抗炎（M2 型）单核来源巨噬细胞（MoDMs），以适应病灶的免疫环境<sup>[23]</sup>。研究发现，促炎型巨噬细胞主要表达高水平的 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-6（IL-6）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS），促进炎症级联反应，而抗炎型巨噬细胞则分泌抗炎因子白细胞介素-10（IL-10）、精氨酸酶-1（Arg-1），有助于神经修复和组织适应性变化<sup>[24]</sup>。

既往研究表明，单核细胞在缺血性卒中后对神经损伤的影响依赖于其活化状态。例如，CCR2 抑制剂可通过减少 MoDMs 的浸润来减少脑损伤<sup>[10]</sup>，而某些基因敲除（如硫酸转移酶 2B1 型 Sult2b1<sup>-/-</sup>）会促进促炎型活化，加重缺血性卒中脑损伤<sup>[11]</sup>。但目前仍不清楚 MoDMs 的功能是否受到免疫检查点分子的调控，这一问题亟待深入研究。

### 4 免疫检查点调控缺血性卒中后外周和中枢免疫反应

免疫检查点在免疫系统的调节中发挥关键作用，它们通过调控 T 细胞活性，维持免疫稳态，同时防止自身免疫损伤<sup>[25, 26]</sup>。根据功能，免疫检查点可分为正性

和负性两种类型，前者促进免疫反应，增强免疫细胞活性，而后者则抑制免疫过度激活，维持自我耐受<sup>[27]</sup>。近年来，免疫检查点在缺血性卒中后维持中枢与外周免疫耐受中的作用逐渐被认识，并被视为调控缺血性卒中后炎症反应的潜在治疗靶点<sup>[26]</sup>。

目前已有研究表明，缺血性卒中后脑损伤与外周免疫抑制之间存在密切联系，提示免疫检查点可能是影响缺血性卒中后炎症和神经损伤的重要调控因子<sup>[28]</sup>。然而，迄今为止，关于缺血性卒中后免疫相关的研究仍主要集中在免疫细胞数量和功能的变化，针对免疫检查点在缺血性卒中后动态调控的研究较为有限。

程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 是典型的负性免疫检查点分子，主要在激活 T 细胞上表达，通过与其配体 PD-L1 结合，抑制 T 细胞活性，维持免疫稳态<sup>[29]</sup>。已有研究表明，在大脑中动脉阻断 (MCAO) 模型中，PD-1 在小胶质细胞和浸润性巨噬细胞中显著上调，PD-L1 在循环 B 细胞中的表达亦增强<sup>[26]</sup>。PD-1 基因敲除小鼠缺血性卒中后表现出更大的梗死体积和更差的神经功能，提示 PD-1/PD-L1 轴可能具有神经保护作用<sup>[30]</sup>。然而，也有研究表明，PD-L1 缺失可减少炎症细胞浸润并增加 Treg 水平，PD-L1 阻断亦可减轻炎症反应，提示其在某些情况下可能抑制抗炎过程<sup>[31, 32]</sup>。

尽管 PD-L1 可能在缺血性卒中后抑制过度炎症，但其作用并不完全清晰。因此，深入研究 PD-L1 在 MoDMs 介导的免疫调控机制，以及 PD-L1 阻断是否能成为缺血性卒中治疗的新策略，对于理解缺血性卒中后炎症应答与优化免疫干预具有重要意义。

## 5 研究目标与创新点

本研究综合运用外周血免疫分析、生物信息学、动物模型及体外实验，系统探讨 PD-L1 介导的单核来源巨噬细胞 (MoDM) 免疫调控在缺血性卒中后神经炎症中的作用及其阻断干预的可行性。

首先，基于 GEO 数据库和生物信息学分析，本研究揭示了缺血性卒中患者外周单核细胞中免疫检查点分子的表达模式及其动态变化，并结合 CyTOF 质谱流式细胞术，深入研究了缺血性卒中后外周免疫细胞的时序性变化，明确了 PD-L1 在免疫微环境中的潜在调控作用。其次，通过骨髓细胞培养 BMDM 并诱导其分化为不同功能表型的 MoDM，验证了 PD-L1 对 MoDM 功能表型的调控作

用。同时,采用流式细胞术和 Bulk-RNA 测序,分析了缺血性卒中后外周单核细胞变化及脑组织中 PD-L1 表达的年龄差异。接着,采用 PD-L1 单克隆抗体(PD-L1 mAb)干预不同年龄组和不同缺血性卒中模型的小鼠,验证了 PD-L1 阻断对缺血性卒中治疗的效果,并分析了其年龄与模型差异性。进一步通过 Bulk-RNA 测序分析,明确了 PD-L1 阻断在不同年龄组缺血性卒中治疗中的机制差异。最后,为了深入探讨 PD-L1 介导的 MoDM 免疫调控在缺血性卒中后神经炎症中的具体功能,本研究通过氯膦酸脂质体(Clodronate-liposome, Clo-Lip)选择性清除 MoDM,验证了 MoDM 是否为缺血性卒中后 PD-L1 的主要来源,并初步阐明了 PD-L1 依赖的 MoDM 在缺血性卒中后炎症调控中的作用机制。

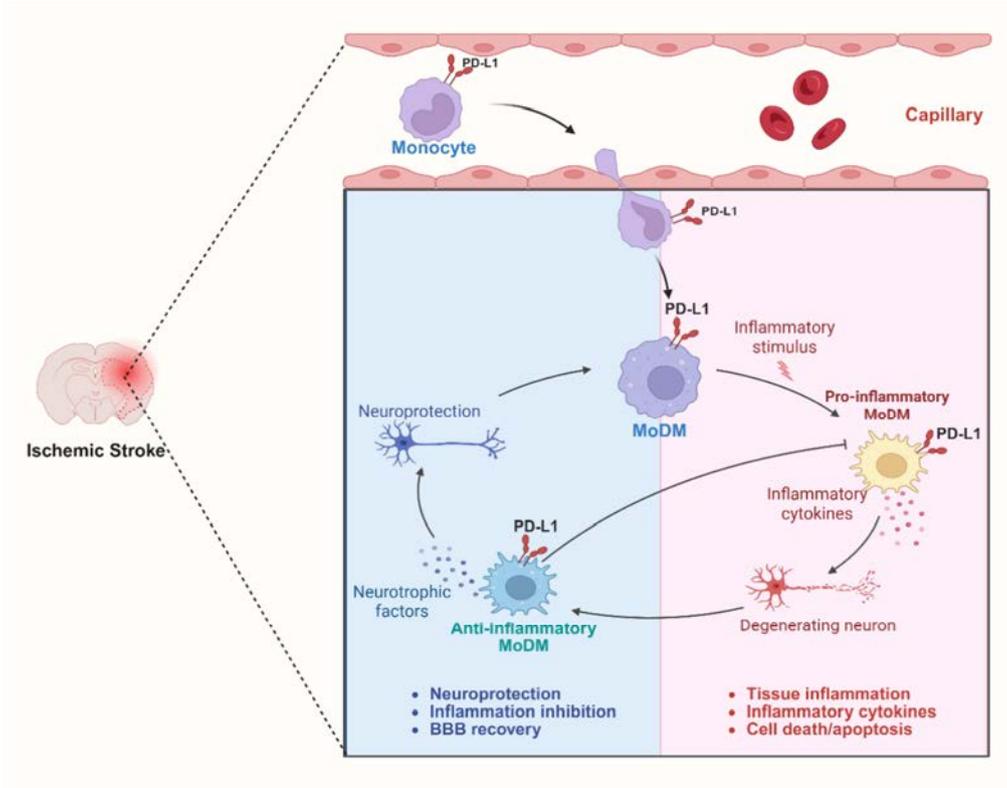
**本研究的创新点在于:**

(1) 以免疫检查点分子 PD-L1 为核心,系统探讨其在单核来源巨噬细胞中的表达特征及其调控功能;

(2) 明确 MoDM 是缺血性卒中脑组织中 PD-L1 的主要表达来源,并验证 PD-L1 通过调控 MoDM 炎症表型、血脑屏障结构和局部免疫微环境参与缺血性卒中后的炎症调节与神经保护;

(3) 揭示 PD-L1 干预在不同年龄背景下的效应差异,为老年缺血性卒中患者的免疫干预策略提供理论基础。

本研究所述“免疫调控”特指 MoDM 在缺血性卒中后炎症反应中的调节作用,重点关注 PD-L1 通过调控 MoDM 功能表型及相关因子表达所介导的神经保护机制。



注：缺血性卒中引发血脑屏障（BBB）破坏，外周单核细胞可穿越屏障进入脑组织，并分化为具不同功能表型的单核来源巨噬细胞（MoDM）。在炎症刺激下，MoDM 可向促炎型或抗炎型极化，表达 PD-L1 并调节炎症因子产生。促炎型 MoDM 释放多种炎症因子，增强局部炎症反应，诱导神经元损伤；而抗炎型 MoDM 则可分泌神经营养因子、抑制炎症反应并促进 BBB 修复，发挥神经保护作用。本研究围绕 PD-L1 对 MoDM 功能状态的调控，系统阐明其在缺血性卒中后免疫调节与神经保护中的关键作用和治疗价值。

图 1.1 PD-L1 介导的单核来源巨噬细胞免疫调控在缺血性卒中后神经炎症中的作用示意图

**Fig. 1.1 Schematic representation of PD-L1-mediated MoDM immune regulation in post-ischemic stroke neuroinflammation**

## 第二部分 缺血性卒中后外周单核细胞 PD-1/PD-L1 表达特征及其动态变化研究

### 前言

缺血性卒中不仅导致局部脑组织损伤,还会引发一系列系统性免疫反应,涉及中枢与外周免疫系统的复杂调控。研究表明,缺血性卒中后炎症不仅局限于脑组织内,还伴随外周免疫系统的显著改变<sup>[17,18]</sup>。单核细胞(monocytes)作为先天免疫的关键组成部分,在缺血性卒中后迅速迁移至缺血脑区并分化为功能各异的巨噬细胞(MoDM),在清除损伤组织、调控炎症反应和促进组织修复方面发挥核心作用<sup>[22]</sup>。然而,MoDM在缺血性卒中后表现出高度的可塑性,其促炎或抗炎活化受局部微环境的精细调控,其中免疫检查点(immune checkpoints)可能起到关键作用。

免疫检查点作为调节免疫系统活性的关键分子,可通过正性或负性信号调控免疫细胞的功能,以维持免疫稳态<sup>[25]</sup>。该概念最早由 James P.Allison 和 Tasuku Honjo 提出,并成为癌症免疫治疗的重要靶点<sup>[33]</sup>。目前研究较为深入的免疫检查点分子包括 CTLA-4、PD-1/PD-L1、TIM-3 和 LAG-3 等<sup>[34,35]</sup>。其中,PD-1/PD-L1 通路被广泛认为是负性免疫调控的重要机制,能够通过抑制 T 细胞活化,防止过度炎症反应<sup>[29]</sup>。然而,近年来的研究发现,免疫检查点不仅在 T 细胞调控中发挥作用,还广泛表达于髓系细胞,并可能影响其炎症表型<sup>[36]</sup>。

尽管关于免疫检查点的研究主要集中于自身免疫性疾病和肿瘤免疫逃逸,近年来其在缺血性卒中后免疫调控中的作用逐渐受到关注<sup>[37-39]</sup>。程序性死亡受体-1(PD-1)及其配体程序性死亡配体-1(PD-L1)在缺血性卒中后上调<sup>[40]</sup>,提示外周免疫抑制的发生。其他负性免疫检查点,如细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)和 T 细胞免疫球蛋白与粘蛋白结构域-3(TIM-3),通过调节 T 细胞活性并限制过度炎症<sup>[41]</sup>。淋巴细胞激活基因-3(LAG-3)在缺血性卒中后也有助于免疫耐受<sup>[42]</sup>。这些研究结果突显了免疫检查点在缺血性卒中恢复中的重要性。然而,大多数研究集中于中度到重度缺血性卒中的免疫反应<sup>[43-45]</sup>,轻度缺血性卒中的免疫机制却鲜有探索。轻度缺血性卒中通常定义为 NIHSS 评分 $\leq 5$ <sup>[46-49]</sup>,由于认为其恢复需求较小,因此常常被忽视<sup>[50-52]</sup>。约三分之一的轻度缺血性卒中患

者未接受溶栓治疗，且最终经历不良结局<sup>[53]</sup>，因此，探索和理解免疫检查点在轻度缺血性卒中患者中的表达模式和动态变化有助于开发针对性的免疫疗法，以改善轻度缺血性卒中患者的预后。

质谱流式术（Cytometry by Time-of-Flight, CyTOF）作为一种前沿的质谱分析技术，能够实现对免疫标志物的高通量精准检测，已在多个疾病模型中展现出超越传统流式细胞术的分析能力<sup>[54]</sup>。虽然该技术已在缺血性卒中动物模型中得到一定应用<sup>[55-58]</sup>，但针对缺血性卒中患者、尤其是轻度卒中患者外周血样本的系统研究仍十分有限。

本研究基于临床缺血性卒中患者的外周血样本，结合转录组数据与生物信息学方法，系统描绘缺血性卒中后外周单核细胞中免疫检查点基因的表达特征。进一步通过 CyTOF 高维流式质谱技术，在单细胞水平上分析免疫细胞亚群构成及 PD-1/PD-L1 等免疫检查点的表达动态。本研究有助于深化对缺血性卒中后外周髓系免疫调控变化的理解，并为后续靶向干预策略的探索提供基础数据支持。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 基因表达数据获取与预处理

基因表达数据来源于美国国立生物技术信息中心（NCBI）维护的基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus, GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）。本研究共纳入两个独立数据集：GSE61298 和 GSE22255。GSE61298 数据集基于 Illumina HiSeq 2000 平台（注释文件 GPL11154）获取 RNA 表达谱数据，研究包含健康供体来源的单核细胞，通过不同细胞因子诱导分化为不同活化状态的巨噬细胞，共包含 7 种巨噬细胞亚型，每种亚型 3 例生物学重复。GSE22255 数据集基于 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 平台（注释文件 GPL570），包含 40 例临床样本，其中缺血性卒中（IS）患者 20 例，对照 20 例，所有样本均来源于外周血单个核细胞（PBMC）。为了规避性激素对免疫系统的潜在影响，本研究统一选择男性患者的样本，以减少个体间的生物学变异。

所有原始数据均通过 GEO 数据库公开的系列矩阵文件（Series Matrix Files）标准化格式下载，后续分析根据各数据集技术平台的注释文件进行基因探针 ID 与基因符号的标准化匹配。

### 1.1.2 人外周血细胞采集

#### （1）伦理批准与研究对象

本研究已获得贵州医科大学附属医院伦理委员会（批准号：2023228K）和金阳医院伦理委员会批准（批准号：JYYY-2023-XM-38）。研究对象为 2023 年 12 月至 2024 年 4 月期间在金阳医院神经内科三病区就诊并确诊为急性缺血性卒中中的患者。研究期间，共 631 例患者因急性缺血性卒中入院。

轻型缺血性卒中（mild ischemic stroke, MIS）占有缺血性卒中病例的 30%–50%，是最常见的卒中类型之一<sup>[59]</sup>。虽然临床表现相对较轻，但轻型缺血性卒中仍可能引发一定程度的免疫响应，其对恢复过程的潜在影响逐渐受到关注。然而，现有研究多聚焦于 NIHSS>5 的中重度缺血性卒中人群，针对轻型缺血性卒中患者免疫学变化的系统研究仍较为有限。

在中重度缺血性卒中研究中，评估缺血性卒中本身诱导的免疫适应过程面临诸多干扰因素。此类患者常接受再灌注治疗，如静脉溶栓（使用重组组织型纤溶

酶原激活剂, rt-PA) 或机械取栓 (mechanical thrombectomy, MT), 而这些干预措施本身即会引发免疫激活或抑制。例如, rt-PA 可增强白细胞活性、促炎因子释放, 并影响血脑屏障的完整性<sup>[60, 61]</sup>; EVT 也可能因机械性操作诱发局部及系统性炎症反应<sup>[62]</sup>。此外, 缺血性卒中急性期常伴发感染、心肺功能障碍等并发症<sup>[63]</sup>, 进一步增加了免疫应答的复杂性, 从而掩盖缺血性卒中本身的免疫效应。

相比之下, MIS 患者多数无需 ICU 监护或广谱抗感染治疗, 内科干预较少, 整体免疫状态相对稳定, 感染率低, 免疫检查点表达受外源干扰较小, 因此更适用于探究缺血性卒中本身对外周免疫系统的调控作用。其外周血免疫特征也更有可能是真实反映缺血性卒中后的内源性免疫变化。

基于此, 本研究选取未接受溶栓或机械取栓的轻型缺血性卒中患者 (NIHSS $\leq$ 5) 作为研究对象, 尽可能排除治疗与并发症干扰, 以更精准地探究缺血性卒中后外周免疫细胞的时序性变化特征, 并为缺血性卒中后免疫调控机制研究提供更可靠的基础。

为减少选择偏倚, 本研究采取以下措施: ①连续入组: 所有符合纳入和排除标准的患者均系统性纳入研究; ②标准化筛选: 患者的招募基于统一的临床和影像学标准; ③数据收集盲法: 数据收集和分析的研究人员对临床结局保持盲态; ④减少转诊偏倚: 仅纳入在神经内科确诊的患者, 以避免二次转诊带来的选择偏倚。所有研究参与者均在入组前签署书面知情同意书。

## (2) 研究队列及入排标准

本研究共纳入 10 例急性轻型缺血性卒中 (mild ischemic stroke, MIS) 患者, 并设 5 例年龄及性别匹配的对照组。所有患者均于入院后 24 小时、72 小时及 7 天采集外周血样, 用于后续免疫学分析。

### 1) 缺血性卒中组:

- a) 纳入标准: ① 年龄 $>$ 18 岁; ② 符合急性缺血性卒中的局灶性神经功能缺损; ③ 可测量的神经功能缺损 (NIHSS $\leq$ 5); ④ 通过磁共振血管成像 (MRA) 及弥散加权成像 (DWI) 证实为前循环缺血性卒中; ⑤ 发病至入院时间 4.5-24 小时。
- b) 排除标准: ① 影像学证实为出血性卒中; ② 其他中枢神经系统疾病的既往病史; ③ 既往存在神经功能障碍 (改良 Rankin 量表 mRS  $>$ 2);

④ 存在吞咽困难；⑤ 既往慢性心律失常或房室传导阻滞病史；⑥ 近期使用抗肿瘤、免疫抑制或免疫调节治疗；⑦ 伴有黄斑水肿。

2) 对照组：

- a) 纳入标准：年龄约 60 岁，无缺血性或出血性卒中病史。
- b) 排除标准：与缺血性卒中组一致。

1.1.3 主要仪器设备和实验耗材

(1) 主要仪器设备：

表 2.1 主要仪器设备

Tab. 2.1 List of main instruments and equipment

名称	厂家（国家）
Helios 质谱流式仪	Fluidigm (美国)
离心机	Eppendorf (德国)
涡旋混匀器	Thermo Fisher (美国)
冰盒	Thermo Fisher (美国)

(2) 主要试剂耗材：

表 2.2 主要试剂耗材

Tab. 2.2 List of main reagents and consumables

名称	厂家（国家）
FACS Buffer	BioLegend (美国)
台盼蓝	Solarbio (中国)
Ficoll 分离液	GE Healthcare (美国)
ACK 红细胞裂解液	Thermo Fisher (美国)
Fix and Perm Buffer	BD Biosciences (美国)
1× Permeabilization Buffer	Thermo Fisher (美国)
Foxp3 预固定液	eBioscience (美国)
DNA 染色液	Thermo Fisher (美国)
194Pt 死活染液	Fluidigm (美国)
Antibody mix (Surface)	BioLegend (美国)

表 2.3 主要试剂耗材

Tab. 2.3 List of main reagents and consumables

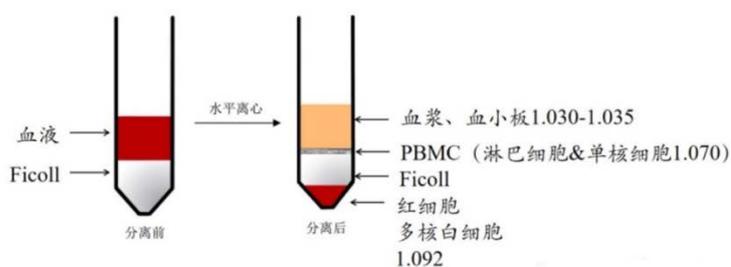
名称	厂家 (国家)
Antibody mix (Intracellular)	BioLegend (美国)
1.5mL/15mL 离心管	JET BIOFIL (中国)
70 $\mu$ m 细胞筛	JET BIOFIL (中国)
带滤网流式管	BD Falcon (美国)
1640 基础培养基	BasalMedia (中国)
Percoll	GE Healthcare (美国)
红细胞裂解液	PLT (中国)
DNA 酶	Sigma-Aldrich (美国)
胶原蛋白酶	VETEC (中国)
佛波酯	Invitrogen (美国)
植物血凝素	Gibco (美国)
高尔基体阻断剂	Invitrogen (美国)
莫能霉素	阿拉丁 (中国)
牛血清白蛋白	Sigma-Aldrich (美国)
磷酸盐缓冲液	GENOM (中国)
固定破膜缓冲液	FLUIDIGM (美国)
破膜缓冲液	Thermo Fisher Scientific (美国)
固定/破膜浓缩液	Thermo Fisher Scientific (美国)
固定/破膜稀释剂	Thermo Fisher Scientific (美国)
抗体金属标记试剂盒	FLUIDIGM (美国)
194 顺铂死活染色剂	FLUIDIGM (美国)
DNA 染色剂	FLUIDIGM (美国)
调试液	FLUIDIGM (美国)
校准微球	FLUIDIGM (美国)
洗涤液	FLUIDIGM (美国)

## 1.2 方法

### 1.2.1 外周血处理标准流程

(1) Ficoll 法分离 PBMC

- 1) 使用 10mL 移液管将采血管内的全血样本转移至 50mL 离心管。
- 2) 取新的 50mL 离心管，加入 10mL Ficoll 分离液。
- 3) 用 PBS 将血样稀释至 20mL，并缓慢沿管壁加入 Ficoll 分离液上层，避免破坏界面。
- 4) 平衡离心管后，放入水平离心机，设定升速 1、降速 1，400g 离心 15 分钟。
- 5) 离心后，小心吸除 Ficoll 层上方的血浆，保留约 0.5mL 避免 PBMC 损失。
- 6) 使用 1mL 移液器逐步收集 PBMC 白膜层至新的 50mL 离心管，确保 Ficoll 层无细胞残留。
- 7) 加入 FACS Buffer 至 30mL，400g 离心 10 分钟，弃上清。
- 8) 加入 1mL ACK 红细胞裂解液，轻柔吹打混匀，室温静置 1-2 分钟裂解残留红细胞。
- 9) 加入 FACS Buffer 至 10mL，400g 离心 5 分钟，弃去上清。
- 10) 用 4mL FACS Buffer 重悬细胞沉淀，取 10 $\mu$ L 细胞悬液，加入台盼蓝染液稀释至适当倍数，进行细胞计数。
- 11) 再次离心，弃去上清，收集细胞沉淀备用。



Ficoll分离细胞的原理效果图



图 2.1 外周血提取 PBMC 流程示意图

**Fig. 2.1 Schematic diagram of the peripheral blood PBMC extraction process**

### 1.2.2 染色标准流程

#### (1) 实验细胞准备

1) 使用 Ficoll 法从新鲜外周血（采集后 24h 内）中分离 PBMC，计数后取  $3 \times 10^6$  细胞至 1.5mL 离心管，液氮冻存。

2) 从液氮取出细胞，迅速复苏，并确保细胞状态良好，无明显聚团现象。取  $3 \times 10^6$  细胞至 1.5mL 离心管备用。

#### (2) 死活染色

1) 使用 PBS 配制终浓度  $0.25 \mu\text{M}$  194Pt(1mM) 死活染液。

2) 每个样本加入  $100 \mu\text{L}$  194Pt 死活染液，重悬细胞，冰上孵育 5min。

3) 加入 1mL FACS Buffer，轻柔混匀， $4^\circ\text{C}$  400g 离心 5 min，弃去上清，重复洗涤 2 次。

#### (3) 细胞封闭

1) 配制 Block mix，每个样本使用  $50 \mu\text{L}$ 。

2) 加入  $50 \mu\text{L}$  Block mix 重悬细胞，冰上孵育 20min。

3) 孵育结束后，无需去除封闭液，直接加入 Antibody mix 进行染色，同时开始配制 Antibody mix（见表 2.4）。

#### (4) 胞外染色

1) 配制 Antibody mix (Surface)（见表 2.4），并向每个样本加入  $50 \mu\text{L}$ （与前述  $50 \mu\text{L}$  Block mix 混合，总体积为  $100 \mu\text{L}$ ）。

2) 轻柔吹打混匀细胞，冰上孵育 30min。

3) 加入 1mL FACS Buffer， $4^\circ\text{C}$  400g 离心 5min，弃去上清。

4) 加入 1mL FACS Buffer，重复洗涤 2 次，以去除未结合抗体。

#### (5) 细胞固定及 DNA 染色

1) 使用 Fix and Perm Buffer 配制终浓度  $250 \text{ nM}$  Ir ( $500 \mu\text{M}$ ) 染液。

2) 取  $200 \mu\text{L}$  染液重悬细胞，室温孵育 1h 或  $4^\circ\text{C}$  过夜固定。

### 1.2.3 胞内染色及上机流程

#### (1) 试剂配制

1)  $1 \times$  Permeabilization Buffer: 用 ddH<sub>2</sub>O 按照 1:10 稀释  $10 \times$  Permeabilization

Buffer。

2) Foxp3 预固定液: 用 Fixation/Permeabilization Diluent 按 3:1 体积比稀释 Fixation/Permeabilization Concentrate, 每个样本使用 100 $\mu$ L。

(2) 细胞预固定

1) 清洗细胞: 每个样本加入 1mL 1 $\times$  Permeabilization Buffer 重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 800g 离心 5min, 弃去上清, 重复 2 次。

2) 固定处理: 每个样本加入 100 $\mu$ L Foxp3 预固定液, 重悬细胞, 室温孵育 30min。

3) 固定后清洗: 每个样本加入 1mL 1 $\times$  Permeabilization Buffer, 4 $^{\circ}$ C 800g 离心 5min, 弃去上清, 重复 2 次。

(3) 胞内染色

1) 孵育前准备: 在孵育期间, 配置 Antibody mix (Intracellular) (见表 2.4)。

2) 染色: 每个样本加入 100 $\mu$ L Antibody mix (Intracellular), 重悬细胞, 冰上孵育 30min。

3) 清洗: 每个样本加入 1mL 1 $\times$  FACS Buffer, 4 $^{\circ}$ C 800g 离心 5min, 弃去上清。

(4) 细胞上机准备

1) 细胞重悬: 每个样本加入 1mL ddH<sub>2</sub>O 重悬细胞, 并用移液器转移至 5mL 带滤网流式管。

2) 管壁清洗: 向 1.5mL 离心管中加入 1mL ddH<sub>2</sub>O, 轻柔吹打清洗管壁, 并将全部溶液转移至 5mL 带滤网流式管。

3) 终末清洗: 4 $^{\circ}$ C 800g 离心 5min, 弃去上清。

4) 最终重悬: 每个样本加入 1mL ddH<sub>2</sub>O 重悬细胞, 取 10 $\mu$ L 进行计数。

5) 送样上机: 将样本送至 Helios 质谱流式仪进行检测。

表 2.4 CyTOF Panel 信息

Tab. 2.4 Panel information of CyTOF

List	Label	marker	List	Label	marker
1	89Y	CD45	22	159Tb	CD56
2	115In	CD3	23	160Gd	CD68
3	141Pr	CD62L	24	161Dy	CX3CR1
4	142Nd	TCR $\gamma / \delta$	25	162Dy	CD1c
5	142Nd	CD19	26	163Dy	CD33
6	143Nd	CD27	27	164Dy	CD38
7	144Nd	CD14	28	165Ho	CD141(Thrombomodulin)
8	145Nd	CD115(CSF-1R)	29	166Er	CD16
9	146Nd	CD54(ICAM-1)	30	167Er	Granzyme B Recombinant
10	147Sm	CD197(CCR7)	31	168Er	CD11c
11	148Nd	TIGIT(VSTM3)	32	169Tm	CD185(CXCR5)
12	149Sm	CD25(IL-2R $\alpha$ )	33	170Er	CD172a(SIRP $\alpha$ )
13	150Nd	CD123(IL-3R $\alpha$ )	34	171Yb	CD279(PD-1)
14	151Eu	CD45RO	35	172Yb	FOXP3
15	152Sm	CD195(CCR5)	36	173Yb	IgD
16	153Eu	CD194(CCR4)	37	174Yb	VISTA(PD-1H)
17	154Sm	HLA-DR	38	175Lu	CD192(CCR2)
18	155Gd	CD45RA	39	176Yb	CD366(Tim-3)
19	156Gd	CD184(CXCR4)	40	197Au	CD4
20	157Gd	CD274(PD-L1)	41	198Pt	CD8a
21	158Gd	CD86	42	209Bi	CD11b

#### 1.2.4 数据分析

##### (1) 数据库生物信息学分析

本研究对转录组数据进行了系统的生物信息学分析。首先，利用 DESeq2 软件包筛选差异表达基因 (DEGs)，筛选标准为校正  $P$  值 (adjusted p-value) < 0.05，且  $|\log_2$  倍数变化| ( $|\log \text{fold change}|$ )  $\geq 0.263$ 。差异基因的可视化分析采用 ggplot2

(v3.3.2) 绘制火山图 (Volcano plot)。进一步地, 对筛选出的差异基因进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析, 使用 clusterProfiler (v3.14.3) 软件包实现。免疫检查点相关基因来自以往的研究和 Gene Cards 数据库下载。与 DEGs 取交集获得免疫检查点相关的关键差异基因。在蛋白互作层面, 本研究利用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) 网络, 并通过 Cytoscape (v3.9.1) 进行可视化, 以探索关键基因的互作关系, 从而更好地理解其在生物学功能中的潜在作用。

## (2) CyTOF 数据分析

原始数据采用双层条形码过滤策略, 以确保样本质量。不同批次的.fcs 文件经微珠标准化归一处理。数据分析主要包括以下步骤:

### 1) 数据预处理:

使用 FlowJo 软件去除微珠 (140Ce-), 剔除碎片 (191Ir+ 193Ir+), 清除死细胞 (194Pt-), 排除聚集细胞 (事件长度<20), 选择 CD45+免疫细胞进行后续分析 (图 2.2)。

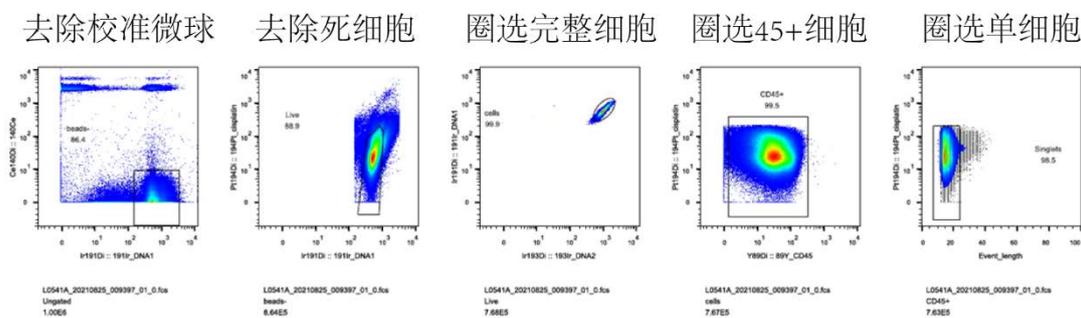
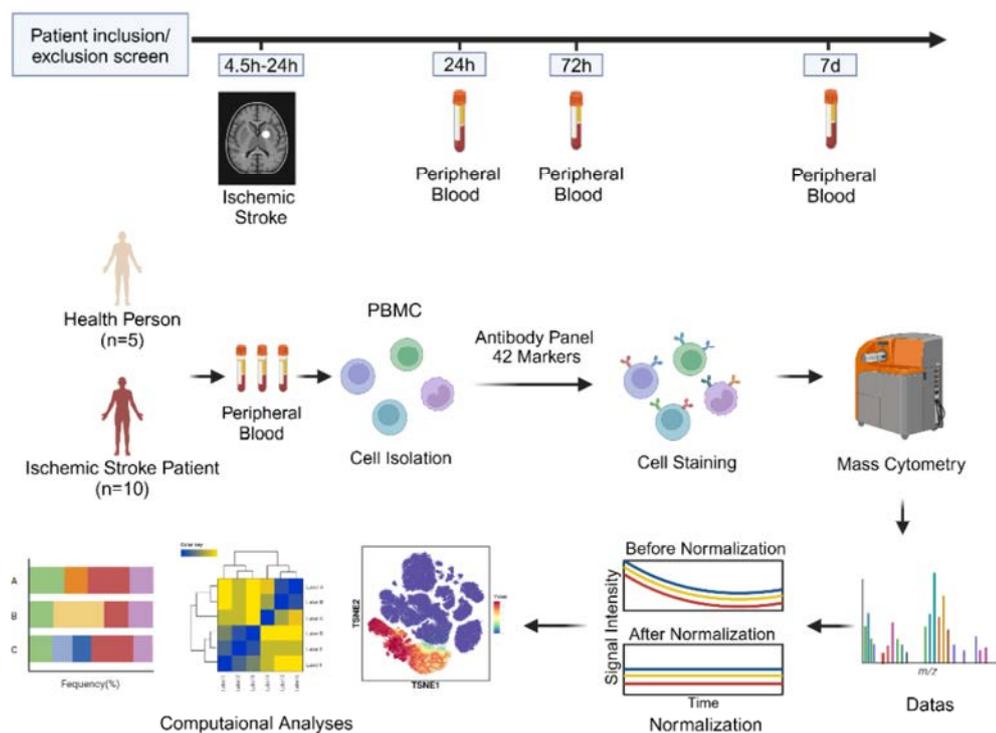


图 2.2 CyTOF 数据预处理示意图

Fig. 2.2 Schematic diagram of CyTOF data preprocessing

### 2) 细胞分类及可视化:

采用 X-shift 聚类算法对细胞进行分群, 并基于标志物表达模式进行细胞类型识别; 采用热图展示细胞类型分布, 以识别不同细胞亚群; 采用 t-SNE (t-分布随机邻域嵌入) 算法进行降维, 获得二维可视化数据。



注：本研究纳入对照组（n=5）和缺血性卒中患者（n=10），所有患者均符合纳入/排除标准，并在发病后 4.5–24 小时内入组。分别于 24 小时、72 小时和 7 天采集外周血，分离 PBMCs 后采用含 42 种标志物的抗体面板进行染色，并通过质谱流式细胞术(Mass Cytometry, CyTOF) 检测。数据经标准化处理后，采用细胞群频率分析、层次聚类（heatmap）、t-SNE 降维等方法评估外周免疫细胞亚群的动态变化。

图 2.3 缺血性卒中患者外周血免疫细胞的质谱流式检测实验流程

Fig. 2.3 Experimental workflow for CyTOF analysis of peripheral immune cells in ischemic stroke patients

### (3) 统计分析

所有数据均使用 SPSS 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 或 GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 进行统计分析。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 或 Kolmogorov-Smirnov 检验。

对于正态分布的数据，结果以均数±标准差 (Mean±SD) 表示，组间比较采用独立样本 t 检验 (Student's t-test)；对于非正态分布的数据，结果以中位数±四分位距 (Median±IQR) 表示，组间比较使用 Mann-Whitney U 检验。

多组间比较方面，若数据服从正态分布，则采用单因素方差分析 (One-way

ANOVA)，并进行 Bonferroni 事后校正；若数据不服从正态分布，则使用 Kruskal-Wallis 检验。对于涉及两个自变量（如时间与处理方式）的实验设计，采用双因素方差分析（Two-way ANOVA）进行统计，并根据需要进行多重比较校正。所有检验均为双侧检验， $P$  值 $< 0.05$  被认为具有统计学显著性。

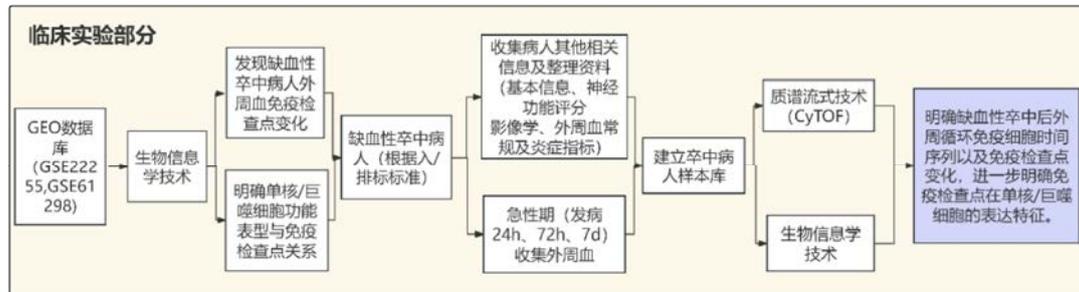


图 2.4 第一部分技术路线图

Fig. 2.4 Experimental design and workflow in Part 1

## 2 结果

### 2.1 免疫检查点在缺血性卒中患者单核细胞中的表达特征及功能相关性分析

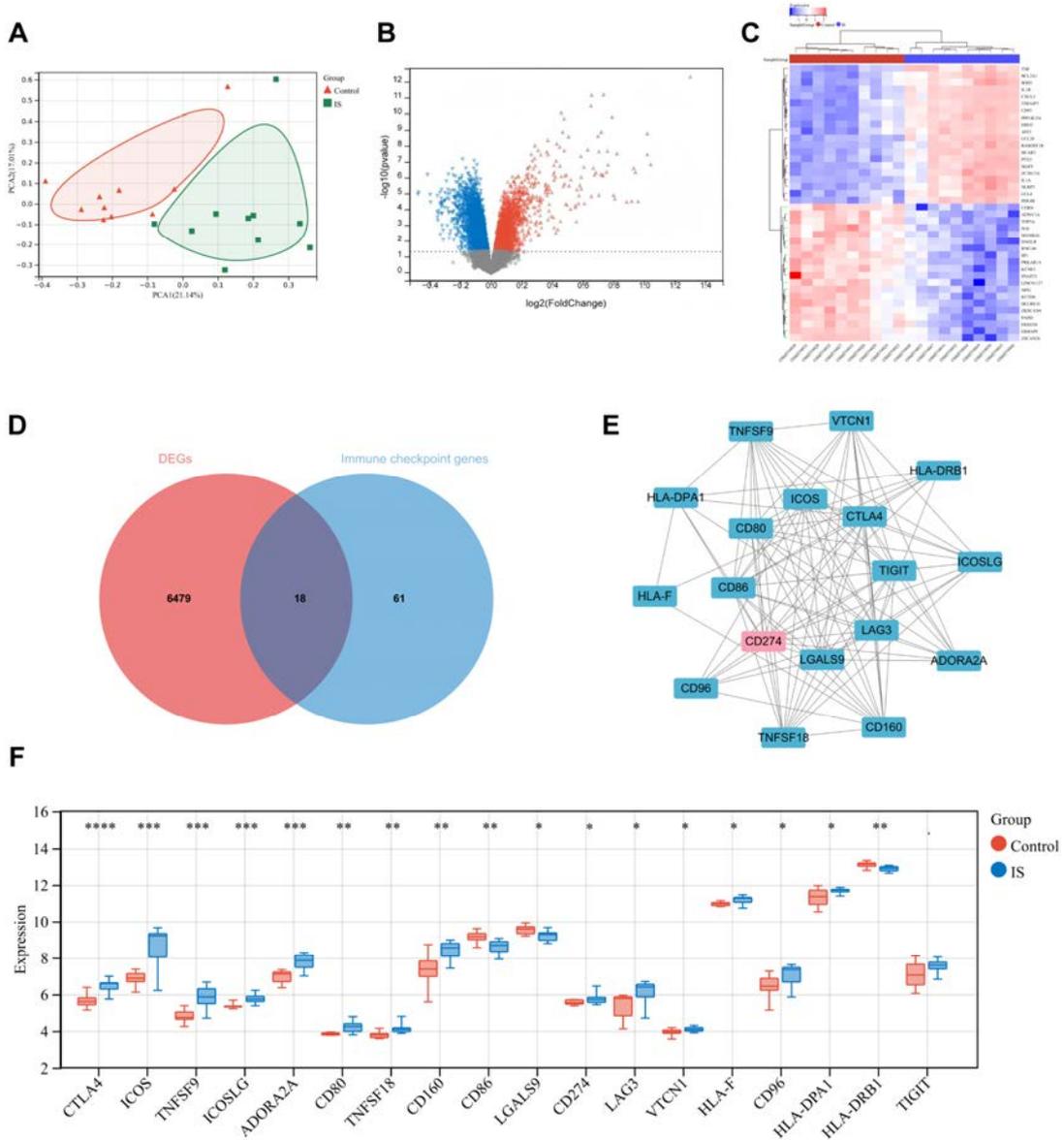
#### 2.1.1 缺血性卒中患者外周血单核细胞中免疫检查点基因的表达特征

本研究基于公开基因数据库，结合生物信息学分析，探讨缺血性卒中（IS）患者外周血单核细胞中免疫检查点相关基因的表达特征。分析结果显示，与对照相比，IS 组中多个免疫检查点基因的表达水平存在显著性差异（图 2.5）。

主成分分析（PCA）揭示 IS 组与对照组在基因表达模式上存在显著分离，表明两组样本在转录组层面具有明显差异（图 2.5A）。火山图分析进一步展示了缺血性卒中患者与对照组之间的差异表达基因（DEGs），其中部分免疫检查点基因显著上调或下调（ $|FC| > 1.2$ ,  $P < 0.05$ ），提示这些基因可能在缺血性卒中后的免疫调控过程中发挥作用（图 2.5B）。热图分析进一步呈现了基因表达变化最显著的 40 个 DEGs（图 2.5C）。

韦恩图分析显示，在 DEGs 与已知免疫检查点基因集中，共筛选出 18 个关键免疫检查点相关的基因（图 2.5D）。蛋白互作（PPI）网络分析表明，这些基因之间存在复杂的相互作用，其中 PD-L1（CD274）被鉴定为关键基因，提示其可能在缺血性卒中相关免疫调控中占据中心地位（图 2.5E）。此外，箱线图分

析显示, IS 组 CTLA-4、ICOS、CD80、CD86、PD-L1 (CD274)、LAG3 和 TIGIT 等多个免疫检查点基因的表达水平相较于对照组发生显著变化 ( $P < 0.05$ ) (图 2.5F)。这些结果表明, 缺血性卒中患者外周血单核细胞中多个免疫检查点基因的异常表达可能在缺血性卒中后免疫调控过程中发挥关键作用, 其中 PD-L1 (CD274) 可能是重要的调节因子。



注: (A) 主成分分析 (PCA) 显示正常对照组与缺血性卒中 (IS) 患者在整体转录水平上的分布差异; (B) 火山图展示 IS 组相较对照组的差异表达基因 (DEGs), 红色为上调基因, 蓝色为下调基因 ( $|\text{fold change}| > 1.2, P < 0.05$ ); (C) 热图呈现表达最显著的 DEGs 在两组间的分布; (D) 韦恩图显示 DEGs 与免疫检查点基因集的交集, 筛选出 18 个相关核心基因 (Hub 基因); (E) PPI 网络分析揭示 Hub 基因间潜在功能连接, 节点颜色表示中心性差异;

(F) 箱线图比较 18 个 Hub 基因在两组间的表达水平。(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )。

### 图 2.5 缺血性卒中患者外周血免疫检查点相关差异基因分析

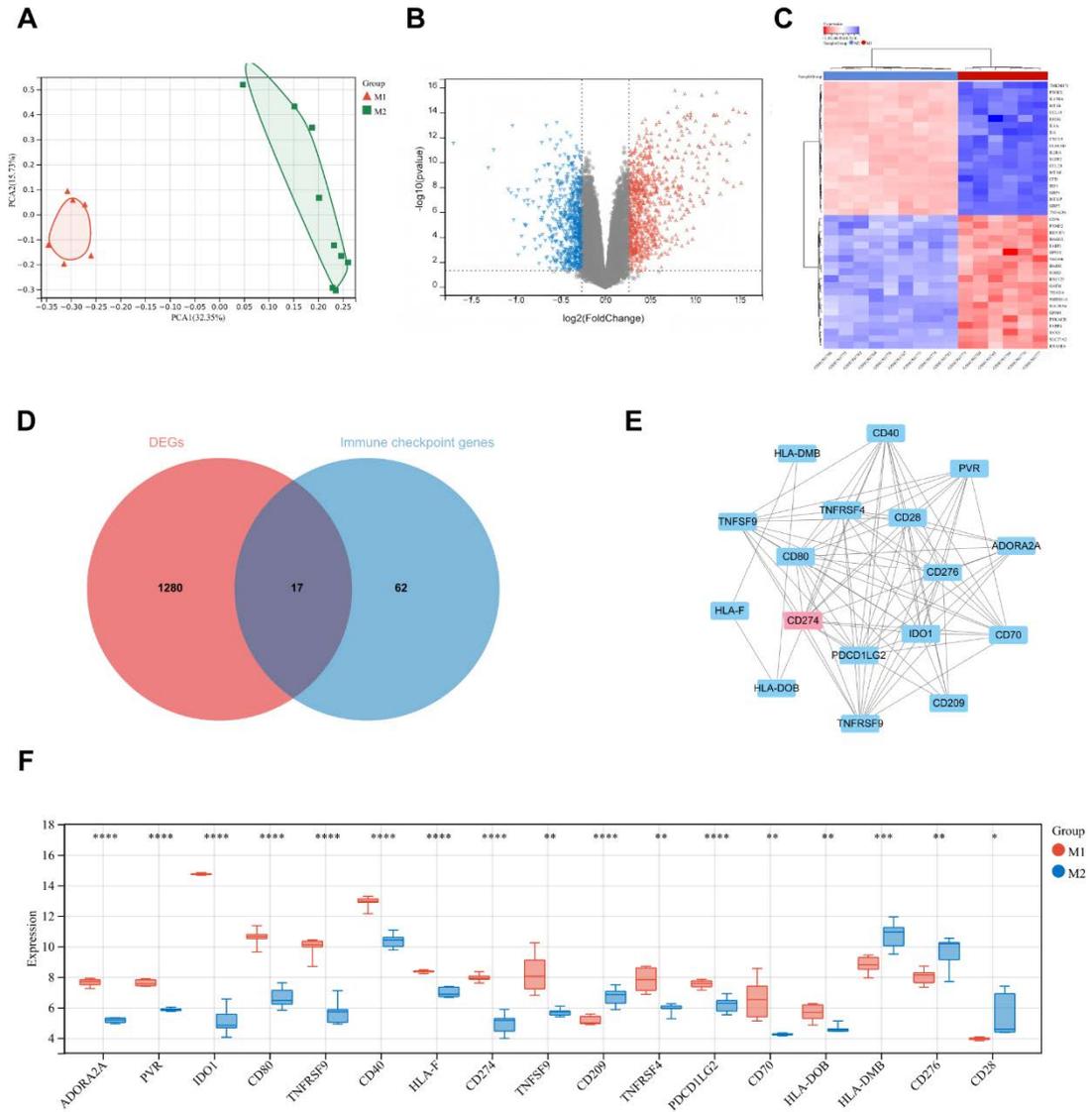
**Fig. 2.5 Analysis of differential expression and immune checkpoint-related genes in peripheral blood of ischemic stroke (IS) patients**

#### 2.1.2 MoDM 细胞功能表型与免疫检查点基因的表达差异

基于上述分析, 我们进一步探讨了 IS 患者单核来源巨噬细胞 (MoDM) 的不同功能表型在免疫检查点基因表达方面的差异, 以阐明 MoDM 表型转换与免疫检查点调控之间的潜在联系 (图 2.6)。

主成分分析 (PCA) 显示, M1 型和 M2 型 MoDM 在转录组水平上形成明显分离, 表明两者在基因表达模式上具有显著差异 (图 2.6A)。火山图分析展示了 M1 与 M2 细胞间的 DEGs ( $|FC| > 1.2$ ,  $P < 0.05$ ) (图 2.6B)。热图展示了 M1 与 M2 细胞表达最显著的 40 个 DEGs (图 2.6C)。

韦恩图分析从 DEGs 与免疫检查点基因集中筛选出 17 个关键免疫检查点相关基因 (图 2.6D)。PPI 网络分析进一步揭示了这些基因间的相互作用, 其中 CD274 (PD-L1) 作为关键枢纽基因, 可能在 M1/M2 细胞的免疫调控过程中发挥重要作用 (图 2.6E)。此外, 箱线图分析表明, 与 M2 组相比, M1 组中多个免疫检查点基因 (如 PVR、CD80、CD86、CD274 (PD-L1)、TNFRSF9 和 IDO1) 的表达水平显著上调, 而 CD276 (B7-H3) 在 M2 组中高度表达 ( $P < 0.05$ ) (图 2.6F)。这些结果表明, M1 和 M2 型 MoDM 在免疫检查点分子表达方面存在显著差异, 提示其在缺血性卒中的免疫调节过程中可能发挥不同的功能作用, 尤其是 PD-L1 可能在 M1 型 MoDM 相关的促炎反应中具有重要调控作用。



注：(A) 主成分分析（PCA）显示 M1 型与 M2 型 MoDM 样本在整体转录水平上的分布差异；(B) 火山图展示两表型间的差异表达基因（DEGs），红色为上调基因，蓝色为下调基因（ $|FC| > 1.2$ ,  $P < 0.05$ ）；(C) 热图呈现表达最显著的 DEGs 在两组间的分布模式；(D) 韦恩图通过 DEGs 与免疫检查点基因集的交集筛选出 17 个相关核心基因（Hub 基因）；(E) PPI 网络揭示 Hub 基因间的潜在功能连接；(F) 箱线图比较 Hub 基因在 M1 与 M2 组中的表达水平。（ $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ）

图 2.6 缺血性卒中患者外周单核细胞诱导 MoDM 不同表型的免疫检查点基因差异分析  
**Fig. 2.6 Differential expression of immune checkpoint genes in phenotype-specific MoDMs induced from PBMCs of ischemic stroke patients**

## 2.2 基于 CyTOF 的缺血性卒中患者循环免疫细胞时间序列分析及免疫检查点动态变化研究

### 2.2.1 研究队列：缺血性卒中患者的人口学与临床特征

为了探讨缺血性卒中后的免疫变化，我们收集了 10 例轻度缺血性卒中患者的外周血样本，所有患者均符合纳入和排除标准。样本分别在缺血性卒中发生后第 1 天、第 3 天和第 7 天采集，并通过质谱流式（Mass Cytometry, CyTOF）进行分析。同时，招募 5 名年龄和性别匹配的个体作为对照组。

在缺血性卒中队列中，70%患者为男性，中位年龄 58 岁（IQR: 54.5-74.5）。患者常见的合并症包括高血压（50%）、高脂血症（30%）和冠心病（20%）。值得注意的是，该队列中无患者接受溶栓治疗。该研究队列为进一步解析急性期缺血性卒中后的免疫变化提供了基础（见表 2.5）。

表 2.5 受试人群人口学特征总结

Tab. 2.5 Summary demographics of sampled population

	Control (5)	Ischemic Stroke (10)
Age	58 (57-62)	58 (54.5-74.5)
Sex		
Male	3 (60%)	7 (70%)
Female	2 (40%)	3 (30%)
<b>Co-morbidities</b>		
Smoking		
Smoker	0/5 (0%)	8/10 (80%)
Ex-smoker	4/5 (80%)	2/10 (20%)
Non-smoker	1/5 (20%)	0/10 (0%)
Diabetes	0/5 (0%)	2/10 (20%)
Coronary artery disease	0/5 (0%)	0/10 (0%)
Hypertension	1/5 (20%)	6/10 (60%)
Hyperlipidaemia	0/5 (0%)	0/10 (0%)
Previous stroke/ Transient ischemic attack	0/5 (0%)	0/10 (0%)
Family history of stroke	0/5 (0%)	0/10 (0%)

表 2.5 (续表) 受试人群人口学特征总结

Tab. 2.5 (Continued) Summary demographics of sampled population

	Control (5)	Ischemic Stroke (10)
<b>Admission parameters</b>		
First systolic blood pressure(mmHg)	127 (113-137)	157(149.5-164.8)
First diastolic blood pressure(mmHg)	79 (68-80.5)	94(82.5-100.25)
Blood glucose on admission	6.61 (5.49-8.25)	5.29(4.40-6.18)
National Institutes of Health Stroke Scale	0	4.5(3-5)
Thrombolysis	0/5 (0%)	0/10 (0%)
MRI lesion location		
Cortical	-	5/10 (50%)
Subcortical	-	5/10 (50%)
<b>Clinical laboratory examination</b>		
C-reactive protein	-	1.76(1.33-5.95)
White blood cells	7.49 (5.5-9.15)	7.15(6.72-10.15)
Lymphocytes	2.24 (1.24-1.66)	1.96(1.72-2.12)
Neutrophils	4.82 (3.31-5.71)	4.45(4.17-6.83)
Monocytes	0.28 (0.25-0.50)	0.60(0.48-0.62)
High density lipoprotein cholesterol	-	0.1(0.86-1.19)
Homocysteine	-	15.75(12.68-23.43)
Monocyte-high density lipoprotein cholesterol ratio	-	0.60(0.48-0.69)

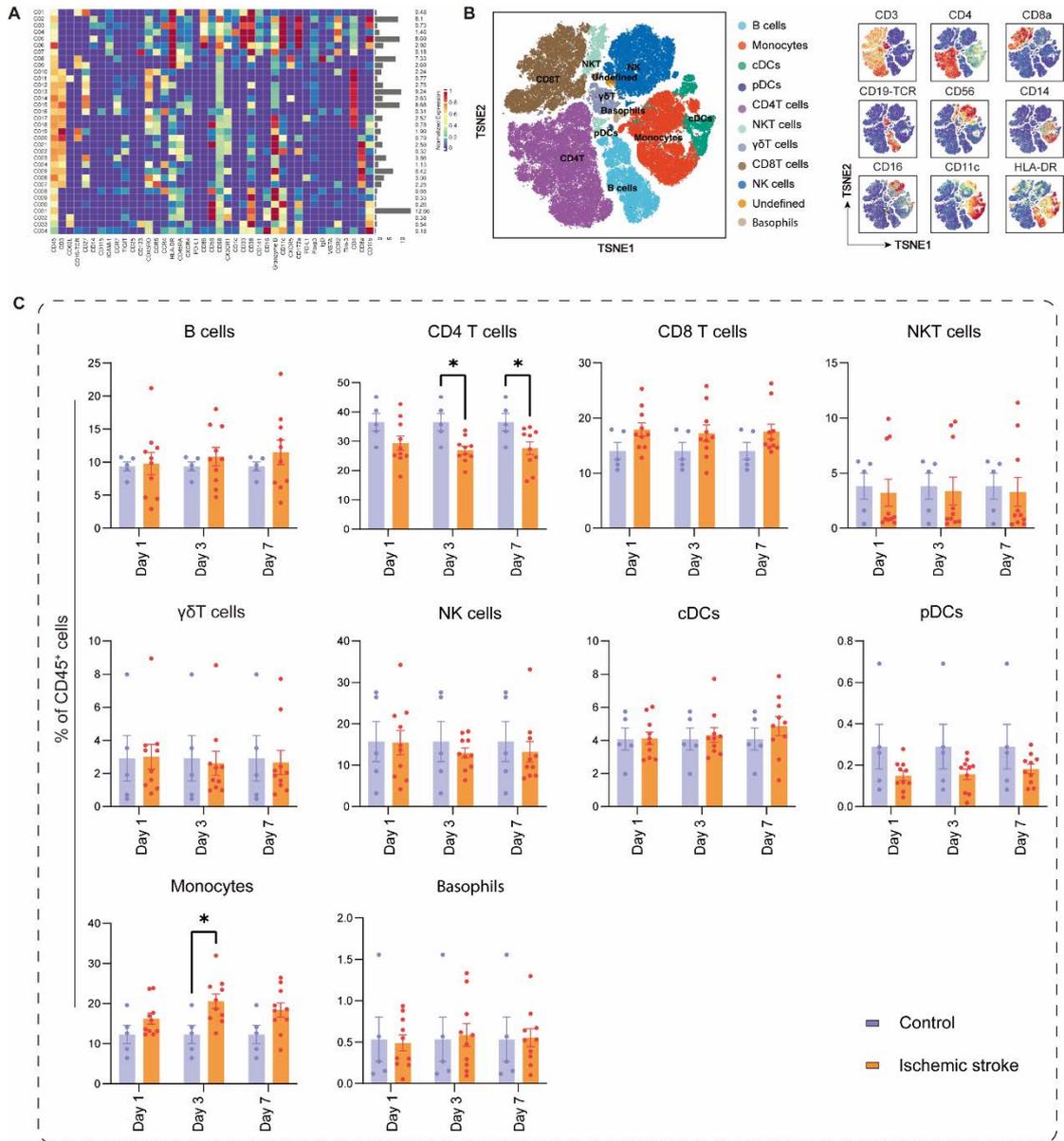
### 2.2.2 缺血性卒中急性期的质谱流式细胞分析

为了进一步探讨急性缺血性卒中患者的外周免疫特征，本研究基于 CyTOF 技术对缺血性卒中组和对照组患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 进行了质谱流式细胞分析。通过严格的门控策略，我们将 CD45<sup>+</sup> PBMCs 聚类为 34 个细胞簇 (图 2.7A)，并进一步整合为 11 个主要免疫细胞亚群，包括 B 细胞 (B cells)、CD4<sup>+</sup> T 细胞 (CD4<sup>+</sup> T cells)、CD8<sup>+</sup> T 细胞 (CD8<sup>+</sup> T cells)、自然杀伤性 T 细胞 (NKT cells)、 $\gamma\delta$  T 细胞 (gamma/delta T cells)、自然杀伤细胞 (NK cells)、

传统树突状细胞（conventional dendritic cells, cDCs）、浆细胞样树突状细胞（plasmacytoid dendritic cells, pDCs）、单核细胞（monocytes）、嗜碱性粒细胞（basophils）以及部分未定义细胞群（undefined）（图 2.7B）。

对比分析发现，IS 组在发病后各时间点外周免疫细胞构成发生一定变化（图 2.7C），其中，单核细胞在缺血性卒中组自第 1 天起整体升高，并在第 3 天达到相对峰值后略有下降，但始终高于对照组（ $P < 0.05$ ），提示其在缺血性卒中后的早期炎症反应中具有持续性参与； $CD4^+$  T 细胞比例在缺血性卒中组呈逐步下降趋势，尤其在第 3 天和第 7 天明显低于对照组（ $P < 0.05$ ），可能反映免疫耗竭或活化后迁移； $\gamma\delta$  T 细胞与 NKT 细胞在缺血性卒中后整体呈下降趋势，可能与其功能抑制或募集至组织相关；B 细胞、 $CD8^+$  T 细胞、NK 细胞及树突状细胞在缺血性卒中组中变化幅度较小，但部分亚群在早期表现出轻微下降或波动趋势；而嗜碱性粒细胞和未定义群体占比在各时间点变化不显著。

总体来看，轻度缺血性卒中虽未引起外周免疫图谱的剧烈改变，但  $CD4^+$  T 细胞、单核细胞及部分先天免疫细胞亚群仍呈现随时间演进的趋势性变化，提示其可能在缺血性卒中后免疫应答与远期结局中发挥重要作用。



注：(A) 热图展示 42 种标志物在 PBMC 中各细胞簇的表达谱；(B) 基于 9 个关键表面标志物 (CD3、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD14、CD16、CD19-TCR、CD56、CD123、HLA-DR) 进行聚类与注释，共识别出 11 个主要免疫细胞亚群：B 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NKT 细胞、 $\gamma\delta$  T 细胞、NK 细胞、常规树突状细胞 (cDCs)、浆细胞样树突状细胞 (pDCs)、单核细胞、嗜碱性粒细胞及未定义细胞群；右图展示各标志物在 t-SNE 图中的表达分布；(C) 比较健康对照组与缺血性卒中组 (发病后第 1、3、7 天) CD45<sup>+</sup> PBMC 中各免疫细胞亚群的相对比例。(均数 $\pm$ 标准差, \* $P < 0.05$ )。

图 2.7 CyTOF 分析揭示缺血性卒中患者外周免疫细胞组成及动态变化

Fig. 2.7 CyTOF analysis reveals peripheral immune cell composition and dynamic changes in ischemic stroke patients

### 2.2.3 急性缺血性卒中髓系细胞亚群组成及免疫检查点表达的动态变化

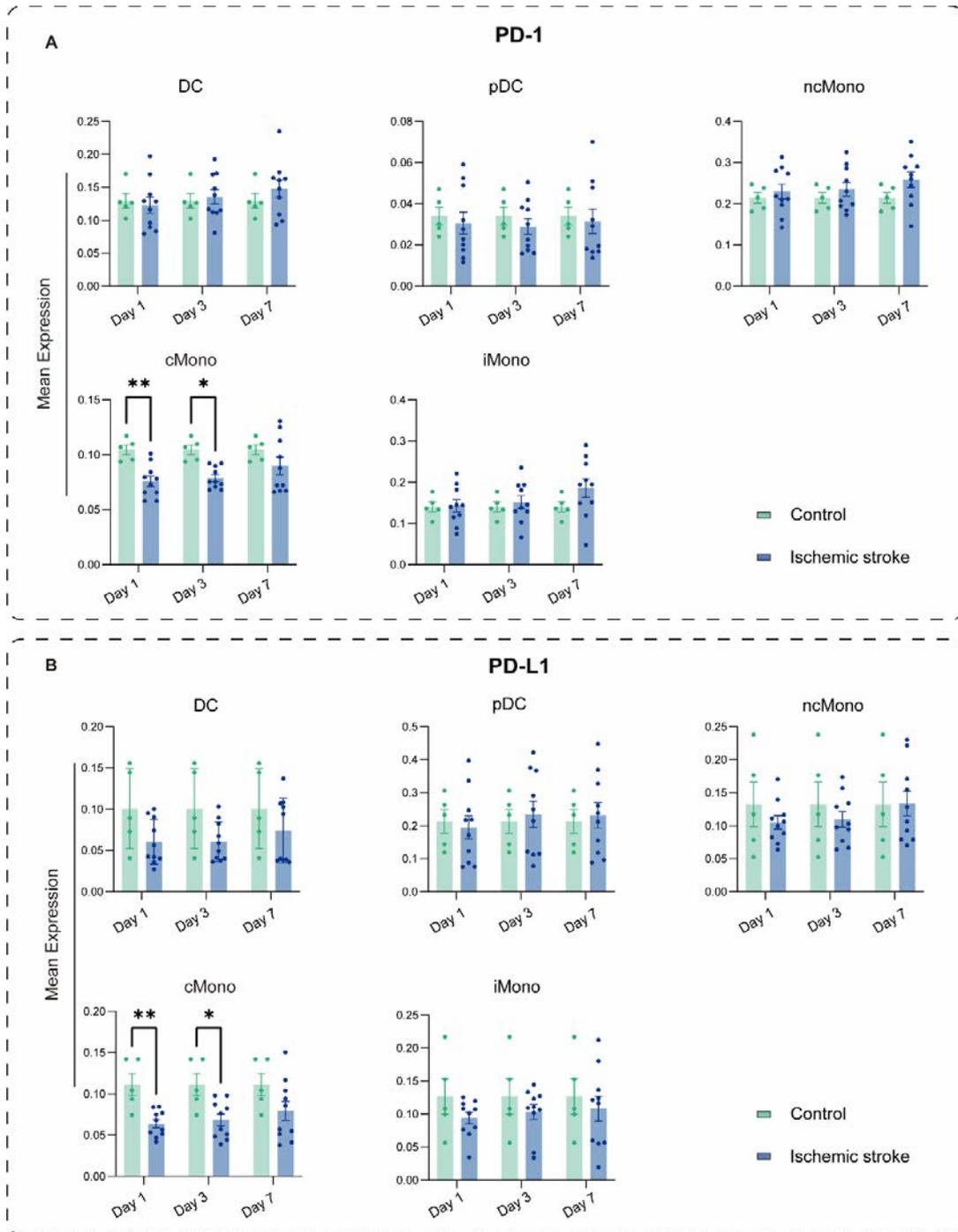
为进一步解析轻型缺血性卒中患者在急性期外周髓系免疫系统的调控特征，基于 CyTOF 数据对 CD45<sup>+</sup> PBMC 中的髓系细胞进行了深入分析。通过关键表面标志物（CD14、CD16、CD123、HLA-DR）聚类，我们共鉴定出五类主要髓系细胞亚群，包括树突状细胞（DC）、浆细胞样树突状细胞（pDC）、非经典单核细胞（ncMono）、经典单核细胞（cMono）和中间型单核细胞（iMono）（图 2.8A,B）。

细胞比例分析结果（图 2.8C）显示，cMono 在缺血性卒中组显著升高，且在 Day1、Day3 和 Day7 均高于对照组（ $P < 0.05$ ）。与之相对，iMono 在缺血性卒中组呈持续下降趋势，特别是在 Day3 较对照组显著降低（ $P < 0.05$ ）。DC 在缺血性卒中组略有下降，pDC 和 ncMono 在各时间点未表现出显著变化。

进一步比较各亚群中 PD-1 及 PD-L1 的表达水平（图 2.9A,B），结果发现 cMono 亚群在缺血性卒中组中 PD-1 表达明显下调（ $P < 0.05$ ），PD-L1 表达亦呈类似趋势（ $P < 0.05$ ）。此外，iMono、DC、pDC 等亚群在 PD-1 和 PD-L1 表达方面未见显著差异，但均呈下降趋势，提示髓系细胞整体免疫抑制特征可能在缺血性卒中后减弱。

综上，缺血性缺血性卒中急性期外周髓系细胞构成发生明显重塑，尤其是 cMono 比例升高与 iMono 下降的动态变化，伴随着关键免疫检查点分子 PD-1/PD-L1 在 cMono 中的下调，提示缺血性卒中可能通过干扰免疫检查点通路，削弱髓系细胞的免疫抑制能力，进而加剧炎症反应。这为后续缺血性卒中后免疫检查点靶向干预提供了重要理论依据。





注：(A)不同时间点（第 1、3、7 天）对照组与缺血性卒中组中各髓系细胞亚群的 PD-1 平均表达水平比较，包括树突状细胞（DC）、浆细胞样树突状细胞（pDC）、非经典单核细胞（ncMono）、经典单核细胞（cMono）及中间型单核细胞（iMono）。(B)各髓系细胞亚群的 PD-L1 平均表达水平在两组之间的比较。（均数±标准差，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ）。

图 2.9 缺血性卒中患者外周髓系细胞亚群中 PD-1 和 PD-L1 表达的动态变化

Fig. 2.9 Dynamic changes in PD-1 and PD-L1 expression in peripheral myeloid cell subsets of ischemic stroke patients

### 3 讨论

近年来,缺血性卒中后免疫调控机制逐渐成为研究热点,尤其是免疫检查点在缺血性卒中后免疫适应中的作用备受关注<sup>[26]</sup>。研究表明,缺血性卒中不仅导致中枢损伤,也引发显著的外周免疫重塑,单核细胞、T细胞及其调控通路在缺血性卒中急性期的炎症反应和后续免疫适应中可能发挥关键作用<sup>[64]</sup>。既往转录组研究揭示缺血性卒中患者外周免疫细胞存在广泛的基因表达改变,涉及多条免疫相关通路<sup>[65]</sup>。但缺乏对特定免疫细胞亚群中免疫检查点表达模式及功能意义的系统解析。

本研究首先基于公共数据库,鉴定出缺血性卒中患者外周单核细胞中多个关键免疫检查点(如PD-L1、CTLA-4、ICOS、CD80、CD86、LAG3、TIGIT)显著上调,提示缺血性卒中后的免疫调控受多种免疫抑制通路协同调节。然而,这些分子在不同免疫亚群中的动态表达及其调控机制尚不明确。为进一步深入解析缺血性卒中后免疫细胞组成及免疫检查点的动态适应过程,本研究采用质谱流式细胞术(CyTOF)系统评估缺血性卒中患者外周免疫图谱,重点关注免疫亚群比例变化与检查点表达特征。

轻型缺血性卒中(mIS)作为最常见卒中类型之一,虽神经损伤较轻,仍可激发系统性免疫反应并影响远期恢复<sup>[66]</sup>。目前研究多集中于中重度缺血性卒中(NIHSS>5)<sup>[67]</sup>,而针对mIS的免疫学机制关注不足。与中重度缺血性卒中相比,mIS患者免疫状态更稳定、治疗干扰较少,适合作为解析缺血性卒中自身免疫效应的理想模型<sup>[68]</sup>。因此,本研究纳入未接受溶栓/取栓治疗的mIS患者,剖析缺血性卒中严重程度对外周免疫细胞构成及免疫检查点调控的影响。

本研究不仅揭示了不同缺血性卒中程度下外周免疫系统的动态适应变化,也为后续动物模型验证免疫检查点功能机制提供理论基础,并拓展了缺血性卒中后免疫干预靶点的研究视角。

#### 3.1 免疫细胞构成的变化及其临床意义

在髓系细胞进一步分型中,本研究发现经典单核细胞(cMono)在缺血性卒中患者中显著上调,提示其可能参与早期炎症放大的核心过程。此前研究亦证实,cMono是缺血性卒中急性期最早动员的髓系亚群之一,其募集可介导IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等促炎因子的释放,从而驱动神经炎症反应并加重组织损伤<sup>[69,70]</sup>。

与之相对,中间型单核细胞(iMono)在缺血性卒中患者中持续下降,这一趋势可能反映iMono在缺血性卒中背景下的免疫调节能力受损,亦可能因迁移至组织炎症区域而导致外周耗竭。iMono被认为具有桥接固有免疫与适应性免疫的功能,其在缺血性卒中后持续下降,可能是炎症失衡和免疫耐受障碍的标志<sup>[71]</sup>。

非经典单核细胞(ncMono)虽未呈现显著变化,但其作为组织修复型细胞,其功能可能更多体现于缺血性卒中恢复后期。有研究指出,ncMono可通过TGF- $\beta$ 、IL-10等信号参与炎症分辨与组织重建,其稳定表达可能为缺血性卒中后期修复反应保留调控潜力<sup>[23, 72]</sup>。

此外,树突状细胞(DC)在缺血性卒中急性期显著减少,尤其在早期时间点下调明显。作为抗原递呈与T细胞活化的关键介质,DC数量减少可能削弱缺血性卒中后适应性免疫的启动能力,进而延迟免疫耐受建立,加重免疫失衡<sup>[73]</sup>。本研究结果与已有文献一致,提示髓系系统特别是单核细胞亚群在缺血性卒中后具有高度的动态性,其比例变化可反映炎症-免疫调控平衡的状态,是识别缺血性卒中后免疫病理关键节点的重要窗口。

相较髓系细胞,淋巴细胞在缺血性卒中急性期同样表现出特征性变化。本研究观察到CD4<sup>+</sup>T细胞、B细胞及自然杀伤细胞(NK cells)在缺血性卒中组中普遍下降,提示缺血性卒中可引发广泛的免疫抑制反应。其中,CD4<sup>+</sup>T细胞在第7天于缺血性卒中组较对照组显著减少,与既往报道一致<sup>[74]</sup>,缺血性卒中可通过交感神经激活与皮质醇释放诱导T细胞凋亡,从而降低免疫效应细胞储备<sup>[75]</sup>。B细胞比例的下降,可能削弱体液免疫能力,增加继发感染风险<sup>[76, 77]</sup>;而NK细胞的下降则可能反映其趋化能力或细胞毒活性受限,亦与缺血性卒中后肺部感染等并发症发生率上升相关<sup>[72]</sup>。

尽管其他亚群如CD8<sup>+</sup>T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞等未表现出统计学显著性差异,但其动态变化趋势仍提示缺血性卒中可能影响特定效应细胞的活化、迁移与功能状态。

综上所述,本研究通过质谱流式细胞术(CyTOF),系统揭示缺血性卒中患者外周免疫图谱的组成重构。髓系系统中cMono显著升高、iMono持续下降,DC数量减少,反映出炎症放大与调节失衡的特征;而淋巴系统中关键效应群体如CD4<sup>+</sup>T、B和NK细胞下降,则提示免疫抑制状态的激活。二者共同构成缺

血性卒中后“促炎与抑制并存”的复杂免疫图谱，为后续检查点通路的介入干预提供了关键背景依据。

### 3.2 髓系免疫检查点 PD-1/PD-L1 表达变化及其免疫调控意义

程序性死亡受体 1 (PD-1) 及其配体 PD-L1 是典型的负性免疫检查点分子，广泛参与抑制免疫细胞活化、维持免疫稳态和免疫耐受<sup>[78, 79]</sup>。近年来，该通路在缺血性卒中中的调节作用日益受到关注。已有研究显示，在大脑中动脉阻塞 (MCAO) 模型中，PD-1 在小胶质细胞和浸润性巨噬细胞中上调，PD-L1 也在外周 B 细胞中表达增强，PD-1 缺失可导致梗死体积增加和神经功能恶化，提示 PD-1/PD-L1 轴可能具有保护作用<sup>[30]</sup>。然而，亦有报道认为，PD-L1 缺失可减轻炎症浸润、提高 Treg 水平，甚至减轻缺血性卒中后组织损伤，说明其作用效果可能取决于缺血性卒中后的免疫背景和调控状态<sup>[31, 32]</sup>。

本研究首先基于公开数据库的转录组数据，系统分析缺血性卒中患者外周血单核细胞的免疫检查点表达谱，发现多种免疫检查点分子（如 PD-L1、CTLA-4、CD80、CD86、TIGIT 等）在缺血性卒中患者中存在显著表达变化，尤其是 PD-L1 (CD274) 在蛋白互作网络中位于核心位置，提示其在缺血性卒中免疫调控中可能发挥重要作用。进一步结合 MoDM 不同功能表型 (M1 与 M2) 的转录组比较分析，发现 PD-L1 在 M1 型促炎巨噬细胞中显著上调，而 M2 型中相对较低，提示其不仅是免疫抑制标志物，也可能在炎症环境中被诱导表达，参与调节促炎反应。

为了进一步明确 PD-L1/PD-1 通路在缺血性卒中后髓系细胞中的动态表达特征，我们在临床轻型缺血性卒中 (mIS) 患者中应用 CyTOF 对 CD45<sup>+</sup> PBMCs 进行质谱流式分析。结果显示，经典单核细胞 (cMono) 在缺血性卒中组显著升高，而中间型单核细胞 (iMono) 持续下降，提示缺血性卒中后髓系系统发生明显重塑。值得注意的是，在 cMono、iMono 和树突状细胞 (DC) 中，PD-1 与 PD-L1 表达均呈下降趋势，尤其在 cMono 中下调最为显著，提示 PD-1/PD-L1 负性免疫调控轴在外周髓系系统可能处于“失活”状态。

值得注意的是，该现象与部分动物研究中观察到的中枢局部 PD-1/PD-L1 上调现象并不一致<sup>[31, 32]</sup>。我们认为这可能主要源于中枢与外周免疫系统调控角色与环境的差异：中枢单核来源巨噬细胞可能通过 PD-L1 通路建立局部免疫耐受，

而外周系统则可能仍处于炎症动员状态，尚未形成有效的反馈抑制。同时，本研究基于 CyTOF 对蛋白水平进行质谱分析，具有亚群解析精度高、动态监测能力强的优势，与传统的基因或组织层面检测具有互补性，亦可能解释不同实验之间的观察差异。此外，本研究的样本量尚有一定限制，但通过严格的患者筛选、时序设计与技术控制，仍确保了数据的可靠性与临床相关性。

综上所述，本研究在轻型缺血性卒中患者中发现，外周单核细胞中 PD-1/PD-L1 通路表达普遍下调，提示缺血性卒中后外周免疫系统可能存在负性调控不足，进而影响炎症控制与免疫稳态的维持。值得注意的是，外周单核细胞是缺血性卒中后浸润脑组织、分化为单核来源巨噬细胞（MoDM）的主要来源，其激活状态和免疫特征将直接影响中枢炎症微环境的演变。因此，外周免疫调控机制的变化不仅反映系统性免疫应答失衡，也可能通过 MoDM 介导，参与缺血性卒中后神经炎症的持续放大。

基于此，本课题在后续实验中进一步聚焦中枢 MoDM，系统评估 PD-L1 通路在脑组织局部炎症调控中的作用，探讨其干预潜力与年龄依赖性效应。外周与中枢的免疫连接视角，不仅拓展了缺血性卒中免疫病理机制的理解，也为 PD-L1 相关免疫治疗提供了更具靶向性的干预思路。

## 4 结论

**4.1** 缺血性卒中可诱导外周髓系系统重塑，表现为经典单核细胞（cMono）比例上升，中间型单核细胞（iMono）比例下降，提示炎症激活与免疫调节失衡。

**4.2** 外周单核细胞中 PD-1/PD-L1 表达在缺血性卒中后整体下调，反映免疫抑制机制激活不足，可能加剧系统性炎症反应。

**4.3** 单核细胞上 PD-1/PD-L1 的动态变化揭示其在缺血性卒中后免疫调控中的关键作用，为后续干预靶点的探索提供依据。

### 第三部分 PD-L1 调控单核来源巨噬细胞功能介导缺血性卒中后神经保护的作用研究

#### 前言

缺血性卒中 (ischemic stroke, IS) 是导致残疾和死亡的主要神经系统疾病, 其病理过程不仅涉及局部脑组织损伤, 也伴随着显著的外周免疫应答<sup>[73]</sup>。在缺血性卒中后的免疫重建过程中, 免疫细胞活性及其调控机制对炎症扩散、组织修复及功能恢复均具有深远影响。其中, 髓系免疫细胞, 尤其是单核来源巨噬细胞 (MoDM), 是缺血性卒中后脑组织主要浸润免疫细胞群, 参与从炎症放大到抗炎修复的全过程<sup>[23]</sup>。

缺血性卒中诱导的 MoDM 可分化为不同功能表型: 促炎型 (M1) MoDM 释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子, 参与急性炎症反应; 而抗炎型 (M2) MoDM 则促进组织修复、限制神经损伤<sup>[80]</sup>。因此, 调控 MoDM 的活化方向被视为实现缺血性卒中后免疫干预的潜在靶点。然而, MoDM 在缺血性卒中后如何被调控, 特别是在免疫检查点分子的参与下, 其功能走向如何被塑造, 尚未完全阐明。

在第一部分研究中, 我们通过 CyTOF 质谱分析系统评估了缺血性卒中患者外周免疫图谱的动态变化, 发现缺血性卒中可诱导外周髓系系统重塑, 表现为经典单核细胞 (cMono) 比例上升, 中间型单核细胞 (iMono) 比例下降, 外周单核细胞中 PD-1/PD-L1 表达在缺血性卒中后整体下调。此外, 公共转录组数据分析亦支持 MoDM 相关基因簇中 PD-L1 表达的变化模式。这为深入探讨 PD-L1 在 MoDM 中的作用提供了理论依据。

程序性死亡配体 1 (PD-L1) 是目前研究最为深入的负性免疫检查点分子之一, 其通过与程序性死亡受体 1 (PD-1) 结合, 抑制 T 细胞活化、促进免疫耐受, 在肿瘤、自身免疫和慢性感染等疾病中发挥重要调节作用<sup>[81, 82]</sup>。近年来, PD-1/PD-L1 通路在缺血性卒中中的研究逐渐展开, 不仅涉及 T 细胞功能调节, 还可能参与髓系细胞的功能活化与免疫重构<sup>[82]</sup>。因此, PD-L1 已成为缺血性卒中后免疫干预研究的重要候选靶点之一。

值得注意的是, PD-L1 介导的免疫调节是否对缺血性卒中恢复具有积极作用, 仍存在诸多争议。一方面, 其负性信号可能有助于限制免疫过激反应, 减轻继发

性脑损伤；另一方面，PD-L1 信号过强亦可能导致免疫抑制加重，延缓组织修复与功能恢复。此外，个体对 PD-L1 信号通路的响应可能受缺血性卒中模型、性别、基础免疫状态及年龄因素等影响，而这些变量在现有研究中尚未被充分评估。

因此，本研究拟系统解析 PD-L1 在缺血性卒中中 MoDM 介导免疫调控的作用机制，并进一步评估其阻断干预策略的可行性及其年龄差异性。研究分为两部分：在细胞实验中，采用小鼠骨髓来源巨噬细胞（bone marrow-derived macrophages, BMDMs）构建不同功能表型，结合 PD-L1 的过表达与敲减操作，探讨其对 MoDM 活化状态的调控作用；在动物实验中，基于青年与老龄小鼠建立多种缺血性卒中模型，动态评估脑组织及 MoDM 中 PD-L1 的表达变化，并通过 PD-L1 中和抗体（PD-L1 mAb）进行干预，系统分析其对神经损伤、炎症反应与功能恢复的影响。研究将结合转录组测序及免疫学验证，深入阐明 PD-L1 调控缺血性卒中免疫反应的分子基础，为缺血性卒中免疫治疗策略的优化提供理论支撑与实验依据。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验动物

实验采用 8-10 周龄 (Young) 和 18-20 月龄 (Aged) 的雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自北京维通利华。所有小鼠均饲养于标准塑料笼中 (每笼 3-4 只), 并在实验动物实验室规定的标准下饲养, 所有实验动物饲养于恒温 ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ )、相对湿度 ( $50\pm 5\%$ ) 和 12 小时光暗循环的环境中, 自由摄食和饮水。所有实验均遵循中国国家实验动物护理和使用指南, 并符合 ARRIVE (动物实验报告指南) 规范, 经贵州医科大学动物伦理委员会批准 (批准号: AEEI-2023-229)。实验过程中尽可能减少动物使用数量, 并最大限度降低动物的不适与痛苦。

### 1.1.2 细胞培养

在本研究中, 采用小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 构建体外模型, 以模拟单核来源巨噬细胞 (MoDMs) 在缺血性缺血性卒中后炎症微环境中的功能状态变化。体外实验使用 6-8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM), 通过无菌分离小鼠股骨和胫骨骨髓细胞, 并在含 10%FBS、1%青霉素-链霉素和 2ng/mL M-CSF 的 RPMI 1640 培养基中诱导 7 天获得 BMDM 细胞。细胞培养在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中进行, 定期更换培养基以保持细胞活力。

### 1.1.3 主要实验设备

表 3.1 主要仪器设备

Tab. 3.1 List of main instruments and equipment

仪器名称	厂家 (国家)
激光散斑成像系统 (RFLSI-ZW)	RWD (中国)
小动物麻醉机	RWD (中国)
手术显微镜	Leica (德国) / Zeiss (德国)
动物手术台 (带加热功能)	RWD (中国)
动物体温维持系统	RWD (中国)
电子控温恒温垫	RWD (中国)

表 3.2 主要仪器设备

Tab. 3.2 List of main instruments and equipment

仪器名称	厂家（国家）
血流监测仪	Moor Instruments（英国）
吸入式麻醉系统	RWD（中国）
小动物固定器	RWD（中国）
电凝仪（小动物用）	RWD（中国）
显微手术器械套装	Fine Science Tools（德国）
电子天平	Mettler Toledo（瑞士）
水浴锅	Dalong（中国）
离心机	Thermo（美国）
蛋白电泳仪	Bio-Rad（美国）
蛋白转膜系统	Bio-Rad（美国）
行为学测试设备	RWD（中国）

#### 1.1.4 主要试剂与耗材

表 3.3 主要试剂耗材

Tab. 3.3 List of main reagents and consumables

试剂名称	厂家（国家）
M-CSF	PeptoTech（美国）
L929 细胞上清	Pricella(中国)
FBS（胎牛血清）	Gibco（美国）
双抗（青霉素-链霉素）	Gibco（美国）
DMEM 培养基	Gibco（美国）
LPS（脂多糖）	Sigma-Aldrich（美国）
IL-4	PeptoTech（美国）
小鼠 PD-L1 过表达质粒	Sangon Biotech（中国）
小鼠 PD-L1 siRNA	Sangon Biotech（中国）

表 3.4 主要试剂耗材

Tab. 3.4 List of main reagents and consumables

试剂名称	厂家（国家）
质粒阴性对照（oe-NC）	Sangon Biotech（中国）
siRNA 阴性对照（si-NC）	Sangon Biotech（中国）
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific（美国）
Lipofect5000 转染试剂	百代生物
Opti-MEM 培养基	Thermo Fisher Scientific（美国）
PD-L1 单克隆抗体（clone 10F.9G2）	BioXcell（美国）
同型对照抗体（anti-KLH, clone LTF-2）	BioXcell（美国）
Evans Blue	Sigma-Aldrich（美国）
N, N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich（美国）
TTC（2,3,5-三苯基四氮唑氯化物）	Sigma-Aldrich（美国）
Toluidine Blue	Sigma-Aldrich（美国）
Trizol	Invitrogen（美国）
DAPI	Sigma-Aldrich（美国）
Alexa Fluor 488/555	Abcam（英国）
RIPA 缓冲液	Sigma-Aldrich（美国）
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Bio-Rad（美国）
ECL 显色试剂	ZETA-life（美国）
无菌过滤器	Millipore（美国）
ELISA 试剂盒（TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ）	MEIMIAN Bio（中国）
WB 一抗（ZO-1, Claudin-5, Occludin）	Cell Signaling Technology（美国）
WB 一抗（ $\beta$ -Actin）	Proteintech（中国）
免疫荧光一抗（Iba-1）	Proteintech（中国）
荧光一抗（iNOS, CD31, ZO-1, Claudin-5）	Abcam（英国）
免疫荧光一抗（PD-L1）	Invitrogen（美国）
免疫荧光二抗	Abcam（英国）
HRP 标记二抗	Proteintech（中国）

表 3.5 主要试剂耗材

Tab. 3.5 List of main reagents and consumables

试剂名称	厂家（国家）
海藻糖	Sigma-Aldrich（美国）
细胞培养皿	Corning（美国）/NEST（中国）
无菌离心管	Eppendorf（德国）/Corning（美国）
移液枪头	Eppendorf（德国）
血清移液管	Corning（美国）/Falcon（美国）
无菌培养瓶	Corning（美国）
冻存管	Corning（美国）/NEST（中国）
低蛋白吸附管	Eppendorf（德国）/Axygen（美国）
细胞筛网	BD Falcon（美国）
冻存盒	NEST（中国）
超低温冻存冰盒	Thermo Fisher（美国）
RNA 质量检测芯片	Agilent（美国）
PVDF/硝酸纤维素膜	Millipore（美国）
SDS-PAGE 胶	Bio-Rad（美国）
蛋白电泳缓冲液	Bio-Rad（美国）
免疫印迹封闭液（5%脱脂奶粉）	Bio-Rad（美国）
硅胶涂层尼龙线栓（0.21 mm/0.23 mm）	RWD（中国）
异氟烷	RWD（中国）
无菌手术缝合线	Ethicon（美国）
无菌手术刀片	RWD（中国）
无菌手术剪	RWD（中国）
无菌镊子	RWD（中国）
电凝止血镊	RWD（中国）

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞实验部分

#### (1) 骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 培养及鉴定

实验采用使用 6-8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠，分离其骨髓细胞，并在巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 诱导下分化为骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM)。小鼠在安乐死处理后，浸泡于 75%乙醇约 5 分钟以去除表面污染。随后，取股骨和胫腓骨，剔除软组织，并在乙醇 (100%或 75%) 中短暂脱水 (30s)，然后转移至 RPMI 培养基 (或 PBS)。骨髓细胞分离过程中，剪去骨髓端，使用 20ml 注射器 (装配 1ml 细针头) 向骨髓腔内冲入 RPMI+2%FBS+抗生素，冲出的细胞悬液通过 70 $\mu$ m 细胞筛网过滤并收集至无菌 50ml 离心管。细胞以 500g 离心 5min (室温)，去除上清。红细胞裂解采用 1 $\times$ RBC 裂解液 (室温孵育 4-5min)，终止裂解后，细胞再次离心、洗涤，最终用 PBS+2% FBS 重悬并计数。

调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$  个/ml，以 RPMI 1640+10% FBS+抗生素+20 ng/ml M-CSF 培养，并接种至培养皿 (可直接铺板或置于 15cm 培养皿培养)。培养过程中，D0 天换入新鲜培养基，D1 天观察细胞状态，D3 天轻晃后半量换液，D5 天全量换液，至 D6-D7 天细胞状态良好时可进行后续实验。所有操作均在室温下完成，离心后上清去除时使用巴氏吸管，避免直接倾倒，以减少细胞损失。

收集 D7 天培养的 BMDM，使用流式细胞术 (FACS) 进行 CD11b 和 F4/80 免疫荧光染色，以检测巨噬细胞纯度。结果分析采用流式细胞仪，阳性率超过 95%证明培养所得 BMDM 纯度较高。

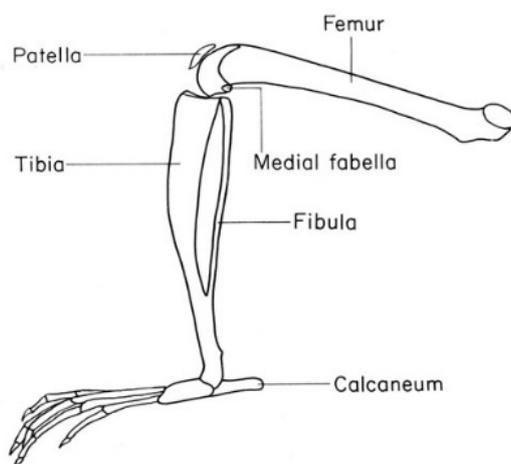


图 3.1 小鼠大腿骨结构示意图

Fig. 3.1 Schematic diagram of the mouse femur structure

(2) 细胞分组

本研究通过基因干预（siRNA、过表达）、不同微环境刺激（LPS、IL-4）研究 PD-L1 在巨噬细胞活化和功能中的作用。实验分组如下：

1)验证 PD-L1 敲低和过表达效率: Vehicle 组(未处理对照), si-NC 组(siRNA 阴性对照), si-PD-L1 组 (siRNA 介导 PD-L1 敲低), oe-NC 组 (过表达载体阴性对照) 和 oe-PD-L1 组 (过表达 PD-L1)。

2) 研究 PD-L1 对 M1 活化的调控: Vehicle 组 (未处理对照), LPS 组 (LPS 100ng/ml 诱导 24h), oe-PD-L1+LPS 组 (PD-L1 过表达+LPS) 和 si-PD-L1+LPS 组 (PD-L1 敲低+LPS)。

3) 研究 PD-L1 对 M2 活化的调控: Vehicle 组 (未处理对照), IL-4 组 (IL-4 20ng/ml 诱导 24h), oe-PD-L1+IL-4 组 (PD-L1 过表达+IL-4) 和 si-PD-L1+IL-4 组 (PD-L1 敲低+IL-4)。

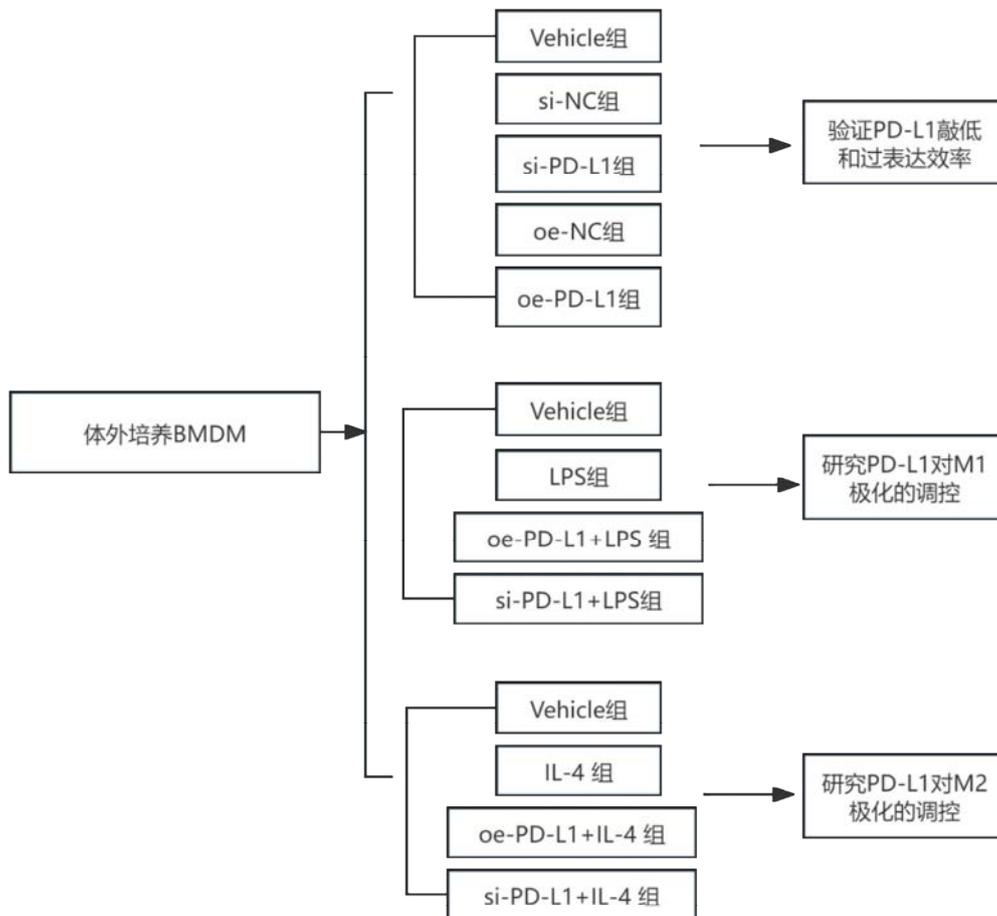


图 3.2 细胞实验分组示意图

Fig. 3.2 Schematic diagram of cell experimental grouping

### (3) BMDM 活化诱导

体外培养骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM)，并通过 LPS 或 IL-4 刺激诱导其向 M1 或 M2 型巨噬细胞分化。在 M1 型活化诱导实验中，BMDM 以 RPMI1640+10% FBS+抗生素培养，并加入 LPS (100ng/ml) 刺激 24h，观察到细胞形态变得扁平，细胞间黏附增强，呈现典型 M1 型表型。在 M2 型活化诱导实验中，BMDM 以相同培养基培养，并加入 IL-4 (20ng/ml) 处理 24h，细胞呈梭形或不规则形，伸出较长伪足，表现出典型 M2 型表型。

BMDM 的吞噬功能通过单分散荧光微球 (PMMA) 实验进行检测。实验分为 Vehicle 组、LPS 诱导的 M1 组、IL-4 诱导的 M2 组，分别培养 24h。随后，加入荧光标记的 PMMA 微球，继续孵育 2-4h。PBS 洗涤 3 次去除未吞噬的微球后，细胞经 4%PFA 固定 15min，最终采用免疫荧光显微镜观察 BMDM 对荧光微球的吞噬能力。

### (4) 流式细胞术

BMDM 细胞分化完成后，使用流式细胞术 (FACS) 进行表型鉴定。收集 Day7 BMDM 细胞，PBS 洗涤 2 次，并孵育 Fc 受体阻断剂 (CD16/32, 10min, 4°C)，随后加入 F4/80-APC (1:200) 和 CD11b-FITC (1:200) 进行荧光标记。孵育 30 min, 4°C 避光，PBS 洗涤 2 次，重悬于 FACS Buffer (PBS+2%FBS)，使用 BD LSR Fortessa 流式细胞仪采集数据，并通过 FlowJo v10.6 进行数据分析。

### (5) qRT-PCR 检测基因表达

细胞转染或活化处理完成后，使用 Trizol 试剂提取总 RNA，并用 NanoDrop 2000 评估 RNA 质量。RNA 逆转录为 cDNA (PrimeScript RT reagent kit, Takara)，随后使用 TB Green PCR Mix (Takara) 进行荧光定量 PCR，测量 PD-L1、iNOS、Arg1 等基因表达水平。

表 3.6 qRT-PCR 引物序列

Tab. 3.6 qRT-PCR primer sequences

基因名称	引物方向	序列 (5'→3')
IL-10	Forward	GACCAGCTGGACAACATACTGCTAA
	Reverse	GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA
iNOS	Forward	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA
	Reverse	GTGGACGGGTCGATGTCAC
Arg-1	Forward	GTAGACCCTGGGGAACACTAT
	Reverse	ATCACCTTGCCAATCCCCAG
TNF- $\alpha$	Forward	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG
	Reverse	TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG
PD-L1-	Forward	GCTCCAAAGGACTTGTACGTG
	Reverse	TGATCTGAAGGGCAGCATTTC

#### (6) 免疫荧光染色检测 PD-L1 及 M1/M2 标志物

BMDM 细胞在 PD-L1 过表达或敲减后, 使用免疫荧光染色分析 PD-L1 及 M1/M2 相关蛋白 (iNOS, CD206) 表达。细胞固定于 4% PFA (15min, 室温), PBS 洗涤 3 次, 随后使用 0.1% Triton X-100 透膜 10min, 并用 5% BSA 封闭 1h。孵育一抗 PD-L1 (1:400), iNOS (1:500), CD206 (1:500), 4°C 过夜。次日 PBS 洗涤后, 避光孵育荧光标记二抗 (1:400) 1h。DAPI (1:1000) 复染细胞核, 并在荧光显微镜 (Olympus IX73) 下观察。

#### (7) Western blot 蛋白表达检测

Western blot 采用细胞裂解液 (RIPA) 提取蛋白, 加入蛋白酶及磷酸酶抑制剂, 4°C 13000rpm 离心 10min 取上清。蛋白浓度通过 BCA 试剂盒 (Bio-Rad, USA) 测定, SDS-PAGE 电泳分离后转膜至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1h, 孵育一抗 PD-L1 (1:1000),  $\beta$ -actin (1:5000), 4°C 过夜。次日洗涤后, 孵育 HRP 标记二抗 (1:2000) 2h, ECL 显色后使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

### 1.2.2 动物实验部分

#### (1) tMCAO 与 dMCAO 缺血性卒中模型构建

本研究采用线栓法 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 和远

端电凝法 (distal middle cerebral artery occlusion, dMCAO) 两种缺血性卒中模型, 以探讨不同缺血性卒中模型下 PD-L1 介导的免疫调控差异。

### 1) tMCAO 线栓法模型

根据课题组以往的方法<sup>[83]</sup>, 构建短暂性大脑中动脉阻塞 (tMCAO) 模型以诱导脑缺血/再灌注 (I/R) 损伤。实验过程中, 小鼠首先经 5% 异氟烷诱导麻醉, 并在手术操作期间使用 2% 异氟烷维持麻醉状态, 同时通过加热系统控制核心体温保持在  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

在手术显微镜下, 于颈腹正中进行切开, 以暴露左侧颈总动脉 (CCA) 和外颈动脉 (ECA)。随后, 对 ECA 及 CCA 远端进行结扎, 并在 CCA 分叉近端及颈内动脉 (ICA) 处放置松紧结。根据小鼠年龄, 选择合适规格的硅胶涂层尼龙线栓 (年轻小鼠 0.21mm, 老年小鼠 0.23mm, RWD, 中国), 并将其插入 ICA 切口。当线栓置入后, 收紧 CCA 处的松紧结, 同时松开 ICA 处的结扎线, 然后缓慢推进线栓至 ICA 约 9-10mm 处, 直至出现阻力。

使用激光散斑成像系统 (RFLSI-ZW, RWD) 实时监测脑血流 (CBF) 变化, 若 CBF 下降幅度低于 80%, 则该小鼠被排除。实验数据显示, 模型构建成功后, 再灌注率超过 90%。

缺血 45min 后, 拔除线栓恢复血流。假手术组小鼠接受相同的手术分离血管操作, 但不插入线栓。实验结束后, 小鼠于再灌注 1 天, 3 天, 7 天和 14 天收集并记录相关实验数据, 使用异氟烷安乐死处理。

### 2) dMCAO 远端电凝法模型

本研究采用远端电凝法 (dMCAO) 构建局灶性脑缺血模型, 以模拟永久性局部缺血。实验过程中, 小鼠经 1.5% 异氟烷诱导麻醉, 并在手术加热垫上固定, 以维持核心体温  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

在显微镜辅助下, 于头皮正中切开, 暴露颅骨后使用电钻开孔 (直径约 2mm), 定位大脑中动脉 (MCA) 远端分支 (靠近鼻侧区域)。随后, 采用电凝仪 (RWD) 对 MCA 远端进行 3-5s 烧灼, 直至血流完全阻断, 确认成功后缝合皮肤。

缺血建立后, 使用激光散斑成像系统 (RFLSI-ZW, RWD) 实时监测脑血流 (CBF) 变化, 若 CBF 下降幅度低于 80%, 则该小鼠被排除。

假手术 (Sham) 组经过相同的手术操作, 但不进行 MCA 电凝。

同样分别在术后 1 天, 3 天, 7 天和 14 天收集并记录相关实验数据。使用异氟烷安乐死处理。

3) tMCAO 与 dMCAO 的比较: 评估不同缺血性卒中模型下 PD-L1 介导的免疫调控及治疗响应的差异。(见表 3.6)

表 3.7 两种缺血性卒中动物模型比较

Tab. 3.7 Comparison of two animal ischemic stroke models

模型	研究特点	适用研究方向
tMCAO (线栓法)	可逆性缺血与再灌注损伤	观察急性炎症及免疫反应
dMCAO (电凝法)	持续性局部缺血, 避免再灌注效应	分析慢性缺血对神经损伤和修复的影响

## (2) 动物实验分组

### 1) 实验分组结构

所有小鼠根据年龄 (Young/Aged) 进一步划分为 tMCAO/dMCAO 造模方式, 并按照处理方式 (Sham, MCAO, Vehicle, PD-L1 mAb) 进行分组 (见表 3.7, 图 3.3)。

表 3.8 动物实验分组及处理

Tab. 3.8 Animal experimental grouping and treatment

实验组别	模型	处理方式
Young-tMCAO-Sham	假手术 (Sham)	不插入阻塞线栓, 仅暴露血管
Young-tMCAO	tMCAO	阻塞 45min, 移除线栓, 恢复血流
Young-tMCAO-Vehicle	tMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g KLH 对照抗体 (LTF-2)
Young-tMCAO-PD-L1 mAb	tMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g PD-L1 mAb (BP0101, 10F.9G2)
Aged-tMCAO-Sham	假手术 (Sham)	不插入阻塞线栓, 仅暴露血管
Aged-tMCAO	tMCAO	阻塞 45min, 移除线栓, 恢复血流
Aged-tMCAO-Vehicle	tMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g KLH 对照抗体 (LTF-2)
Aged-tMCAO-PD-L1 mAb	tMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g PD-L1 mAb (BP0101, 10F.9G2)
Young-dMCAO-Sham	假手术 (Sham)	颅骨开孔, 但不电凝 MCA
Young-dMCAO	dMCAO	MCA 远端电凝 3-5 s, 阻断血流
Young-dMCAO-Vehicle	dMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g KLH 对照抗体 (LTF-2)
Young-dMCAO-PD-L1 mAb	dMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g PD-L1 mAb (BP0101, 10F.9G2)
Aged-dMCAO-Sham	假手术 (Sham)	颅骨开孔, 但不电凝 MCA

表 3.8 (续表) 动物实验分组及处理

Tab. 3.8 (Continued) Animal experimental grouping and treatment

实验组别	模型	处理方式
Aged-dMCAO	dMCAO	MCA 远端电凝 3-5 s, 阻断血流
Aged-dMCAO-Vehicle	dMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g KLH 对照抗体 (LTF-2)
Aged-dMCAO-PD-L1 mAb	dMCAO	造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g PD-L1 mAb (BP0101, 10F.9G2)

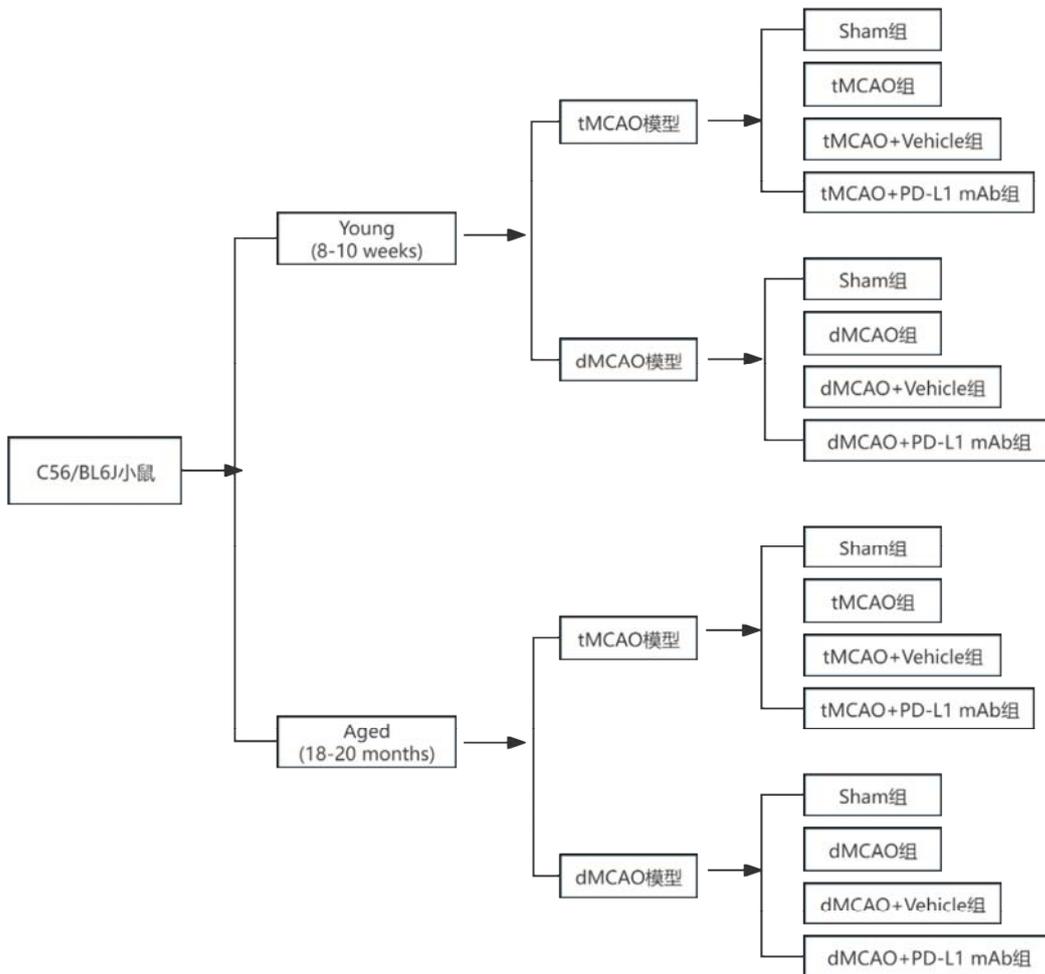


图 3.3 动物实验分组示意图

Fig. 3.3 Schematic diagram of animal experimental grouping

2) 造模处理

a) Sham 组 (假手术组) :

① MCAO 组：手术暴露血管（CCA，ECA，ICA），但不插入阻塞线栓。

② dMCAO 组：手术开颅，但不电凝 MCA。

b) MCAO 组（缺血模型组）：

① tMCAO 组：插入线栓阻断血流 45min，然后移除线栓再灌注。

② dMCAO 组：电凝 MCA 3-5s，造成永久性局灶性缺血。

3) 药物治疗

a) Vehicle 组（对照组）：造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点，尾静脉注射 50 $\mu$ g KLH 同型对照抗体（LTF-2），稀释至 100 $\mu$ L。

b) PD-L1 mAb 组（治疗组）：造模后 1h, 3d, 6d, 9d, 12d 各时间点尾静脉注射 50 $\mu$ g PD-L1 mAb（BP0101, clone 10F.9G2, BioXcell），稀释至 100 $\mu$ L。

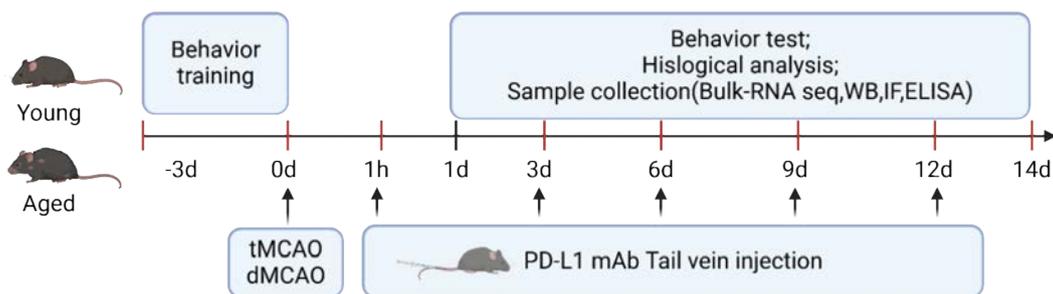


图 3.4 药物治疗示意图

Fig. 3.4 Schematic diagram of drug treatment

### (3) 行为学评估

为全面评估缺血性卒中后小鼠神经功能恢复情况，本研究在术后第 1、3、7、14 天进行行为学测试，包括网格行走测试（Grid Walking Test）、圆柱测试（Cylinder Test）、黏附移除测试（Adhesion Removal Test），并采用神经缺损评分（mNSS）对缺血性卒中后神经功能损伤程度进行综合评估。所有行为学测试均由对实验分组设盲的评估人员进行，以减少观察者偏倚。

#### 1) 网格行走测试（Grid Walking Test）

为了评估评估小鼠运动协调能力和步态缺陷，术前 3 天，每只小鼠置于测试

装置（30cm×30cm×30cm 的透明丙烯酸盒，底部为金属网格（网孔直径 1cm））中适应 5min，以减少环境应激。将小鼠单独放入装置内，自由行走 2min，使用摄像记录。计算小鼠在运动过程中足部误踏（Foot Fault）次数（即前肢或后肢未正确落在网格上而掉落的次数）。记录总步数，计算足错率如下：

$$\text{足错率} = \frac{\text{误踏次数}}{\text{总步数}} \times 100\%$$

足错率越高，说明小鼠运动协调性越差。术后不同时间点的足错率变化可反映小鼠运动功能恢复情况。

## 2) 圆柱测试 (Cylinder Test)

为了对小鼠前肢使用偏侧性评估，本实验采用 Cylinder Test 评估小鼠自主运动过程中患侧与健侧前肢的使用情况，以反映运动偏侧性。实验装置为透明丙烯酸圆柱体（直径 15cm，高 30cm），小鼠置于其中可自然站立和探索。术前进行 5min 适应训练以减少环境影响。实验过程中，将小鼠放入圆柱体，观察并记录前肢接触侧壁的情况，持续 3-5min。根据前肢使用情况分类记录：

- ①健侧前肢使用（仅用健侧前肢接触侧壁）；
- ②患侧前肢使用（仅用患侧前肢接触侧壁）；
- ③双前肢同时使用（双前肢接触侧壁）。

计算患侧前肢使用率（Impaired Limb Use %），其计算公式如下：

$$\text{患侧前肢使用率} = \frac{(\text{患侧前肢使用次数} + 0.5 \times \text{双前肢使用次数})}{\text{总前肢使用次数}} \times 100\%$$

术后患侧前肢使用率降低，提示运动功能受损，若随时间逐步恢复，则说明运动功能改善。

## 3) 黏附移除测试 (Adhesion Removal Test)

为了对小鼠感觉运动整合功能评估，本实验采用 Adhesion Removal Test 评估小鼠前肢感觉功能与运动整合能力，通过测量触碰时间（Time to Touch）和移除时间（Time to Remove）反映缺血性卒中后神经功能的变化。实验使用轻质黏性胶带（4mm×3mm）作为感觉刺激材料，在术前 3 天进行短时间训练，使小鼠熟悉黏贴和移除过程，摘掉时间不超过 10s 的小鼠符合纳入实验的标准。

实验过程中，将小鼠放在干净、透明的测试箱里 1 分钟以适应环境，将对称

的黏性胶带贴在右前掌部，确保刺激一致，并记录以下参数：

①触碰时间（从胶带贴上至小鼠首次注意到胶带（舔舐或尝试移除）所需的时间）；

②移除时间（从胶带贴上至小鼠成功移除胶带的时间）。最长时间记录 60s, 重复三次。

#### 4) 改良神经功能评分（Modified Neurological Severity Score, mNSS）

通过 mNSS 评估缺血性卒中后小鼠的运动、感觉、反射及平衡能力，mNSS 评分越高表示神经损伤越严重。（见表 3.8）

表 3.9 mNSS 评分标准

Tab. 3.9 Criteria for modified neurological severity score (mNSS)

评分类别	评分标准	分值
<b>1. 运动能力（Motor Test, 满分 6 分）</b>		
无异常运动	小鼠运动能力正常，无明显缺陷	0
术侧前肢轻度无力	术侧前肢活动能力轻度下降	1
术侧前肢无法抬起	术侧前肢严重无力，无法自主抬起	2
术侧前肢及后肢无法抬起	术侧四肢均无力，无法抬起	3
无法站立	小鼠瘫痪，无法站立	4
无法行走	运动完全丧失，无法自主移动	5
完全无自主运动能力	全身瘫痪，无主动运动	6
<b>2. 感觉功能（Sensory Test, 满分 2 分）</b>		
对疼痛刺激有正常反应	术侧对针刺等疼痛刺激有正常反应	0
对疼痛刺激反应减弱	术侧对疼痛刺激反应迟钝	1
对疼痛刺激无反应	术侧完全无疼痛感知	2
<b>3. 反射与平衡（Reflex &amp; Balance Test 满分 6 分）</b>		
翻正反射正常	小鼠被翻转后能迅速恢复正常姿势	0
翻正反射延迟	翻转后恢复时间延长	1
翻正反射消失	翻转后无法恢复正常姿势	2
无法保持直立平衡	站立时无法维持平衡，摇晃或倾斜	3
站立时倾斜或摔倒	站立不稳，经常摔倒	4

表 3.9 (续表) mNSS 评分标准

Tab. 3.9(Continued) Criteria for modified neurological severity score (mNSS)

评分类别	评分标准	分值
完全丧失站立和平衡能力	无法站立, 完全丧失平衡能力	5
反射完全丧失	任何情况下均无反射反应	6
<b>4. 协调能力 (Coordination Test, 满分 4 分)</b>		
步态正常	行走流畅, 无异常	0
步态轻微异常	步态不稳, 步幅稍有变化	1
步态严重异常	运动明显不协调, 步幅减少或步态紊乱	2
无法行走	严重运动障碍, 无法正常移动	3
完全无协调能力	卧地不动, 无法自主活动	4

## (4) 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物 (TTC) 染色

为了评估缺血性卒中后的梗死范围, 在术后 3 天采用 TTC (2,3,5-三苯基四氮唑氯化物) 染色进行脑组织损伤分析。小鼠在深度麻醉下处死, 立即取出完整脑组织, 并使用  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷 15min 以便切片。随后, 将脑组织横向切割为 2mm 厚的连续冠状切片, 并浸泡于  $37^{\circ}\text{C}$  预热的 2% TTC 溶液中孵育 30min, 染色期间轻微振荡以确保均匀染色。染色完成后, 切片用 4% 多聚甲醛固定 15min 并拍摄图像。梗死体积 (白色区) 占总脑体积的百分比由 ImageJ 软件计算。

## (5) 苏木精-伊红 (HE) 染色

HE 染色用于观察脑组织细胞形态及组织结构损伤情况。术后指定时间点, 小鼠深度麻醉后经心脏灌流 PBS 冲洗循环系统, 随后用 4% 多聚甲醛固定 24h。取出固定脑组织, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 切割  $5\mu\text{m}$  厚石蜡切片。依次使用二甲苯脱蜡、梯度酒精复水后, 以苏木精染色 5min, 自来水冲洗 5min, 再用 1% 盐酸乙醇分化 30s, 随后伊红染色 1min。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后, 封片并在光学显微镜下观察细胞核和胞质, 分析脑组织损伤程度。

## (6) 尼氏 (Nissl) 染色

尼氏染色用于观察神经元存活情况及损伤程度, 通过染色核糖体 RNA 评估神经元形态。术后固定的脑组织经过梯度乙醇脱水、石蜡包埋后, 切割  $5\mu\text{m}$  厚切片, 经二甲苯脱蜡、梯度酒精复水后, 以 0.1% 醋酸亮蓝 (Cresyl Violet) 溶液

染色 10min, 随后用蒸馏水冲洗 2min。经梯度酒精脱水、二甲苯透明后, 封片并在光学显微镜下观察神经元胞体及尼氏小体染色情况。尼氏染色可用于评估缺血性卒中后神经元丢失程度及形态变化, 神经元萎缩和尼氏小体减少提示神经损伤加重。

#### (7) TUNEL (末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记) 染色

TUNEL 染色用于检测缺血性卒中后脑组织细胞凋亡情况, 通过检测 DNA 断裂标记阳性细胞评估缺血性损伤。术后, 小鼠心脏灌流 PBS 和 4%多聚甲醛进行组织固定, 经梯度脱水、石蜡包埋后制备 5 $\mu$ m 厚切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后, 使用蛋白酶 K (20 $\mu$ g/ml) 室温孵育 15min 以增强膜透性。随后, 按照 TUNEL 试剂盒说明, 加入 TdT 末端转移酶与荧光标记 dUTP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min, PBS 洗涤后, DAPI 染细胞核 10min, 封片后在荧光显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞。

#### (8) 激光散斑成像 (LSCI) 检测脑血流变化

本研究采用激光散斑对比成像 (LSCI) 监测缺血性卒中模型小鼠的脑血流 (CBF) 变化, 以评估造模的成功率及再灌注效果。实验过程中, 小鼠在异氟烷麻醉下固定于手术台, 并通过头皮切开暴露颅骨以减少组织干扰。随后, 使用高分辨率 LSCI 系统 (RFLSIZW,RWD) 采集血流数据, 借助 PIM 软件 (Version) 进行实时分析。CBF 监测时间点包括 tMCAO 造模前基线 (Baseline)、阻塞后 10min (Ischemia)、再灌注后 20min (Reperfusion), 以及 dMCAO 造模前基线 (Baseline)、阻塞后 10min (Ischemia), 并按照标准进行血流信号定量分析。

#### (9) Bulk RNA 测序分析 (bulk RNA-seq)

再灌注 24 小时, 取缺血半球的梗死周围组织进行 RNA 测序分析, 以筛选缺血性卒中后基因表达变化。组织经 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA, 并使用 Agilent2100 生物分析仪评估 RNA 质量。富集 Poly(A)+mRNA 后, 采用 Fast RNA-seq Lib Prep Kit V2 构建文库, 并在 Illumina NovaSeq 平台进行 150-bp 双端测序。原始数据经 fastp (v0.19.7) 过滤低质量 reads, 并使用 HISAT2 (v2.0.5) 比对至小鼠基因组 (GRCm38)。基因表达定量采用 featureCounts (v1.5.0-p3) 计算, 差异表达基因 (DEGs) 筛选基准  $\text{adj-}P < 0.05$ ,  $|\log_2\text{FC}| \geq 1.2$ , 并使用 DESeq2 (v1.20.0) 进行统计分析。

#### (10) 血脑屏障 (BBB) 通透性检测 (Evans Blue 渗漏实验)

术后第 3 天, 通过 Evans Blue (EB) 外渗实验评估 BBB 受损程度。小鼠经尾静脉注射 2% EB 溶液 (4ml/kg), 1h 后心脏灌流 0.9% 冷 PBS 以去除血液残留, 随后处死并取脑组织。取两侧大脑半球, 分别称重并匀浆于 2mL N,N-二甲基甲酰胺中, 在 60°C 恒温孵育 72h。随后 4°C 5000rpm 离心 10min, 取上清液于分光光度计 620nm 处测定吸光度, 并通过标准曲线计算 EB 含量以评估 BBB 破坏程度。

#### (11) 流式细胞术 (FACS)

本研究采用流式细胞术 (FACS) 评估缺血性卒中后脾脏及外周血液中免疫细胞亚群的变化, 分析 PD-L1 及相关免疫标志物的表达。

##### 1) 样本制备:

a) 脾脏单细胞悬液制备: 取出脾脏, 用无菌 PBS 冲洗后, 在 100 $\mu$ m 细胞筛网上轻轻研磨, 并用 PBS 反复冲洗, 收集单细胞悬液。随后加入红细胞裂解液 (1 $\times$ RBC Lysis Buffer), 室温孵育 3min 去除红细胞, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 FACS Buffer。

b) 外周血单细胞制备: 眼球采血 100 $\mu$ L 于肝素抗凝管, 随后加入 1mL RBC Lysis Buffer, 室温孵育 3-5min 以裂解红细胞, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 FACS Buffer 以待检测。

##### 2) 抗体孵育

取  $1 \times 10^6$  细胞/孔, 加入 Fc 受体阻断剂 (CD16/32), 4°C 孵育 10min, 随后 4°C 避光孵育荧光标记抗体。使用的主要抗体如下:

表 3.9 流式抗体 Panel

Tab. 3.9 Antibody panel used for flow cytometry

抗体名称	荧光标记	稀释比例
CD3e	BV421	1:200
CD4	APC	1:200
CD8a	PE	1:200
CD19	PerCP	1:200
CD11b	FITC	1:200
Ly6G	APC-A700	1:200
PD-L1	PE-Cy7	1:200

孵育完成后，PBS 洗涤 2 次，重悬于 FACS Buffer，4°C 避光存储，待流式细胞仪检测。

### 3) 流式检测与数据分析

使用 BD LSR Fortessa 流式细胞仪进行检测，采集至少 20,000 个 CD45<sup>+</sup>细胞以确保数据可靠性。数据分析采用 FlowJo v10.6，分别对脾脏及外周血进行免疫细胞亚群分析。所有结果以百分比 (%) 或 MFI (Mean Fluorescence Intensity) 进行统计分析。

## (12) Western blot 蛋白印迹

### 1) 蛋白提取与定量:

收集缺血半球的梗死周围组织，使用预冷的 RIPA 裂解缓冲液，内含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，冰浴裂解 30min，期间每 5min 涡旋振荡 10s。裂解液 4°C 13000rpm 离心 10min，取上清至新管，-80°C 保存备用。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，并使用 1×SDS 负载缓冲液调整蛋白浓度至一致。蛋白样品 95°C 变性 5min 后立即置于冰上冷却。

### 2) SDS-PAGE 电泳与转膜:

取 20-30μg 总蛋白上样，进行 10%或 12% SDS-PAGE 电泳分离，100V 恒压电泳至目标蛋白完全分离。蛋白经湿转法转移至 PVDF 膜 (Millipore, USA, 0.45μm)，PVDF 膜转膜前需使用甲醇活化 30s。

### 3) 封闭与抗体孵育:

膜条在 5%脱脂奶粉（非磷酸化蛋白）或 3%BSA（磷酸化蛋白）溶液中室温封闭 1h，随后 4°C 过夜孵育一抗（ZO-1 1:1000、Claudin-5 1:1000、Occludin 1:1000，GAPDH 1:5000、 $\beta$ -actin 1:5000）。次日，TBST（0.1% Tween-20 in TBS）洗膜 3 次，每次 5min，然后室温孵育 HRP 标记二抗（1:2000）1h。再次洗膜 3 次，每次 5min。

#### 4) 信号检测与定量分析:

使用 ECL 化学发光检测试剂显影，Bio-Rad ChemiDoc 成像系统记录信号。采用 ImageJ 进行灰度分析，目标蛋白信号标准化至内参，并计算相对蛋白表达水平。

#### (13) 免疫荧光染色

采用免疫荧光标记检测缺血性卒中后血管内皮紧密连接蛋白（ZO-1、Claudin-5）、巨噬细胞及 PD-L1 表达。小鼠经 4%多聚甲醛灌流固定，取脑组织石蜡包埋，切片厚度 4 $\mu$ m。脱蜡及抗原修复后，组织用 PBS（含 1%TritonX-100 和 10%正常驴血清）封闭 30min，随后 4°C 过夜孵育一抗：Iba-1（1:800）、iNOS（1:500）、PD-L1（1:400）、CD31（1:800）、ZO-1（1:500）、Claudin-5（1:200）。次日，PBS 清洗后避光孵育荧光标记二抗 1h(1:400)，DAPI 复染细胞核(1:1000)，使用荧光显微镜（Olympus IX73）观察拍摄，并对梗死区及边缘区进行阳性信号定量分析。

#### (14) 细胞因子 ELISA 检测

收集小鼠血浆样本，通过 ELISA 试剂盒测定 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 浓度。实验按照试剂盒说明书进行，每个样本重复 3 次，450nm 读取吸光度，并用标准曲线计算细胞因子浓度（pg/mL）。

#### (15) 生物信息学分析

##### 1) 数据预处理与差异表达基因（DEGs）筛选

测序数据经 fastp（v0.19.7）进行质量控制，去除低质量 reads、接头序列及 rRNA 污染后，使用 HISAT2（v2.0.5）将 clean reads 比对至小鼠参考基因组 GRCm38。基因表达水平采用 featureCounts（v1.5.0-p3）进行定量，所得的原始 count 数据使用 DESeq2(v1.20.0)进行标准化处理，并筛选差异表达基因(DEGs)，筛选标准设定为 $|\log_2FC| > 1.2$ ， $P < 0.05$ 。

## 2) 差异基因可视化

首先, 使用 `ggplot2` (v3.3.2) 绘制火山图 (Volcano plot), 以  $|\log_2FC| > 1.2$ ,  $P < 0.05$  作为筛选标准, 标记上调和下调基因的分布情况。随后, 统计上调及下调基因的数量, 并绘制柱状图以展示基因表达变化的整体比例。为进一步分析差异基因在不同实验组中的表达模式, 对显著差异基因进行 Z-score 归一化处理, 并利用 `pheatmap` (v1.0.12) 生成聚类热图 (Heatmap), 比较各种组中基因表达的聚类分布。

## 3) KEGG 与 GO 富集分析

为探究 PD-L1 mAb 处理后差异表达基因 (DEGs) 涉及的主要生物学功能和通路, 采用 `clusterProfiler` (v3.14.3) 进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析, 重点关注 PI3K-Akt、MAPK、细胞因子-细胞因子受体相互作用、炎症介质调控及 Tight Junction 相关信号通路。此外, 为全面解析基因的功能分类, 结合 `Metascape` 和 `clusterProfiler` 进行 GO (Gene Ontology) 富集分析, 从分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 及细胞组分 (CC) 三个维度评估 DEGs 的功能特征, 以揭示其在信号调节、细胞黏附及免疫反应中的潜在作用。

## 4) 基因集富集分析 (GSEA)

使用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, v4.0) 分析各组之间的信号通路变化趋势, 并以 `c2.cp.kegg.v7.0.symbols.gmt` 作为参考基因集。计算富集分数 (ES), 并设定  $FDR < 0.05$  作为显著性阈值, 重点关注 Tight Junction 相关信号通路在 PD-L1 mAb 处理中的作用。

## 5) 韦恩图分析

采用 `VennDiagram` (v1.6.20) 比较 DEGs 和 Tight Junction 相关基因集的交集, 筛选与 Tight Junction 相关的核心差异基因, 并进一步探索其在脑缺血性卒中后血脑屏障 (BBB) 保护中的潜在作用。

## 6) 蛋白互作 (PPI) 网络构建

为解析差异表达基因 (DEGs) 之间的蛋白互作关系, 采用 STRING 数据库 (v11.5) 获取 PPI (Protein-Protein Interaction) 网络信息, 并利用 `Cytoscape` (v3.9.1) 进行可视化分析, 构建蛋白互作网络。为筛选关键调控基因, 进一步应用 MCODE (Molecular Complex Detection) 算法识别高度互作的基因模块, 并重点分析 Jun、

Cdh5、Snai1、Gna12 等基因在 Tight Junction 相关通路中的核心作用，以揭示其在缺血性卒中后血脑屏障（BBB）保护及免疫调控中的潜在机制。

7) 关键基因表达分析

使用 ggplot2 绘制箱线图，展示 Tight Junction 相关基因（如 Claudin-5、Occludin、ZO-1）在 PD-L1 mAb 处理组和 Vehicle 组中的表达水平，并采用 Wilcoxon 检验计算组间差异的统计学显著性 ( $P < 0.05$ )。

1.2.3 统计分析

数据采用 GraphPad Prism 20.0 进行统计分析，所有实验重复至少 3 次，数据以均数±标准差 (Mean ± SD) 表示。两组间比较采用双尾 Student's t 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，随时间变化的实验数据采用重复测量方差分析 (Repeated Measures ANOVA)。对于涉及两个独立变量（如时间×处理因素）的实验，采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 进行交互作用分析。组间差异的显著性水平设定为  $P < 0.05$ 。

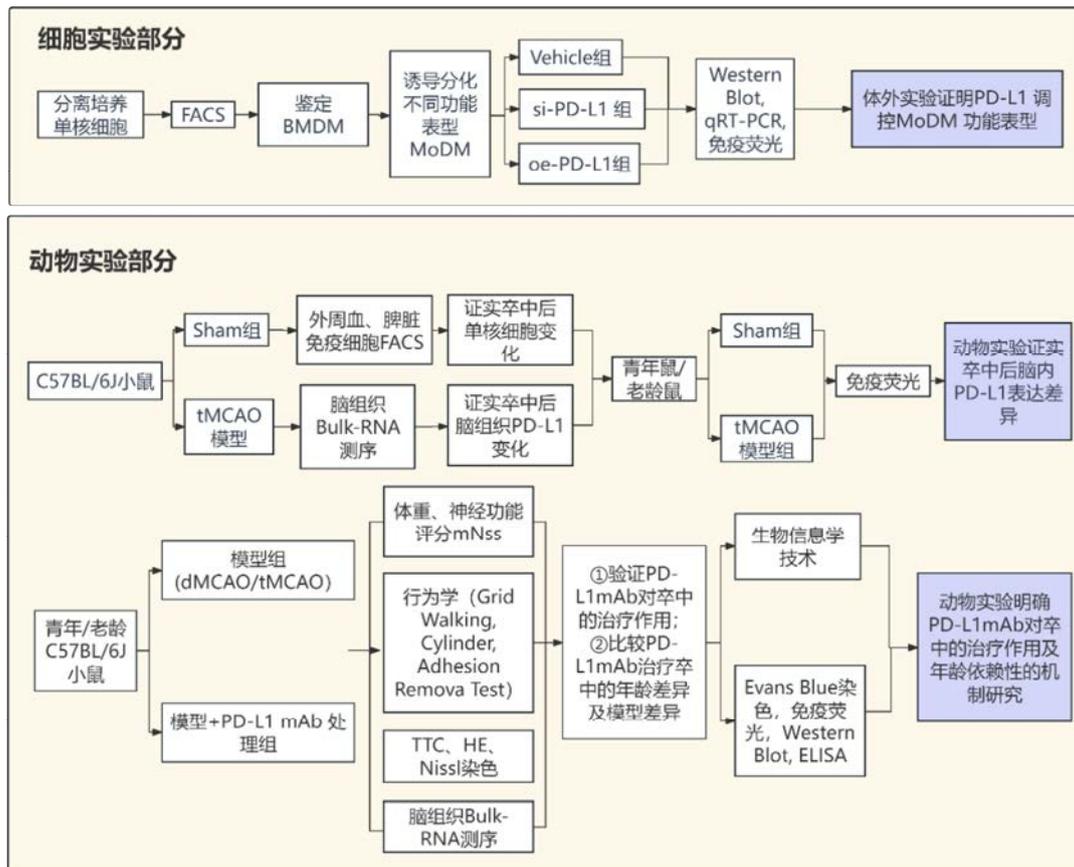


图 3.5 第二部分技术路线图

Fig. 3.5 Experimental design and workflow in Part 2

## 2 结果

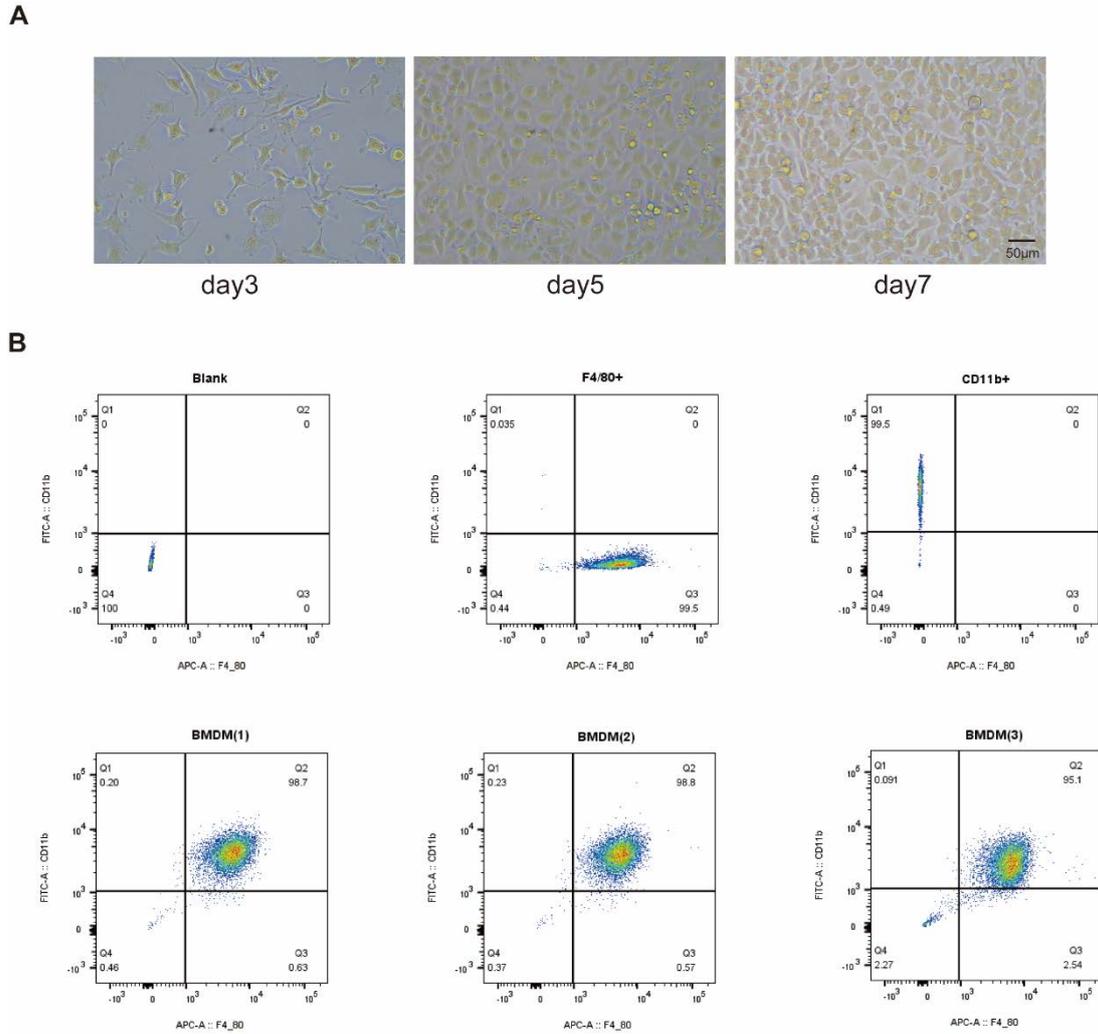
### 2.1 体外构建细胞模型证实 PD-L1 对单核来源巨噬细胞 (MoDM) 功能表型的影响

#### 2.1.1 骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 的体外培养、分化及功能特征

本研究通过体外培养小鼠骨髓来源细胞，并诱导其分化为巨噬细胞 (BMDM)，对其形态、表型及功能特征进行了系统性分析。形态学观察表明，培养第 3 天 (day3) BMDM 逐渐贴壁，细胞呈纤维状或梭形；第 5 天 (day5) 细胞密度增加，形态变得均一；至第 7 天 (day7)，细胞趋于融合，展现典型巨噬细胞形态。流式细胞术 (FACS) 进一步验证了 BMDM 纯度，结果显示，实验培养的 BMDM 细胞 CD11b 和 F4/80 双阳性率均超过 95%，表明培养所得细胞为高纯度巨噬细胞 (图 3.6)。

在不同微环境刺激下，BMDM 可分化为具有不同功能状态的 M1 型或 M2 型巨噬细胞。LPS 刺激后，BMDM 呈现典型的 M1 型形态，细胞轮廓较为扁平，体积增大，细胞间黏附增强，常伴有不规则边缘和粗糙表面，反映其活跃的炎症功能状态。相比之下，IL-4 诱导下的 BMDM 则趋于分化为 M2 型，其形态更为梭形或多突起状，细胞边缘伸出较长伪足，显示出组织修复相关表型特征。

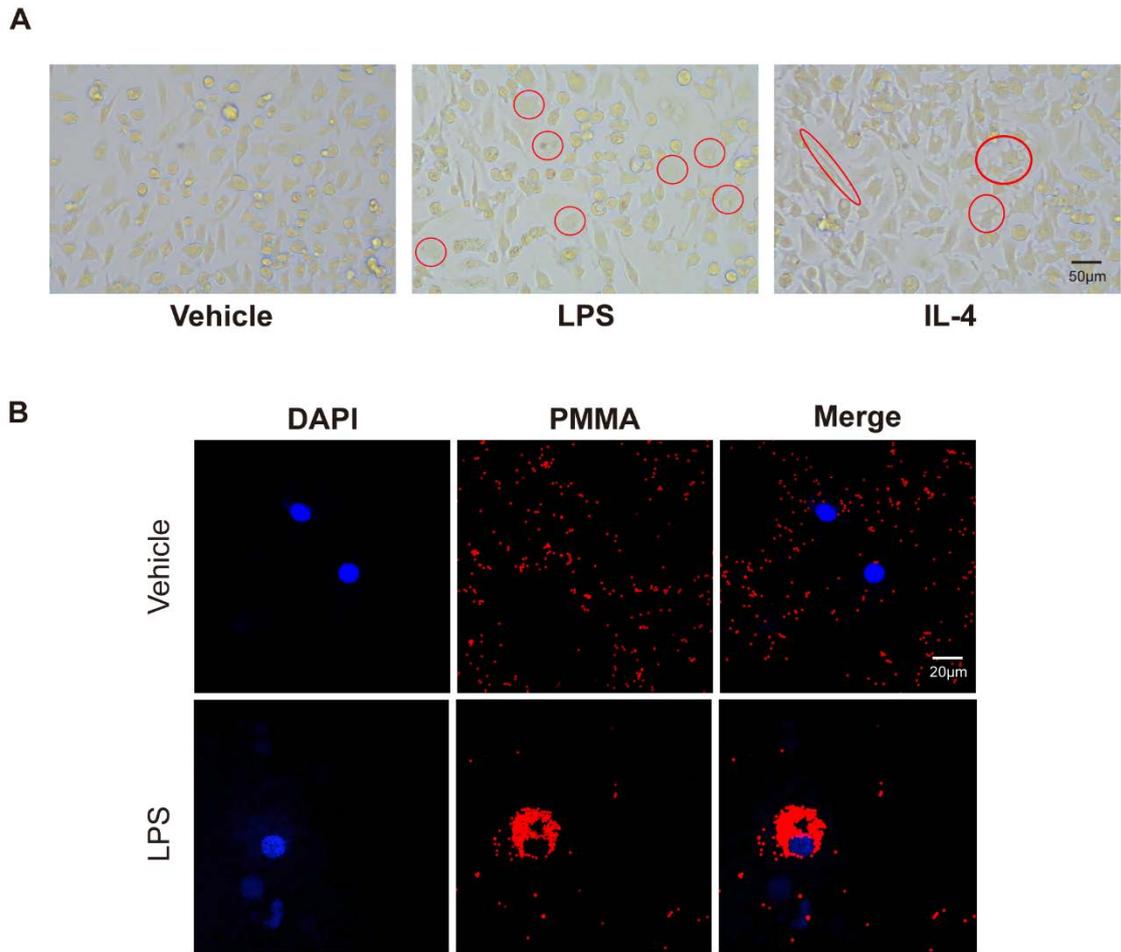
为进一步评估其功能活性，采用单分散荧光微球 (PMMA) 吞噬实验检测不同诱导状态下 BMDM 的吞噬能力。结果显示，与 Vehicle 组相比，LPS 诱导的 M1 型 BMDM 对荧光微球的吞噬能力显著增强，提示其在炎症状态下具有更强的吞噬活性 (图 3.7)。



注：(A) 显微镜观察 BMDM 在第 3、5、7 天的形态变化，显示细胞逐渐贴壁、融合，密度增加；(B) 流式细胞术（FACS）检测显示实验获得的 BMDM 为 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>双阳性，纯度高于 95%。空白对照无明显阳性信号，CD11b<sup>+</sup>或 F4/80<sup>+</sup>细胞群作为阳性对照。

图 3.6 原代培养 BMDM 的形态变化及流式细胞术鉴定

Fig. 3.6 Morphological changes and flow cytometric identification of BMDMs



注：(A) 不同刺激条件下 BMDM 的形态变化：Vehicle 组为对照，LPS 诱导形成 M1 型表型，IL-4 诱导形成 M2 型表型；(B) 荧光微球吞噬实验评估 BMDM 的吞噬能力，DAPI（蓝色）标记细胞核，红色荧光微球代表被吞噬颗粒。LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞表现出更强的吞噬能力。

**图 3.7 原代培养 BMDM 在不同诱导条件下的分化及吞噬功能检测**

**Fig. 3.7 Differentiation and phagocytic function of primary BMDMs under different induction conditions**

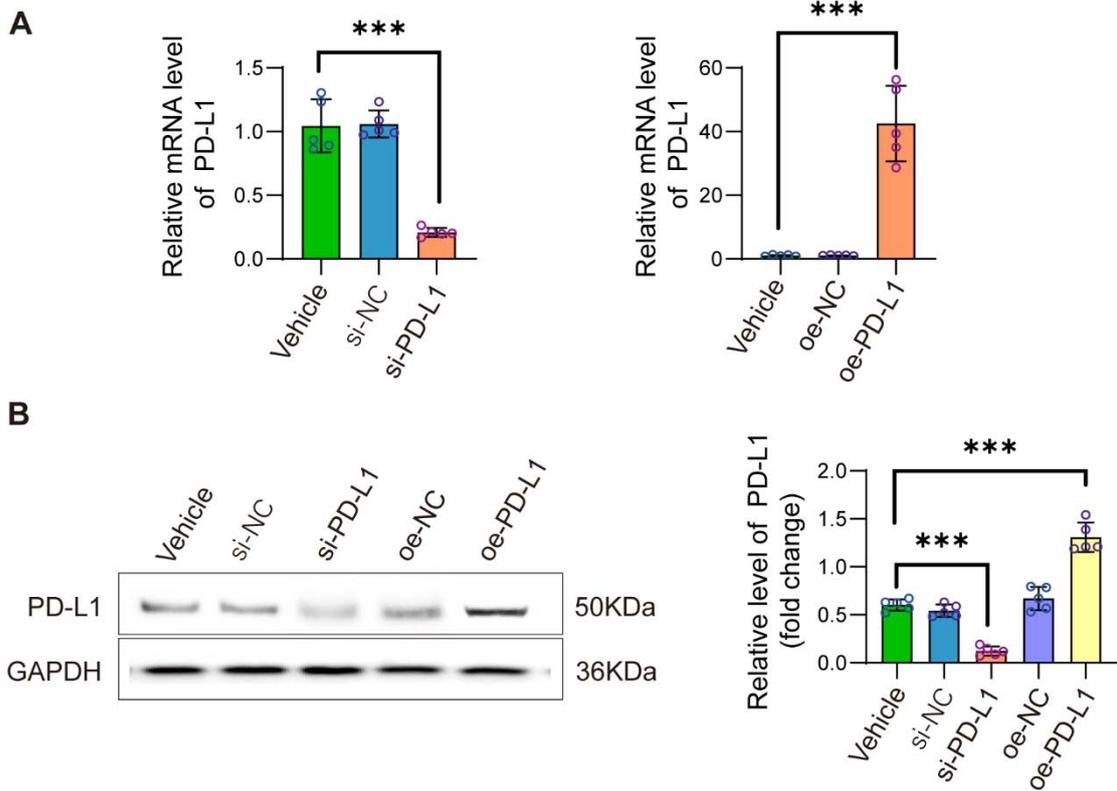
### 2.1.2 PD-L1 在 BMDM 细胞中的表达调控及其对活化状态的影响

为探究程序性死亡配体 1 (PD-L1) 在巨噬细胞功能表型调控中的作用, 本研究首先在小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 中构建了 PD-L1 过表达 (oe-PD-L1) 及敲低 (si-PD-L1) 模型, 并通过 qRT-PCR 和 Western blot 对其干预效率进行验证。结果显示, si-PD-L1 组的 PD-L1 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低, 而 oe-PD-L1 组则显著上调 ( $P < 0.05$ ) (图 3.8), 表明干预体系构建成功。

在 LPS 诱导的 M1 型活化实验中, PD-L1 过表达显著增强了炎症相关基因 iNOS 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平, PD-L1 敲低则抑制其表达 ( $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果进一步证实了 iNOS 在不同处理组的表达变化: PD-L1 过表达组 iNOS 荧光强度显著升高, 敲低组则明显降低 (图 3.9)。结果提示, PD-L1 有助于增强 LPS 诱导的炎症性 M1 活化反应。

相反, 在 IL-4 诱导的 M2 型活化实验中, PD-L1 过表达显著抑制了 IL-10 和 Arg1 的表达, 而 PD-L1 敲低则增强其表达水平 ( $P < 0.05$ )。免疫荧光定量结果亦显示, M2 型标志物 CD206 在 PD-L1 过表达组中显著下调, 而在 PD-L1 敲低组显著上调 ( $P < 0.05$ ), 进一步支持了 PD-L1 对 M2 活化的负向调控作用 (图 3.10)。

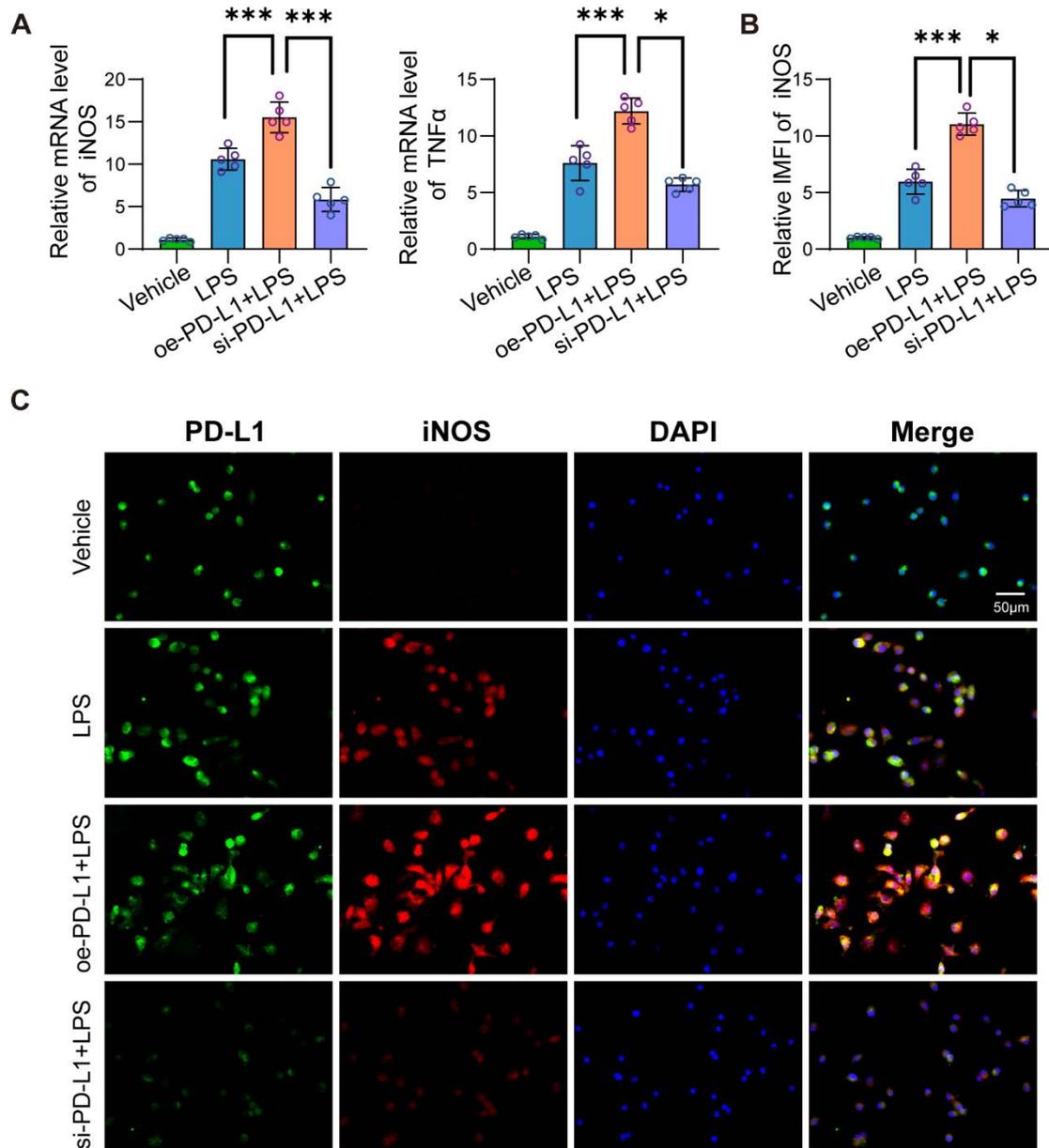
综上所述表明, PD-L1 在 BMDM 中通过调控其 M1/M2 活化状态参与炎症反应的调节过程: PD-L1 的上调倾向于促进促炎性 M1 型活化, 而其下调则增强 M2 型抗炎表型。这一发现揭示了 PD-L1 在巨噬细胞活化中的免疫调控功能, 为其在缺血性卒中及其他炎性疾病中的作用机制提供了实验依据, 并提示其有望作为调控单核来源巨噬细胞功能的潜在干预靶点。



注:(A) qRT-PCR 检测 PD-L1 的 mRNA 表达水平:左图显示 siRNA 介导的敲低效率,si-PD-L1 组较 Vehicle 及 si-NC 组显著下降;右图显示过表达效率,oe-PD-L1 组较 oe-NC 组显著升高。(B) Western blot 检测 PD-L1 蛋白水平, GAPDH 为内参。左图为代表性条带图,右图为定量分析,结果显示 si-PD-L1 组 PD-L1 蛋白表达下调,oe-PD-L1 组显著上调。(均数±标准差, n=5。\*\*\* $P < 0.001$ )

图 3.8 验证 PD-L1 在 BMDM 中的过表达与敲低效率

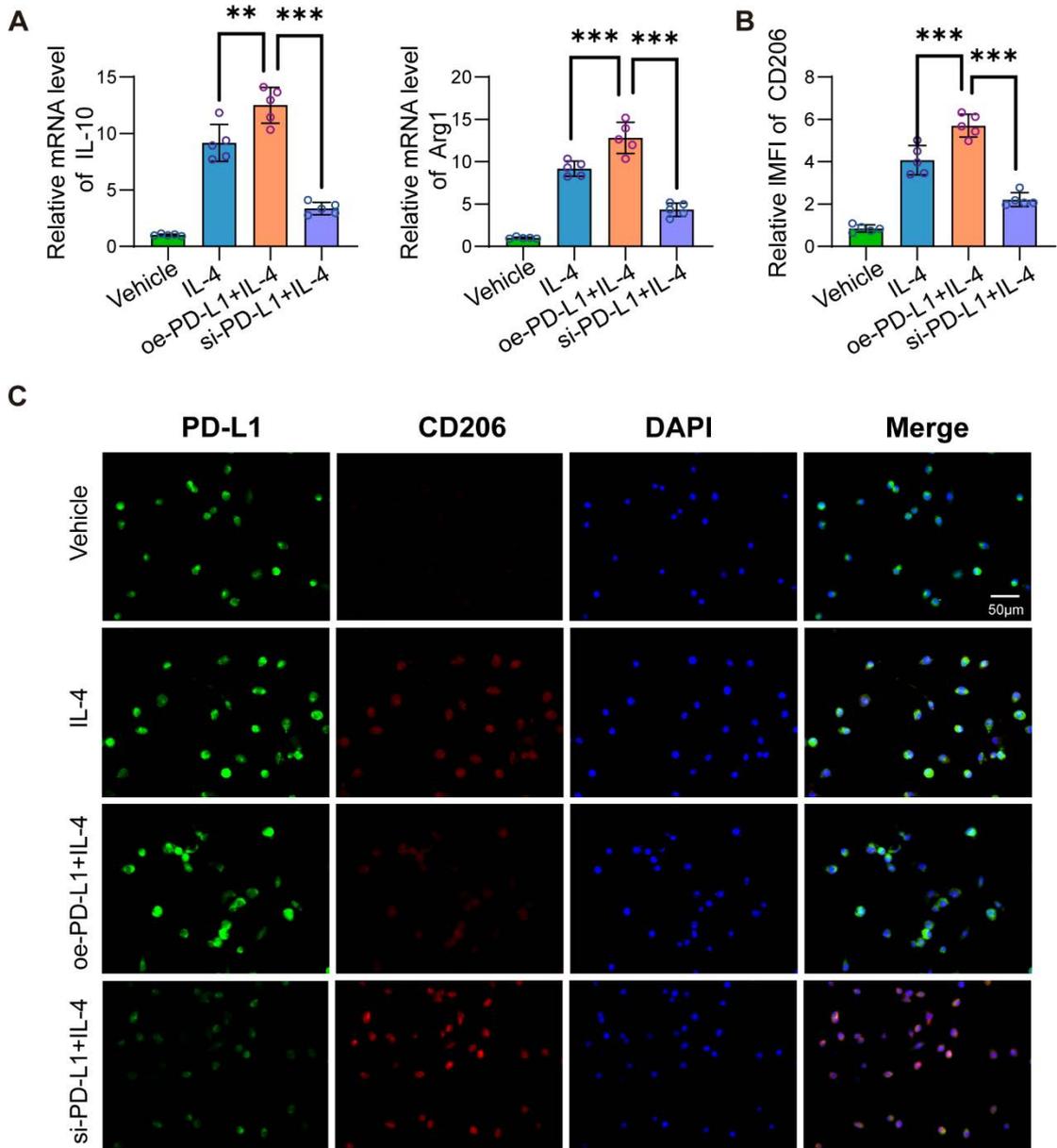
Fig. 3.8 Validation of PD-L1 knockdown and overexpression efficiency in BMDMs



注：(A)qRT-PCR 检测 iNOS 与 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平。LPS 刺激诱导 BMDM 向 M1 型活化，PD-L1 过表达 (oe-PD-L1+LPS) 进一步增强促炎因子表达，而 PD-L1 敲低 (si-PD-L1+LPS) 则显著抑制其表达。(B)免疫荧光染色结果的定量统计，显示各组 iNOS 平均荧光强度 (MFI)，与 mRNA 表达趋势一致。(C)代表性免疫荧光图像展示，分别标记 PD-L1 (绿色)、iNOS (红色) 及细胞核 DAPI (蓝色)，共定位区域呈黄色。比例尺=50 $\mu$ m。  
(均数 $\pm$ 标准差，n=5。\* $P$ <0.05，\*\*\* $P$ <0.001)

图 3.9 PD-L1 增强 BMDM 在 LPS 刺激下的 M1 型活化

Fig. 3.9 PD-L1 enhances M1 polarization of BMDMs under LPS stimulation



注：(A)qRT-PCR 检测 IL-10 与 Arg1 的 mRNA 表达水平。IL-4 诱导 BMDM 向 M2 型活化，PD-L1 过表达 (oe-PD-L1+IL-4) 抑制其表达，PD-L1 敲低 (si-PD-L1+IL-4) 则显著增强其表达。(B)CD206 免疫荧光染色的定量分析结果，展示各组 BMDM 中 CD206 的平均荧光强度 (MFI)，与 mRNA 表达趋势一致。(C)代表性免疫荧光图像展示，分别标记 PD-L1 (绿色)、CD206 (红色) 及细胞核 DAPI (蓝色)，共定位区域呈黄色。比例尺=50 $\mu$ m。(均数 $\pm$ 标准差表示，n=5。 \*\* $P < 0.01$ ， \*\*\* $P < 0.001$ )

图 3.10 PD-L1 抑制 BMDM 在 IL-4 刺激下的 M2 型活化

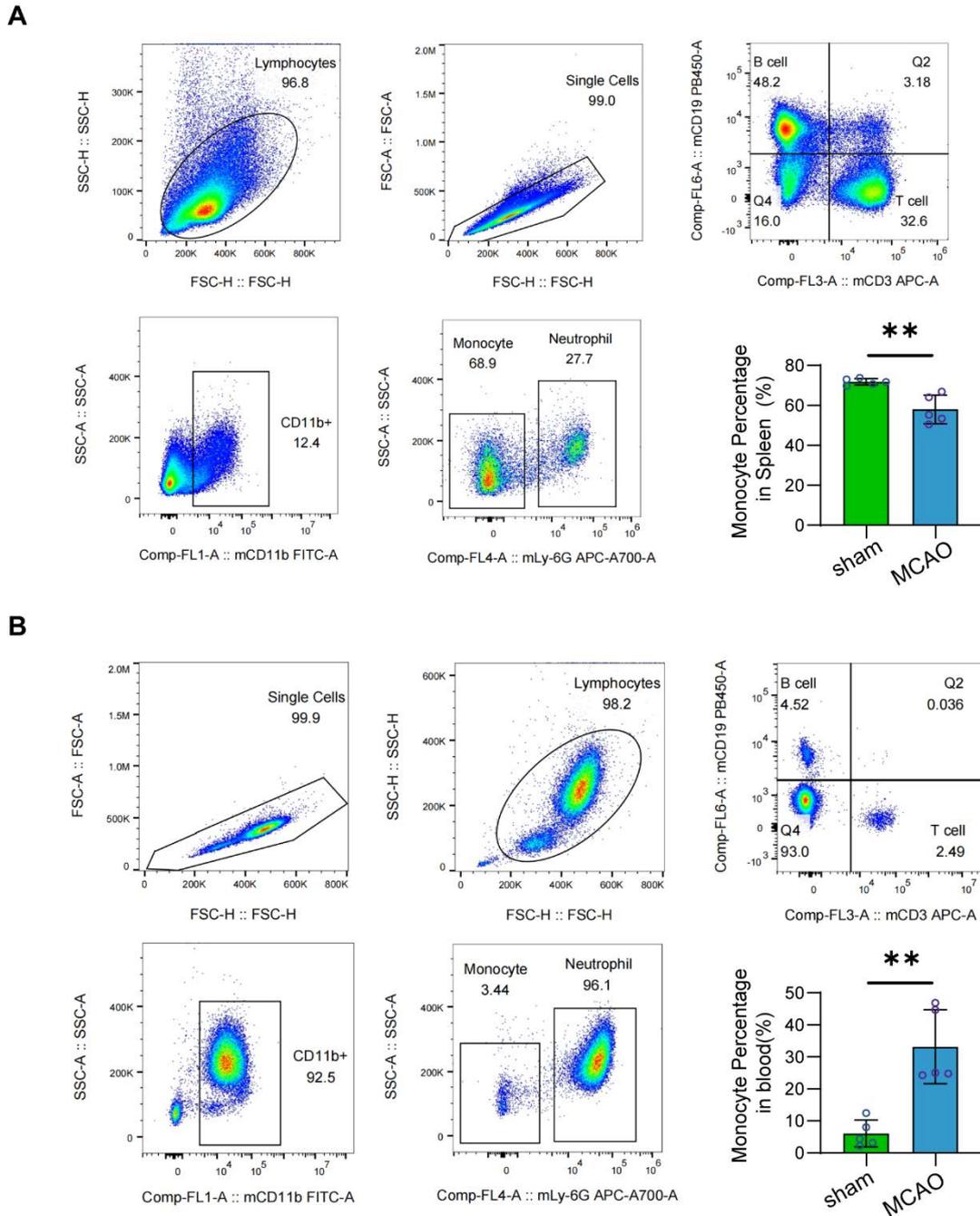
Fig. 3.10 PD-L1 suppresses M2 polarization of BMDMs under IL-4 stimulation

## 2.2 缺血性卒中对单核细胞迁移与 PD-L1 表达的影响

缺血性卒中后不仅引发中枢局部炎症反应,还伴随明显的系统性免疫重塑过程。在该过程中,外周免疫细胞的迁移与再分布可能影响脑组织炎症进展,而免疫检查点分子的表达变化则在调控免疫反应强度和持续时间方面发挥关键作用。为进一步明确 PD-L1 在缺血性卒中相关免疫调控中的角色,本研究从免疫细胞的分布变化、PD-L1 的转录水平调控以及其在髓系细胞中的表达特征三个层面展开研究。

### 2.2.1 缺血性卒中促进脾脏与外周血单核细胞的再分布

缺血性卒中可诱发显著的外周免疫反应。为探讨其对免疫细胞迁移的影响,采用流式细胞术对小鼠脾脏与外周血中的免疫细胞构成进行分析(图 3.11)。结果显示, MCAO 模型中,脾脏单核细胞( $CD11b^+Ly6G^-$ )比例明显下降,而外周血中同类细胞显著升高( $P < 0.01$ ),提示缺血性卒中可动员脾脏储备单核细胞进入外周循环,参与缺血性卒中后的系统性炎症响应。该现象反映出单核细胞在缺血性卒中后外周免疫网络中的再分布,可能为后续组织浸润和中枢炎症调节提供细胞基础。



注：(A)脾脏单细胞悬液经流式细胞术检测免疫细胞亚群比例变化。通过 FSC/SSC 散点图依次筛选淋巴细胞群体、单细胞群体，并基于 CD3 与 CD19 标记区分 T/B 细胞；CD11b<sup>+</sup>细胞进一步分为单核细胞与中性粒细胞群。与假手术组相比，MCAO 组小鼠脾脏中单核细胞占比显著下降。(B)外周血中免疫细胞群体的流式细胞术检测流程与脾脏相似。结果显示，MCAO 组小鼠外周血中单核细胞比例显著上升。（均数±标准差，n=5。 \*\* $P < 0.01$ ）

图 3.11 缺血性卒中外周单核细胞比例变化的流式细胞术分析

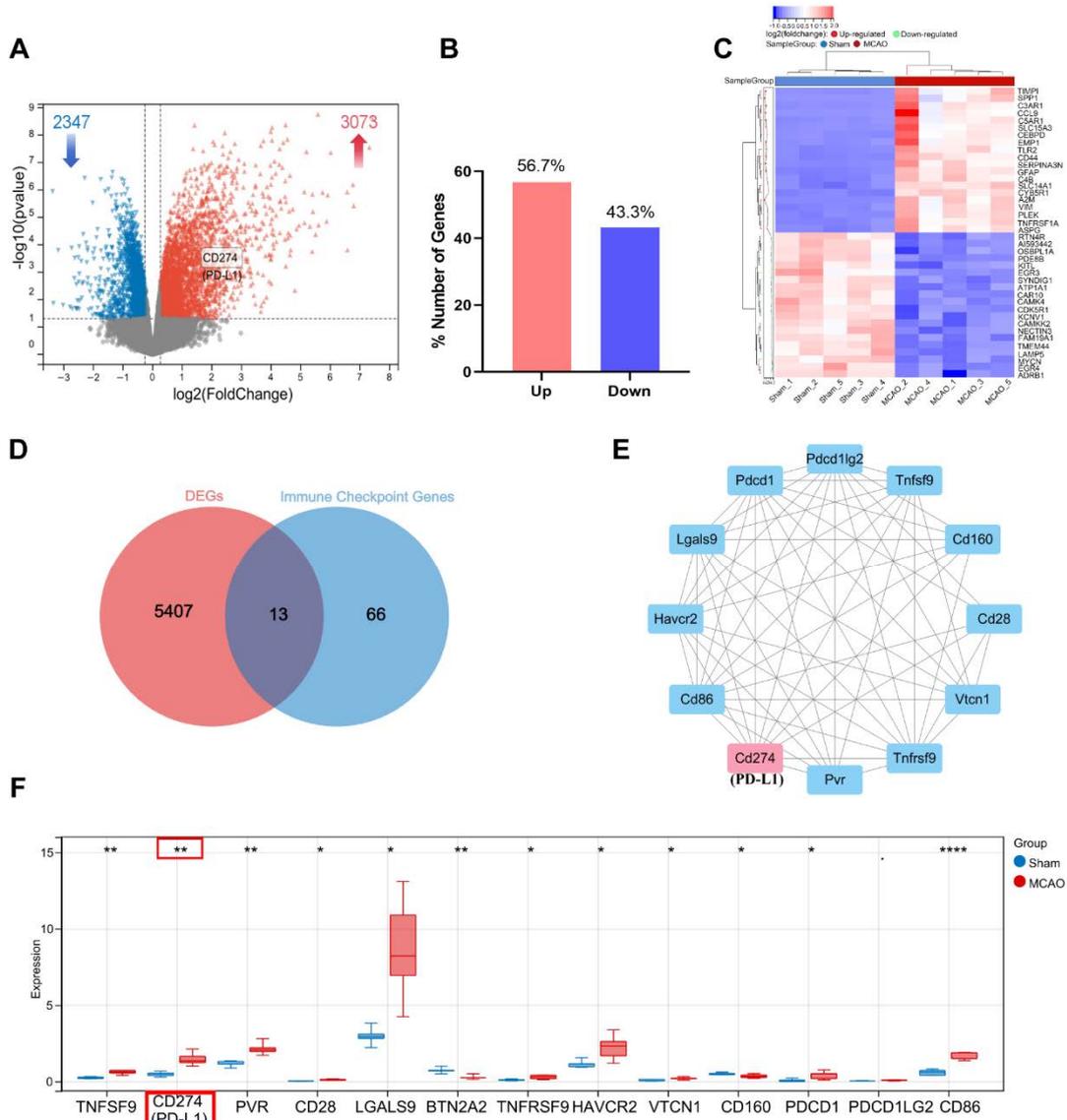
Fig. 3.11 Flow cytometry analysis of peripheral monocyte proportions after ischemic stroke

### 2.2.2 缺血性卒中诱导的免疫检查点基因表达变化

为解析缺血性卒中后免疫调控通路变化，进一步对缺血半球脑组织进行 RNA 测序 (RNA-seq) 分析 (图 3.12)。火山图分析显示，缺血性卒中组中有 3073 个基因上调，2347 个基因下调 ( $P < 0.05$ ,  $|\log_2FC| > 1$ )，其中免疫检查点基因 PD-L1 (CD274) 显著上调。进一步统计分析表明，上调基因占比为 56.7% (图 3.12B)，表明缺血性卒中引起广泛的基因转录重塑，可能涉及炎症与免疫应答通路。

热图聚类 (图 3.12C) 进一步揭示了缺血性卒中后关键差异基因的表达模式。免疫检查点基因筛选显示，共有 13 个 ICGs 与 DEGs 交集 (图 3.12D)，其中 PD-L1 是最显著上调的分子之一。蛋白互作网络分析 (图 3.12E) 揭示 PD-L1 与多个经典免疫检查点 (如 CD28、HAVCR2、LGALS9 等) 具有协同调控潜力。表达量比较结果 (图 3.12F) 显示，PD-L1 在缺血性卒中后表达显著升高 ( $P < 0.01$ )，与 TNFSF9、CD86 等多个免疫调控因子呈现正相关趋势。

上述结果提示，PD-L1 可能在缺血性卒中后炎症调控中发挥核心作用，其表达上调或与巨噬细胞免疫调节状态变化密切相关，支持其作为潜在免疫干预靶点的研究价值。



注：(A) 火山图展示 MCAO 组相较 Sham 组的差异表达基因 (DEGs)，红色和蓝色分别表示显著上调和下调基因 ( $P < 0.05$ ,  $|\log_2\text{Fold Change}| > 1$ )，PD-L1 (CD274) 显著上调；(B) 上下调基因比例统计显示，上调基因占 56.7%，下调基因占 43.3%；(C) 热图呈现表达变化最显著的基因，红色代表高表达，蓝色代表低表达；(D) 韦恩图显示 DEGs 与免疫检查点基因 (ICGs) 的交集，共 13 个 ICGs 在 MCAO 组中差异表达；(E) 差异 ICGs 构建的 PPI 网络，PD-L1 (CD274) 与多个免疫检查点基因存在潜在相互作用；(F) 箱线图比较 Sham 组 (红) 与 MCAO 组 (蓝) 中 ICGs 的表达水平，PD-L1 在 MCAO 组显著上调。(均数±标准差,  $n=5$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

图 3.12 缺血性卒中后小鼠脑组织中免疫检查点相关基因表达谱分析

Fig. 3.12 Transcriptomic analysis of immune checkpoint gene expression in mouse brain tissue after ischemic stroke

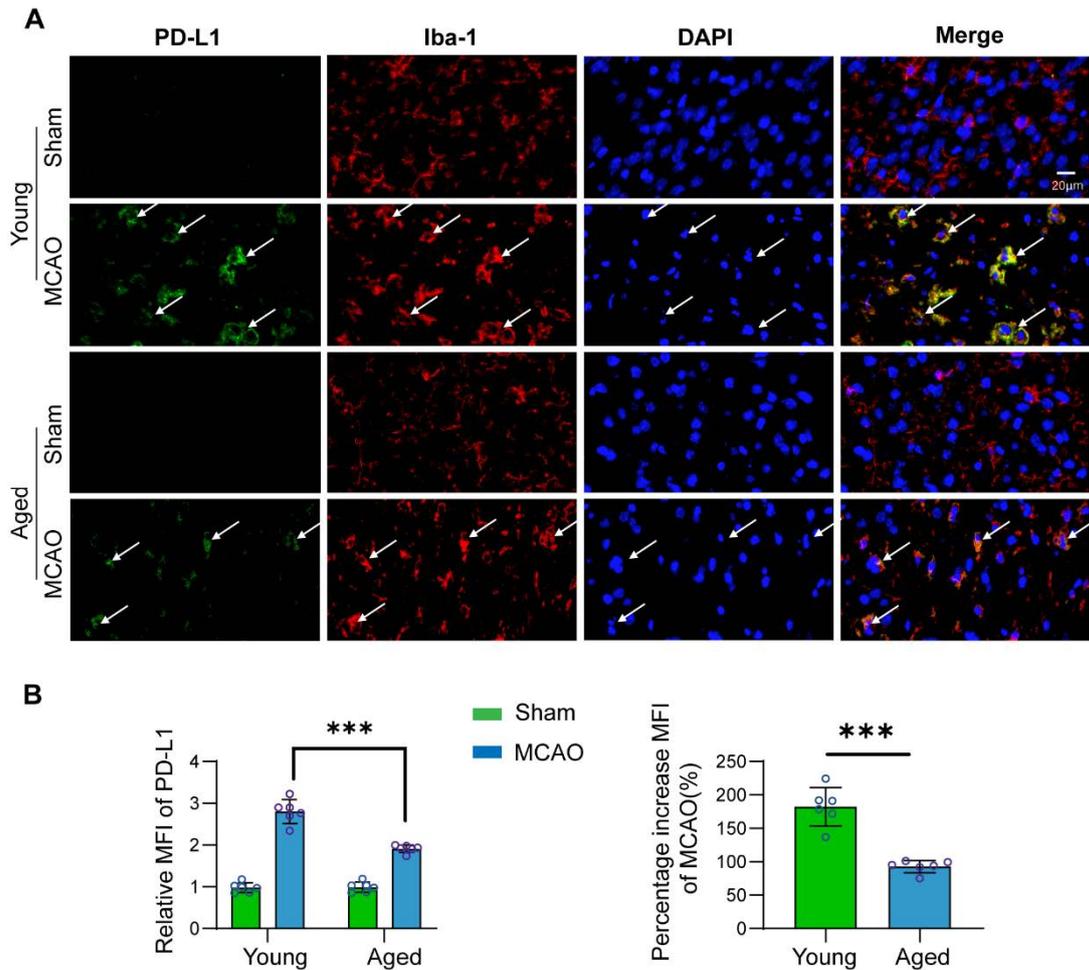
### 2.2.3 PD-L1 在缺血性卒中后 Iba-1<sup>+</sup>巨噬细胞中的表达变化及年龄差异性

MoDMs 作为缺血性卒中后中枢炎症反应的关键效应细胞，其免疫检查点的表达状态可能影响其促炎或修复功能。为进一步明确 PD-L1 在中枢巨噬细胞中的定位与表达，开展了脑组织 Iba-1 与 PD-L1 的免疫荧光共染分析（图 3.13）。

结果显示，在 MCAO 组小鼠中，PD-L1 在 Iba-1<sup>+</sup>细胞中表达显著增强，Sham 组几乎未见阳性信号。荧光图像显示 PD-L1 主要定位于 Iba-1<sup>+</sup>细胞质区，提示其在 MoDMs 及小胶质细胞中广泛表达。定量分析结果显示，PD-L1 在 MCAO 后脑组织中表达显著升高（ $P < 0.001$ ），且在年轻小鼠中升高幅度更大。

进一步比较年轻与老年小鼠发现，尽管两组均存在 PD-L1 表达上调，老龄小鼠的 PD-L1 荧光强度明显低于年轻小鼠，且 MCAO 诱导后的相对增幅较小（ $P < 0.001$ ），提示缺血性卒中后 PD-L1 免疫调控机制可能存在年龄差异性变化。

上述结果表明，PD-L1 在缺血性卒中后 Iba-1<sup>+</sup>细胞中显著上调，提示其可能参与中枢免疫应答调控。年龄因素可能影响 PD-L1 介导的免疫调节反应，对缺血性卒中后的神经炎症与修复过程具有潜在影响。



注：(A)共聚焦免疫荧光染色显示 PD-L1（绿色）在脑组织中的表达及其与小胶质细胞标志物 Iba-1（红色）的共定位情况，不同年龄段（青年与老龄）MCAO 组小鼠中均观察到 PD-L1 在 Iba-1<sup>+</sup>细胞上的表达增强（白色箭头所示），Sham 组几乎不表达。DAPI（蓝色）标记细胞核。比例尺为 20 $\mu$ m。(B)左图为 PD-L1 在 Iba-1<sup>+</sup>细胞中的相对荧光强度（MFI）定量分析结果，青年 MCAO 组显著高于 Sham 组，老龄组亦呈类似趋势但表达水平较低。右图为 PD-L1 在 MCAO 组中相对于 Sham 组的 MFI 升高百分比，青年小鼠的 PD-L1 上调幅度显著高于老龄小鼠。（以均数 $\pm$ 标准差，n=6。\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 3.13 缺血性卒中后不同年龄小鼠脑组织中 PD-L1 的表达变化

Fig. 3.13 Differential expression of PD-L1 in the brain after ischemic stroke between young and aged mice

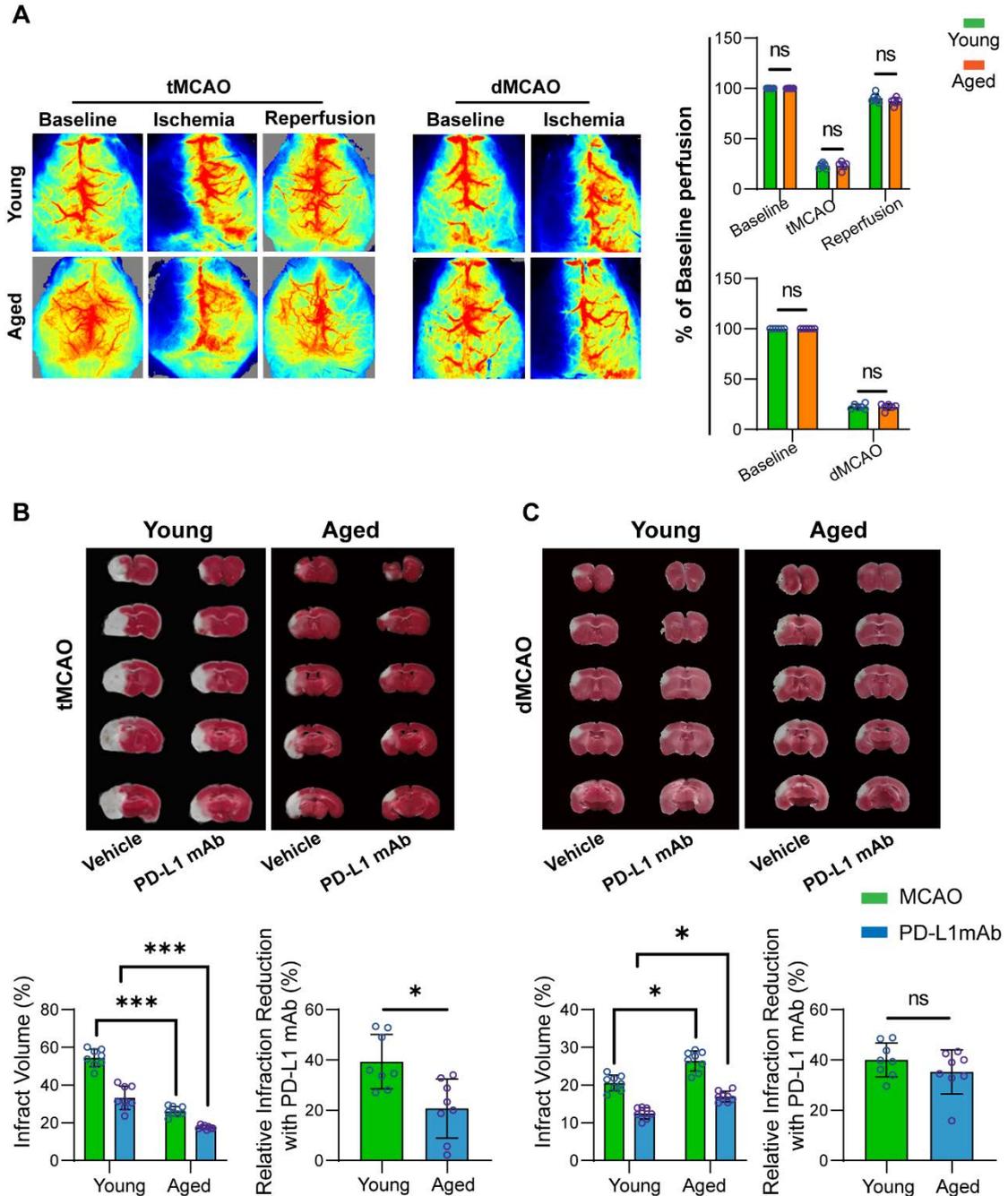
### 2.3 PD-L1 单克隆抗体 (PD-L1 mAb) 在缺血性卒中模型中的治疗效果

为进一步评估 PD-L1 阻断对缺血性卒中后神经损伤及修复的影响, 本部分研究采用 PD-L1 mAb 进行干预, 并在 tMCAO 和 dMCAO 模型中, 系统探讨 PD-L1 mAb 处理对脑梗死体积、神经功能恢复、血脑屏障完整性及外周免疫反应的影响。同时, 本研究进一步分析 PD-L1 mAb 在 Young 组和 Aged 组的治疗效应差异, 探讨其年龄依赖性免疫调控模式, 为缺血性卒中后 PD-L1 相关的免疫干预提供理论依据。

#### 2.3.1 PD-L1 mAb 处理对脑梗死体积的影响及其年龄差异性

为验证 tMCAO 和 dMCAO 模型的造模成功率, 并确保实验组间在缺血性卒中前具有相似的脑血流基线, 本研究首先采用激光散斑成像 (LSCI) 评估 Young 组和 Aged 组在不同模型中的脑血流变化(图 3.14A)。结果显示, 在基线(Baseline)状态下, 各实验组的脑血流无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明造模前各组脑灌注状态一致。在缺血期 (Ischemia), tMCAO 和 dMCAO 组均表现出显著的脑血流减少, 验证了造模的成功性。

在此基础上, 采用 TTC 染色评估 PD-L1 mAb 处理对脑梗死体积的影响(图 3.14B,3.14C)。在 tMCAO 组, PD-L1 mAb 处理显著减少脑梗死体积 ( $P < 0.001$ ), 且 Young 组的改善幅度显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。进一步计算相对梗死减少率 (Relative Infarction Reduction) 发现, Young 组的改善率明显高于 Aged 组, 提示 PD-L1 mAb 在年轻个体中可能具有更强的神经保护作用。在 dMCAO 组, TTC 染色显示 PD-L1 mAb 处理后, Young 组和 Aged 组的脑梗死体积均显著减少 ( $P < 0.05$ ), 表明 PD-L1 mAb 在持续缺血条件下仍能发挥神经保护作用。然而, Young 组和 Aged 组之间的相对改善率无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 提示在 dMCAO 模型中, PD-L1 mAb 的治疗效果在不同年龄组间较为一致, 而在 tMCAO 模型中, 其保护作用表现出年龄差异性。



注：(A) 激光散斑成像 (LSCI) 显示 tMCAO 与 dMCAO 模型中，不同年龄小鼠在基线、缺血及再灌注（或持续缺血）阶段的脑血流灌注变化。量化分析表明，同一模型下不同年龄组间灌注水平无显著差异；(B) TTC 染色评估 PD-L1 mAb 在 tMCAO 模型中的神经保护作用，结果显示其显著减小脑梗死体积，年轻小鼠中效果更为显著，且相对梗死体积减少率亦提示其治疗反应更强；(C) 在 dMCAO 模型中，PD-L1 mAb 同样显著减小梗死体积，两个年龄组均显示良好治疗效果，且相对减少率无显著差异，提示其对不同年龄组疗效相近。（均数 ± 标准差，n=8。ns,  $P > 0.05$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ）

图 3.14 PD-L1 mAb 在不同缺血性卒中模型与年龄阶段中的神经保护作用评估

Fig. 3.14 Evaluation of PD-L1 mAb in different ischemic stroke models and age groups

### 2.3.2 PD-L1 mAb 处理对缺血性卒中后神经功能恢复的影响

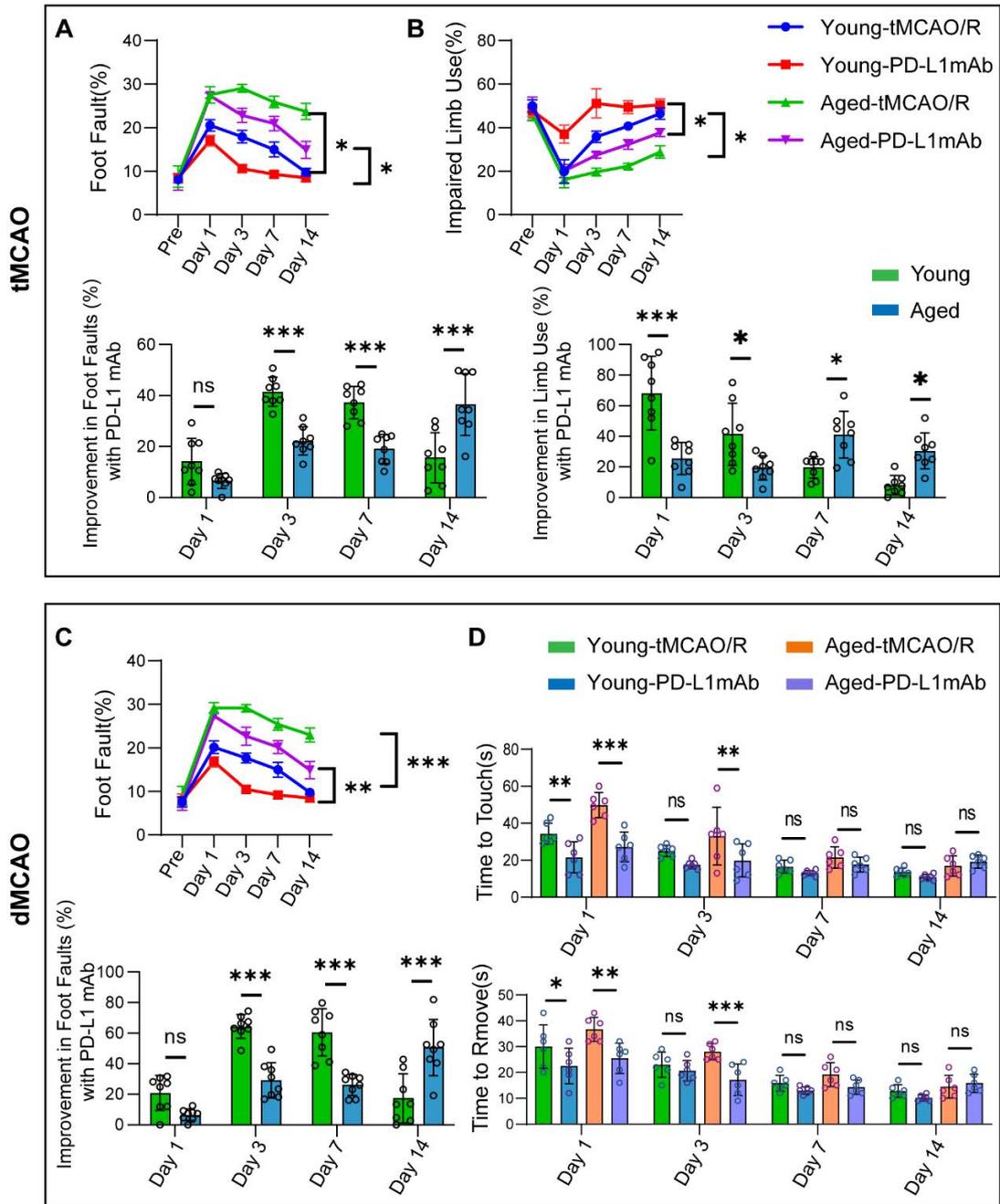
本研究在 tMCAO 和 dMCAO 两种模型中评估了 PD-L1 mAb 处理对神经功能恢复的影响。结果表明, PD-L1 mAb 在两种模型下均能促进运动功能和感觉运动协调能力的恢复, 但不同年龄组的恢复速度和改善程度存在显著差异(图 3.15)。

#### (1) PD-L1 mAb 促进 tMCAO 模型中的神经功能恢复

在 tMCAO 模型中(图 3.15A,3.15B), PD-L1 mAb 处理有效改善了运动功能和受损肢体的使用能力, 且 Young 组恢复更快, 改善幅度更大。Grid Walking Test(图 3.15A)结果显示, PD-L1 mAb 处理后, 小鼠的足错率(Foot Fault %)随时间显著下降, 提示运动功能恢复。Young-PD-L1mAb 组的改善速度明显快于 Aged-PD-L1mAb 组( $P < 0.001$ ), 而 Aged 组的改善幅度较小( $P < 0.05$ )。Cylinder Test(图 3.15B)结果表明, PD-L1 mAb 处理后, 受损肢体使用率(Impaired Limb Use %)随时间增加, Young 组恢复速度显著快于 Aged 组( $P < 0.05$ )。这些结果表明, PD-L1 mAb 可有效促进 tMCAO 后的神经功能恢复, 且 Young 组恢复更快, 提示年龄因素可能影响其治疗效果。

#### (2) PD-L1 mAb 促进 dMCAO 模型中的神经功能恢复

在 dMCAO 模型中(图 3.15C,3.15D), PD-L1 mAb 处理同样促进了运动功能和感觉运动协调能力的恢复, 但 Young 组的改善更为显著。Grid Walking Test(图 3.15C)结果显示, PD-L1 mAb 处理后, Young 组的足错率显著下降, 下降幅度明显大于 Aged 组( $P < 0.001$ )。Aged 组尽管有所改善, 但下降趋势较缓( $P < 0.01$ )。Adhesion Removal Test(图 3.15D)结果表明, 在触碰时间(Time to Touch)方面, Young 组在 Day1 即显著缩短( $P < 0.01$ ), 而 Aged 组的改善在 Day3 才显现( $P < 0.01$ ), 且在 Day7 和 Day14 未见进一步变化( $P > 0.05$ )。在移除时间(Time to Remove)方面, Young 组在 Day1 迅速缩短( $P < 0.05$ ), Day3 进一步缩短( $P < 0.001$ ), 而 Aged 组无显著改善( $P > 0.05$ )。这些结果表明, PD-L1 mAb 在 dMCAO 后仍具有治疗作用, 但 Young 组在早期阶段的恢复更为迅速, 而 Aged 组的改善相对较小。



注：(A) Grid walking test 显示 PD-L1 mAb 显著降低 foot fault 率，改善运动协调性，且年轻小鼠改善更明显。下方柱状图显示 Day3、Day7、Day14 的相对改善率；(B) Cylinder test 评估前肢使用对称性，PD-L1 mAb 提高受损前肢使用频率，年轻小鼠在 Day3 与 Day7 改善更显著；(C) 在 dMCAO 模型中，PD-L1 mAb 持续改善步态协调，三时间点均达显著，年轻小鼠改善幅度更大；(D) Adhesive removal test 显示 PD-L1 mAb 显著缩短贴片被触及与移除时间，改善效果在 tMCAO 年轻小鼠 Day1 与 Day3 尤为明显，dMCAO 模型中无显著差异。（均数±标准差，n=6-8。ns,  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ）

图 3.15 PD-L1 mAb 在不同年龄与模型中对运动与感觉功能的改善效应

Fig. 3.15 PD-L1 mAb enhances motor and sensory recovery post-ischemic stroke in an age- and model-dependent manner

### 2.3.3 PD-L1 mAb 处理对缺血性卒中后神经元存活的影响

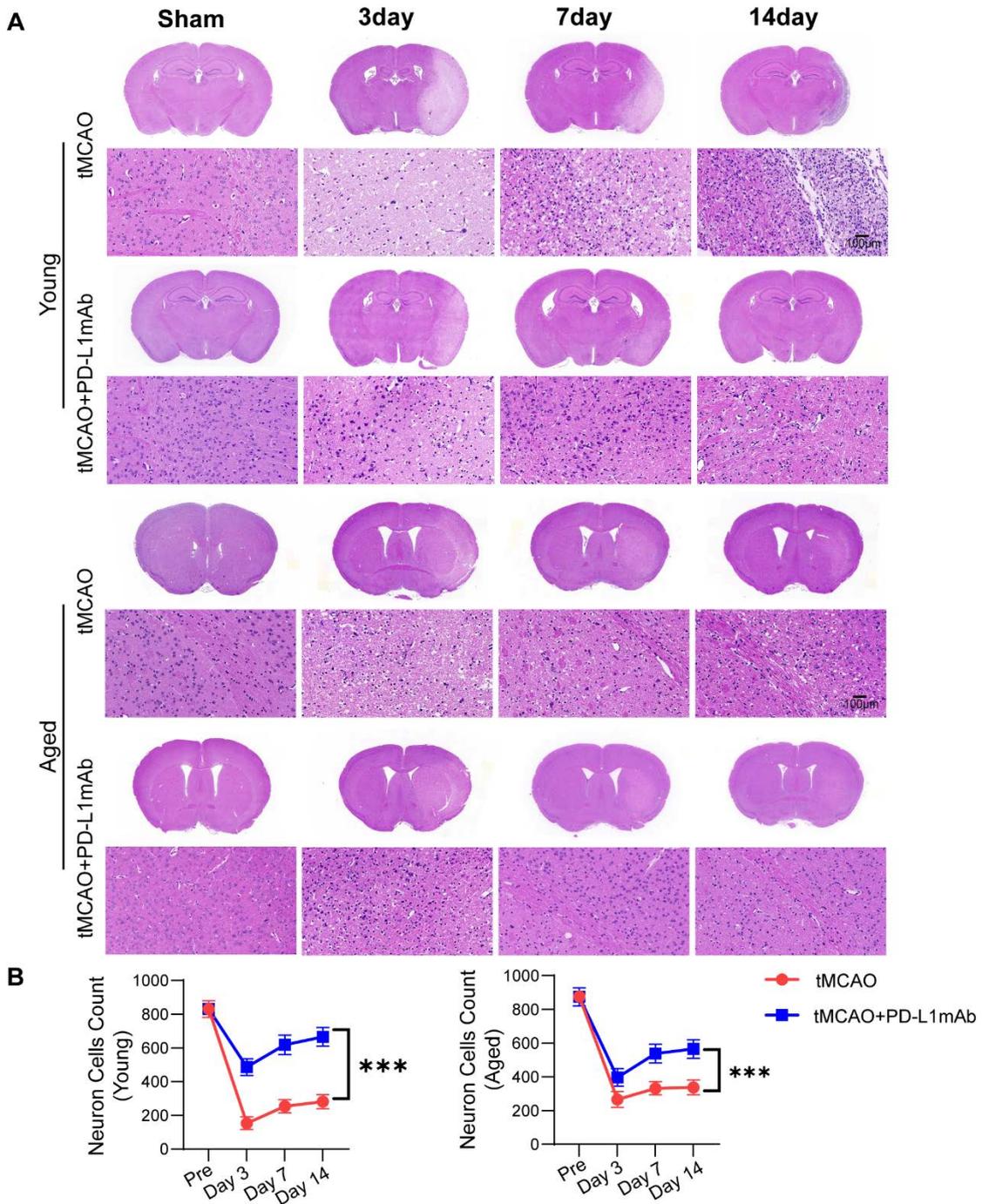
为进一步探讨 PD-L1 mAb 在缺血性卒中中的神经保护作用,本研究采用 HE 染色和 Nissl 染色评估 tMCAO 和 dMCAO 模型下神经元损伤情况及 PD-L1 mAb 处理后的存活情况(图 3.16–3.19)。结果表明,PD-L1 mAb 处理在两种模型中均显著减少了神经元损伤,增加了神经元存活率,并对 Nissl 体丢失具有一定的保护作用。然而,其保护效果在不同年龄组间存在差异,Young 组表现出更明显的改善趋势。

#### (1) PD-L1 mAb 在 tMCAO 模型中的神经元保护作用

在 tMCAO 模型中,PD-L1 mAb 处理有效减少了神经元损伤,并在 Young 组表现出更强的保护效果(图 3.16 和图 3.17)。HE 染色(图 3.16A)显示,Sham 组(假手术)中,Young 和 Aged 组的神经元形态完整,未见明显损伤;tMCAO 诱导后,Day3 时神经元数量明显减少,损伤最为严重,Day7 和 Day14 时部分恢复,但仍可见坏死区域;PD-L1 mAb 处理后,Young-PD-L1mAb 组在各时间点神经元保存较多,而 Aged-PD-L1 mAb 组的保护作用相对较弱。神经元计数分析(图 3.16B)进一步验证了 HE 染色的结果显示,tMCAO 诱导后,Young 组和 Aged 组的神经元数量均显著下降( $P < 0.001$ );PD-L1 mAb 处理后,Young 组的神经元存活率显著提高,并在 Day7 和 Day14 进一步改善( $P < 0.001$ );Aged 组的神经元存活率亦有所提升( $P < 0.001$ ),但改善程度明显低于 Young 组( $P < 0.05$ )。Nissl 染色(图 3.17A)进一步评估了 PD-L1 mAb 对神经元功能性的保护作用,Sham 组中,Young 组和 Aged 组的神经元形态完整,Nissl 体密集;tMCAO 诱导后,Day3 时 Nissl 体明显减少,Day7 和 Day14 逐渐恢复,但仍可见神经元凋亡及损伤区域;PD-L1 mAb 处理后,Young-PD-L1 mAb 组在各时间点 Nissl 体数量显著高于未治疗组,而 Aged-PD-L1 mAb 组的保护作用相对较弱。Nissl 体计数分析(图 3.17B)结果显示,tMCAO 诱导后,Young 组和 Aged 组的 Nissl 体数量均显著减少( $P < 0.001$ );PD-L1 mAb 处理后,Young 组 Nissl 体存活率显著提高,并在 Day7 和 Day14 进一步改善( $P < 0.001$ );Aged 组在 PD-L1 mAb 处理后亦有所改善,但改善幅度低于 Young 组( $P < 0.001$ )。

这些结果表明,在 tMCAO 模型中,PD-L1 mAb 处理可有效减少神经元损伤,增加神经元存活率,并保护 Nissl 体完整性。Young 组的恢复速度和改善程度均

优于 Aged 组，提示其神经保护作用存在年龄差异性。

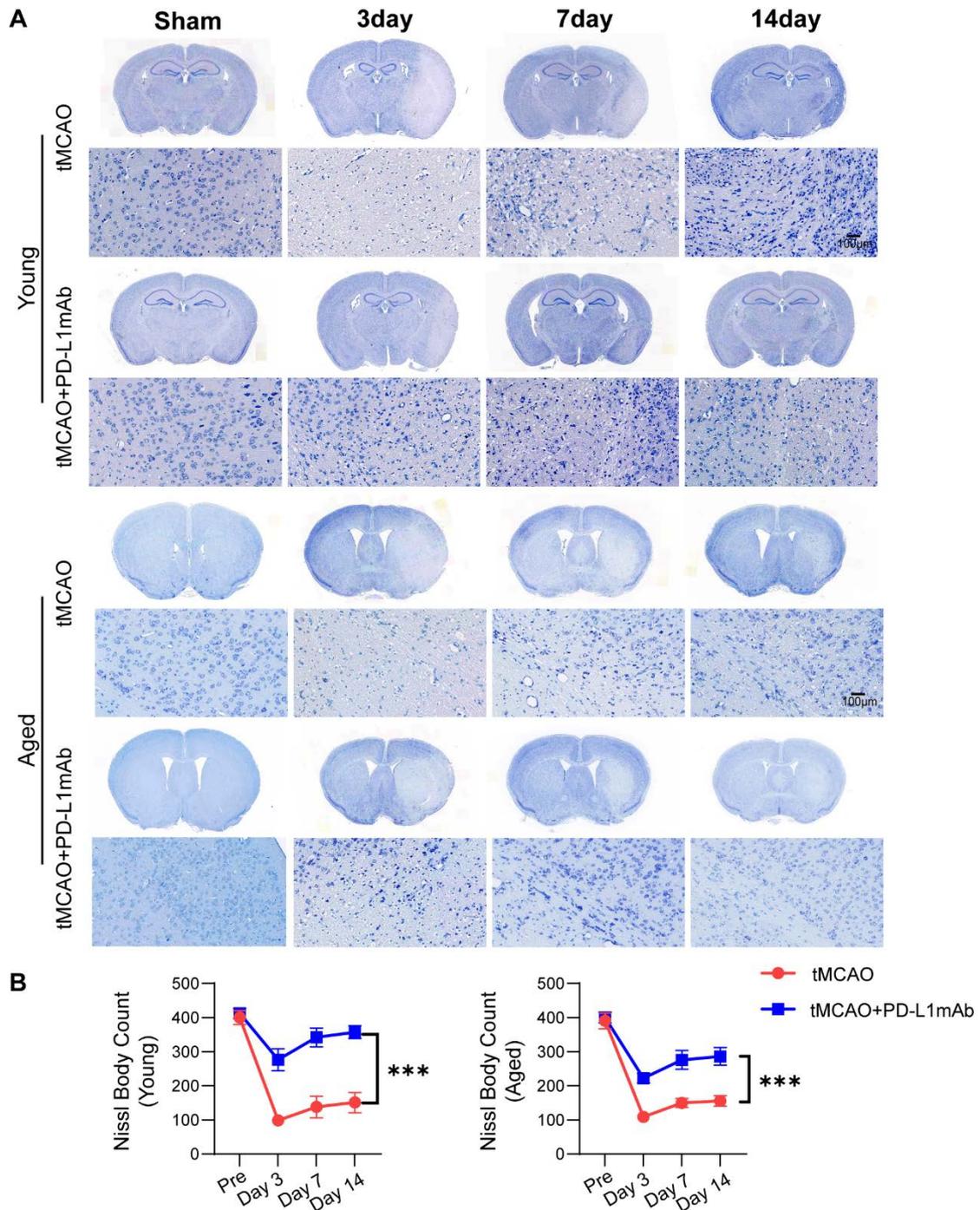


注：(A)H&E 染色显示在缺血性卒中后不同时点（第 3、7、14 天）年轻与老年小鼠大脑皮层神经细胞的形态变化。代表性切片展示 tMCAO 模型下，Sham 组、MCAO 组与 PD-L1 中和抗体（PD-L1 mAb）干预组的小鼠脑组织结构。(B)神经细胞计数结果统计。（均数±标准

差，n=6，\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 3.16 PD-L1mAb 在 tMCAO 模型中对不同年龄小鼠的神经保护作用

Fig. 3.16 PD-L1 mAb confers neuroprotection in young and aged mice after tMCAO



注：(A) 代表性 Nissl 染色图像显示 tMCAO 后第 3、7、14 天，不同年龄小鼠在梗死周围区域的 Nissl 小体变化。上行为低倍图，展示整体脑结构；下行为高倍图，聚焦梗死边缘区。缺血性卒中后 Nissl 小体显著减少，PD-L1 mAb 处理可维持其结构，提示具神经保护作用；

(B) 梗死周围区域 Nissl 小体的定量分析结果。（均数±标准差，n=6，\*\*\*P<0.001）

图 3.17 PD-L1 mAb 在 tMCAO 模型中保护不同年龄小鼠梗死周围 Nissl 小体

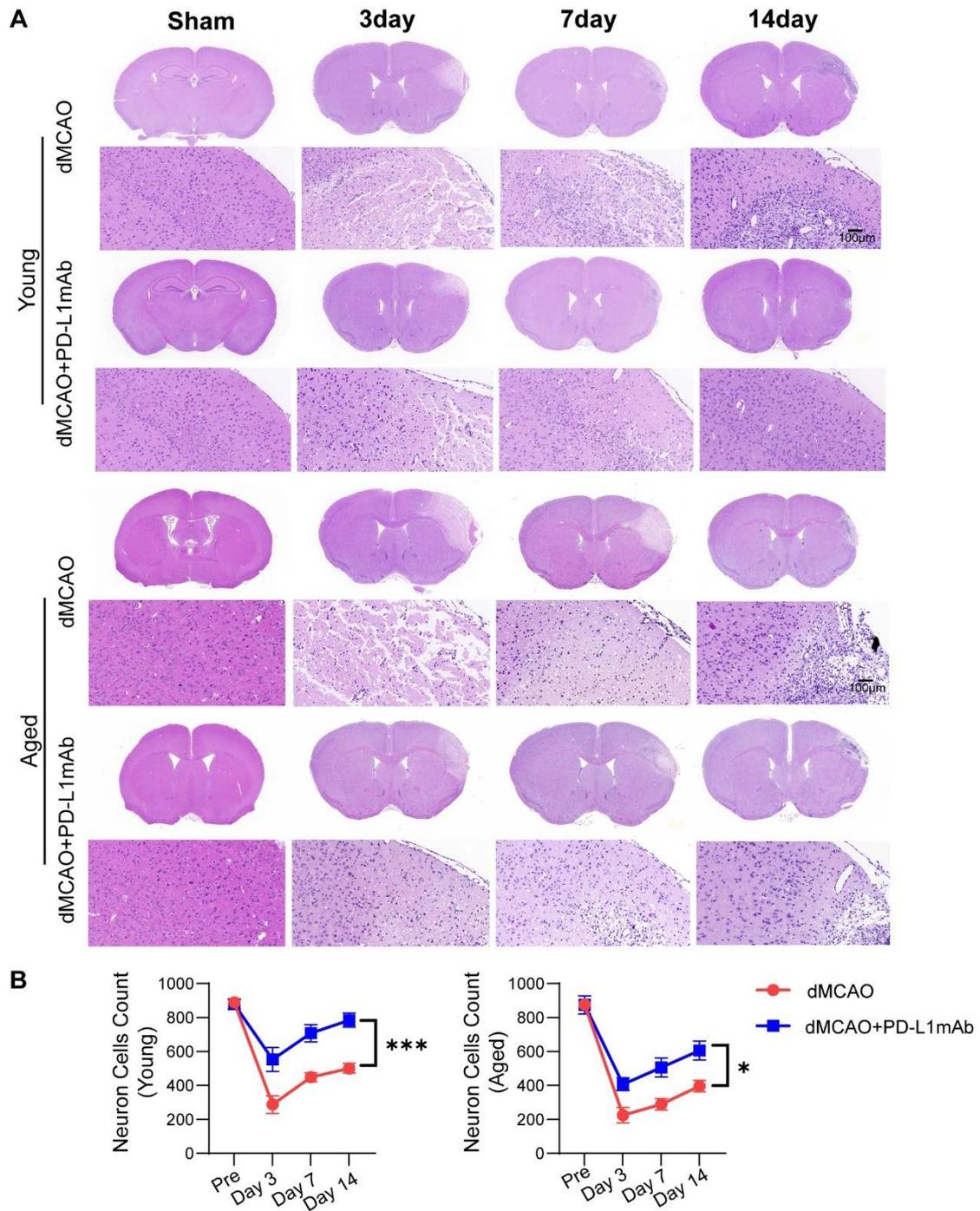
Fig. 3.17 PD-L1 mAb preserves peri-infarct Nissl bodies after tMCAO in young and aged

mice

## (2) PD-L1 mAb 在 dMCAO 模型中的神经元保护作用

在 dMCAO 模型中, PD-L1 mAb 处理同样显著减少了神经元损伤, 并在 Young 组和 Aged 组中均显示出一定的保护作用(图 3.18 和图 3.19)。HE 染色(图 3.18A)结果显示, Sham 组中, Young 组和 Aged 组的神经元形态完整, 未见明显损伤; dMCAO 诱导后, Day3 时神经元大量丢失, 脑组织坏死区域明显, Day7 和 Day14 逐渐恢复, 但仍可见坏死和凋亡细胞; PD-L1 mAb 处理后, Young 组和 Aged 组的神经元损伤均减少, Day3、Day7 和 Day14 各时间点均可见神经元存活较多。神经元计数分析(图 3.18B)进一步量化了 PD-L1 mAb 处理的保护作用, dMCAO 诱导后, Young 组和 Aged 组的神经元数量均显著下降( $P < 0.001$ ); PD-L1 mAb 处理后, Young 组的神经元存活率显著提高, 并在 Day7 和 Day14 进一步改善( $P < 0.001$ ); Aged 组神经元存活率亦有所提升( $P < 0.05$ ), 但改善幅度低于 Young 组。Nissl 染色(图 3.19A)进一步评估了 PD-L1 mAb 对神经元功能性的保护作用, Sham 组中, Young 和 Aged 组的神经元结构完整, Nissl 体丰富; dMCAO 诱导后, Day3 时 Nissl 体显著丢失, Day7 和 Day14 逐渐恢复, 但仍可见 Nissl 体减少和神经元损伤; PD-L1 mAb 处理后, 各时间点 Nissl 体密度均高于 dMCAO 组, 表明 PD-L1 mAb 具有保护 Nissl 体的作用。Nissl 体计数分析(图 3.19B)结果显示, dMCAO 诱导后, Young 组和 Aged 组的 Nissl 体数量均显著减少( $P < 0.001$ ); PD-L1 mAb 处理后, Young 组 Nissl 体存活率显著提高, 并在 Day7 和 Day14 进一步改善( $P < 0.001$ ); Aged 组在 PD-L1 mAb 处理后 Nissl 体保存率提高( $P < 0.001$ )。

这些结果表明, 在 dMCAO 模型中, PD-L1 mAb 处理能有效减少神经元损伤, 并在 Young 组和 Aged 组中均显示出神经保护作用。尽管 Young 组的恢复更快, 但与 tMCAO 模型不同, dMCAO 组的 PD-L1 mAb 保护作用在不同年龄组间的差异较小。

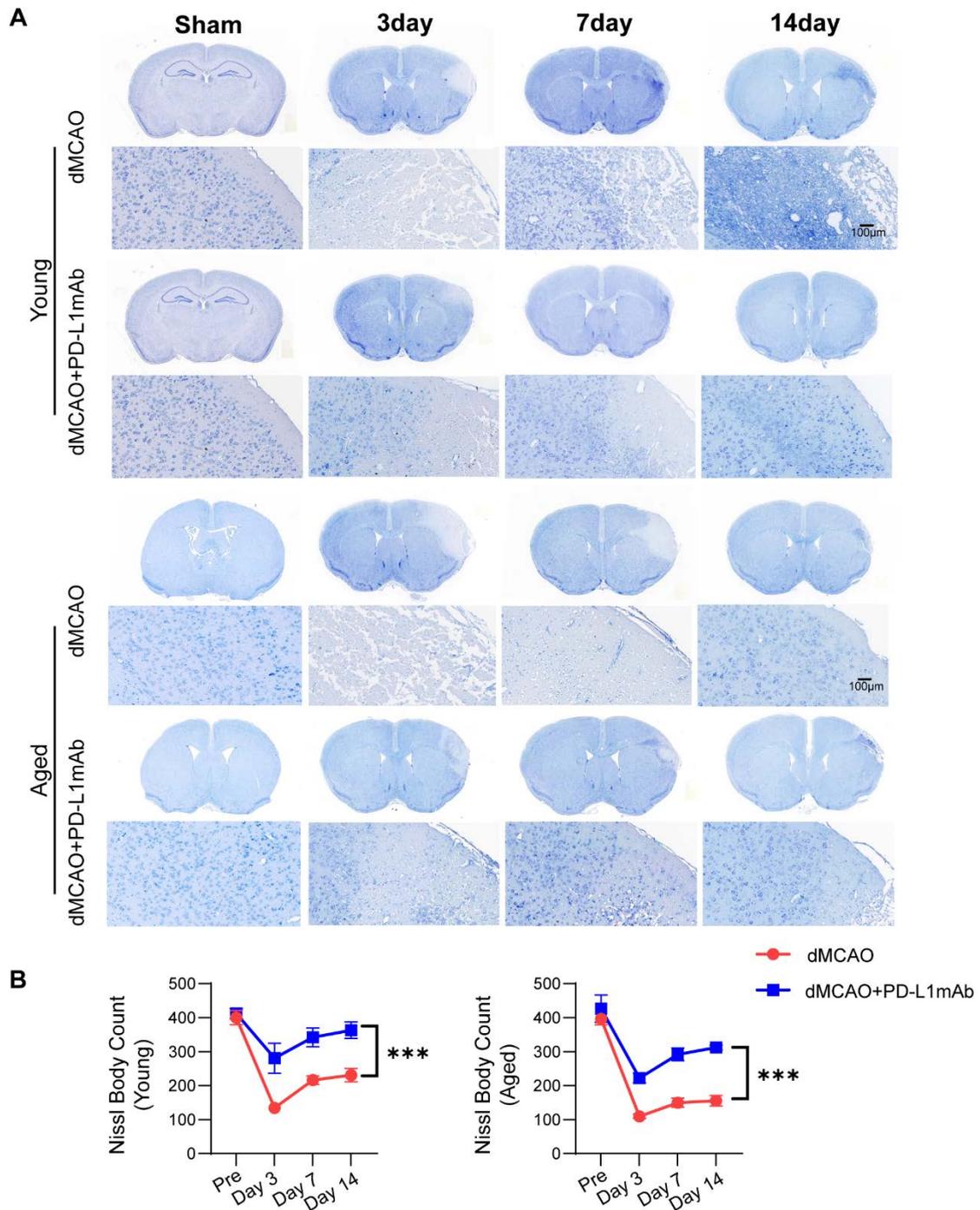


注：((A) H&E 染色代表图像显示 dMCAO 组与 PD-L1 mAb 干预组在不同时间点（第 3、7、14 天）年轻与老年小鼠脑组织的损伤情况。dMCAO 组可见明显神经元缺失及组织空泡，PD-L1 mAb 处理可显著缓解病理改变，年轻小鼠改善更为显著；(B) 梗死周围区域神经元计数的定量分析结果。（均数±标准差，n=6，\*  $P < 0.05$ ，\*\*\*  $P < 0.001$ ）

图 3.18 PD-L1 mAb 在 dMCAO 模型中减轻不同年龄小鼠梗死周围神经元损伤

Fig. 3.18 PD-L1 mAb reduces peri-infarct neuronal loss after dMCAO in young and aged

mice



注：(A)不同时间点(术后第3、7、14天)各组小鼠脑组织 Nissl 染色图像展示。可见，MCAO 模型诱导明显的 Nissl 小体丢失，而 PD-L1 中和抗体干预可在各时间点维持较多的 Nissl 小体结构，尤其在 Young 组更为明显。(B)梗死周围区域 Nissl 小体数量的定量分析统计。(均值±标准差，n=6，\*\*\* $P < 0.001$ )

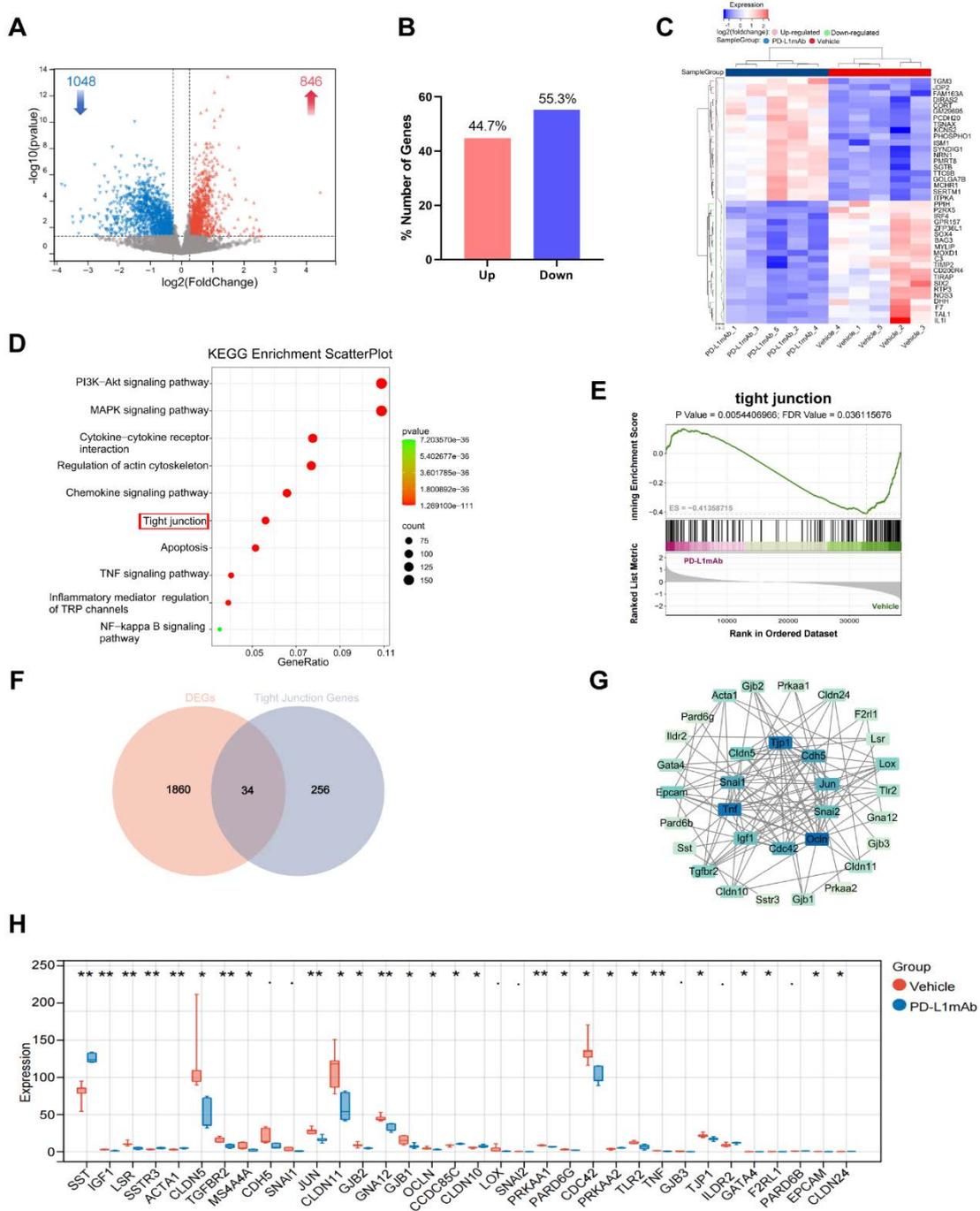
图 3.19 PD-L1 mAb 在 dMCAO 模型中保护不同年龄小鼠梗死周围 Nissl 小体  
 Fig. 3.19 PD-L1 mAb preserves peri-infarct Nissl bodies in young and aged mice after dMCAO

## 2.4 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后紧密连接相关基因及蛋白的年龄差异性调控作用

为了进一步探讨 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后不同年龄小鼠中产生治疗效果差异的机制，我们进行了转录组分析和血脑屏障（BBB）相关蛋白的检测，以阐明 PD-L1 mAb 对紧密连接（Tight Junction）相关通路的影响，并评估该作用是否具有年龄差异性。

### 2.4.1 PD-L1 mAb 调控缺血性卒中脑组织的转录组特征

为了探讨 PD-L1 mAb 在缺血性卒中脑组织中的转录调控作用，我们进行了 RNA 测序分析，并筛选可能受其影响的关键通路。火山图分析（图 3.20A）显示，与对照组相比，PD-L1 mAb 处理组存在显著的基因表达变化（846 个基因上调，1048 个基因下调， $P < 0.05$ ， $|\log_2FC| > 1.2$ ）。聚类热图（图 3.20C）表明 PD-L1 mAb 处理组的基因表达模式与对照组明显不同。KEGG 富集分析（图 3.20D）揭示，差异表达基因（DEGs）主要富集于 PI3K-Akt、MAPK、细胞因子-受体相互作用、炎症调控及紧密连接（Tight Junction）等信号通路，提示 PD-L1 mAb 可能通过这些通路发挥神经保护作用。值得注意的是，GSEA 分析（图 3.20E）进一步证实 Tight Junction 通路在 PD-L1 mAb 处理组中显著富集（ $P=0.0054$ ， $FDR=0.0361$ ），提示其在 PD-L1 mAb 介导的脑保护机制中具有关键作用。此外，韦恩图（图 3.20F）筛选出 34 个与 Tight Junction 相关的核心基因，PPI 网络分析（图 3.20G）进一步揭示 Jun、Cdh5、Snai1 和 Gna12 等基因为该通路的潜在关键调控因子。箱线图分析（图 3.20H）显示，多个 Tight Junction 相关基因在 PD-L1 mAb 处理后显著上调（ $P < 0.05$ ），进一步支持其在紧密连接结构保护中的作用。



注：(A)火山图展示 PD-L1 mAb 处理后相较于 Vehicle 组的差异表达基因 (DEGs)，共检测到上调基因 1048 个、下调基因 846 个 (筛选标准： $|\log_2FC| > 1$ ,  $P < 0.05$ )。 (B)柱状图展示 DEGs 中上调和下调基因的比例。 (C)热图展示 Top50 显著差异表达基因的聚类结果，可观察到 PD-L1 mAb 与 Vehicle 组之间基因表达模式的显著差异。 (D)KEGG 通路富集分析显示差异基因显著富集于多条免疫相关通路及“Tight junction” (紧密连接) 通路。 (E)GSEA 富集分析进一步证实紧密连接通路在 PD-L1 mAb 处理组中显著上调 ( $P=0.0054$ ,  $FDR=0.036$ )。

(F)Venn 图显示在差异表达基因与 Tight junction 数据库基因之间的交集, 共发现 34 个差异表达的 Tight junction 相关基因。(G)基于 STRING 数据库构建的 Tight junction 相关基因的蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络, 突出核心调控节点 (如 Cldn5、Ocln、Tjpl 等)。(H)差异 Tight junction 基因的表达情况 (boxplot 形式), 多数关键基因在 PD-L1 mAb 处理后表达显著上调 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

### 图 3.20 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后紧密连接 (Tight Junction) 相关基因的调控作用

#### Fig. 3.20 PD-L1 mAb regulates tight junction-related genes after ischemic stroke

#### 2.4.2 PD-L1 mAb 促进紧密连接蛋白表达并增强血脑屏障完整性的年龄差异

基于转录组分析, 为了进一步探讨 PD-L1 mAb 对血脑屏障完整性的调控作用及其年龄差异性, 我们用免疫荧光检测了紧密连接蛋白 Claudin-5 和 ZO-1 的表达水平(图 3.21, 图 3.22), Evans Blue 渗漏实验检测血脑屏障通透性(图 3.23A), 以及 Western blot 检测紧密连接蛋白的整体表达变化(图 3.23B, 图 3.24)。

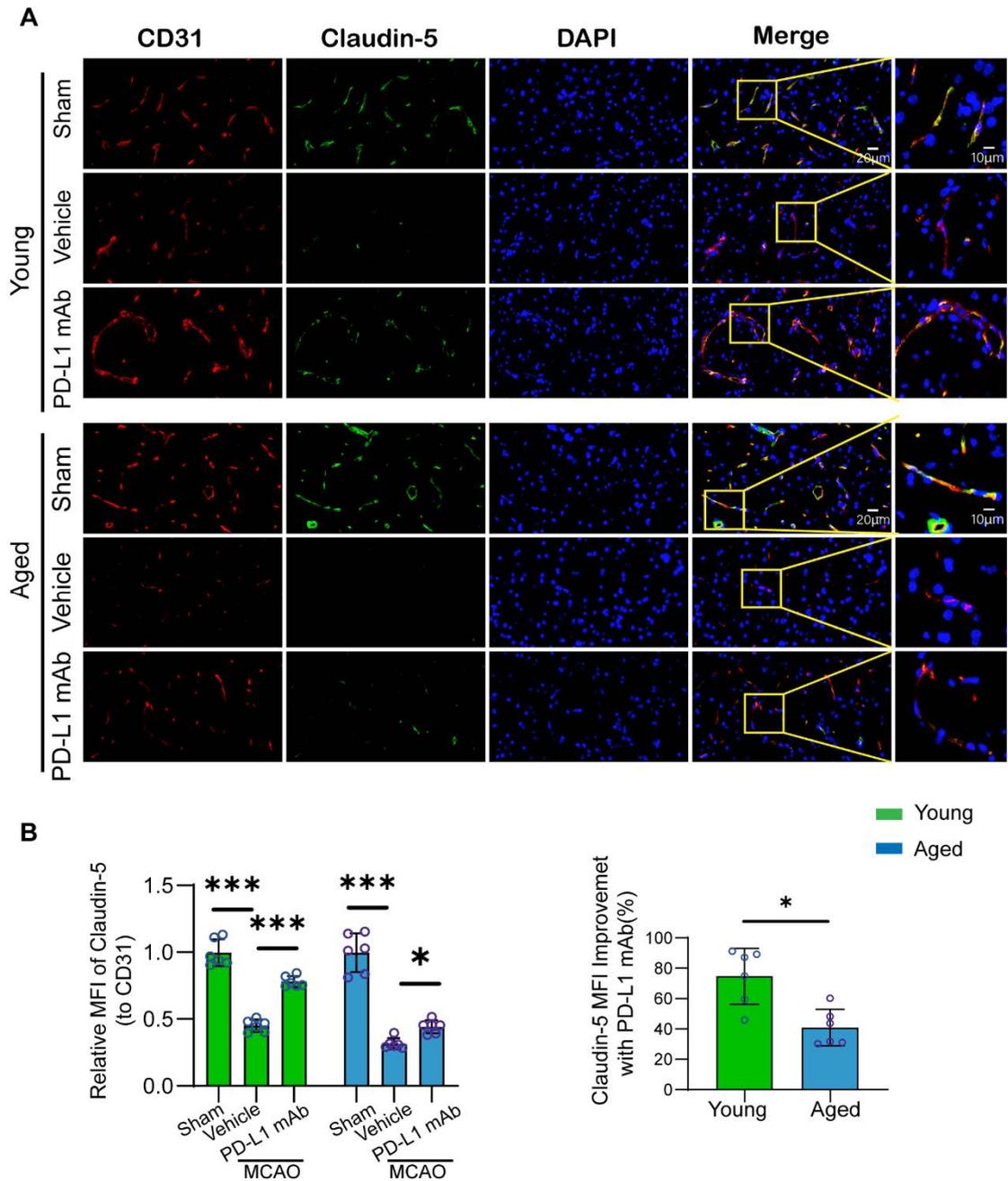
免疫荧光分析(图 3.21A)显示, Sham 组中 Claudin-5 在血管周围完整分布, 而 MCAO 诱导后, 其表达显著下降, 反映 BBB 受损。PD-L1 mAb 处理后, Claudin-5 表达有所恢复, 但 Young 组的改善显著优于 Aged 组。定量分析表明, PD-L1 mAb 处理显著提高 Claudin-5 水平 ( $P < 0.001$ ), Young 组的恢复效果优于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。ZO-1 表达变化趋势与 Claudin-5 相似(图 3.22)。免疫荧光分析(图 3.22A)显示, Sham 组中 ZO-1 在血管壁完整分布, 而 MCAO 诱导后表达下降。PD-L1 mAb 处理后, Young 组的 ZO-1 表达恢复接近正常, 而 Aged 组的改善较为有限, 表达水平仍低于 Young 组 ( $P < 0.05$ )。定量分析进一步证实, PD-L1 mAb 处理显著提高 ZO-1 表达 ( $P < 0.001$ ), Young 组的恢复程度显著优于 Aged 组。

为评估 PD-L1 mAb 是否能够通过降低血脑屏障 (BBB) 通透性以发挥保护作用, 我们进行了 Evans Blue (EB) 渗漏实验(图 3.23A), 结果显示, MCAO 诱导后, EB 渗漏显著增加 ( $P < 0.05$ ), 提示 BBB 受损; 而 PD-L1 mAb 处理可显著减少渗漏, 但 Young 组的改善程度显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。

Western blot 结果进一步验证了 PD-L1 mAb 对紧密连接蛋白的调控作用及其年龄依赖性(图 3.23B, 图 2.24)。MCAO 诱导后, 紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和 Claudin-5 的表达水平均显著降低 ( $P < 0.001$ ), 提示缺血性卒中损伤导致 BBB 结构完整性受损。PD-L1 mAb 处理后, 这些蛋白的表达均有所恢复, 但 Young

组的恢复程度显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。具体而言, Occludin 的表达在 PD-L1 mAb 处理后部分恢复, Young 组的改善幅度显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ ) (图 3.23B)。同时, ZO-1 和 Claudin-5 的 Western blot 结果 (图 3.24) 进一步支持这一趋势, Young 组的两种蛋白恢复水平显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。定量分析 (图 3.24B) 显示, PD-L1 mAb 处理后, Young 组 Claudin-5 的恢复程度明显高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ ), 表明老年个体在 PD-L1 mAb 介导的 BBB 保护过程中恢复能力较弱。

综上, PD-L1 mAb 通过增强紧密连接蛋白表达、降低 BBB 通透性发挥保护作用, 并表现出显著的年龄差异性, Young 组的修复效果优于 Aged 组。

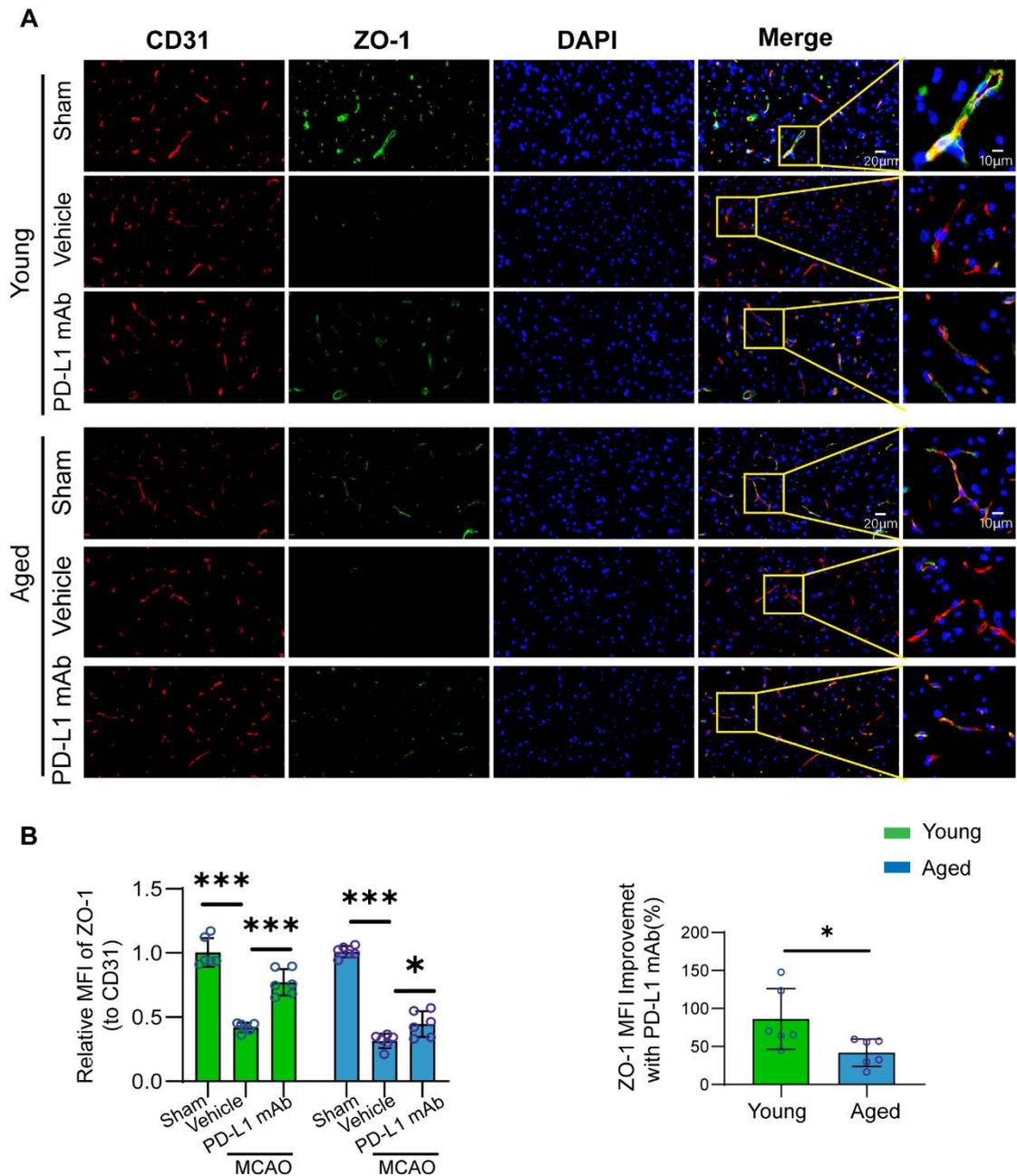


注: (A) 免疫荧光共染显示, PD-L1 mAb 处理后, Young 与 Aged 小鼠脑组织中 Claudin-5(绿)与血管标志 CD31(红)共表达增强。DAPI(蓝)标记细胞核,黄箭头指示血管区域 Claudin-5 信号,放大图示代表性共定位。比例尺:大图 20  $\mu\text{m}$ ,放大图 10  $\mu\text{m}$ 。(B) 左图为 Claudin-5 在 CD31<sup>+</sup>区域的平均荧光强度(MFI)定量,右图为 PD-L1 mAb 较 Vehicle 组的改善幅度(%)。

(均数 $\pm$ 标准差, n=6, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001)

图 3.21 PD-L1 mAb 增强缺血性卒中小鼠脑血管紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达

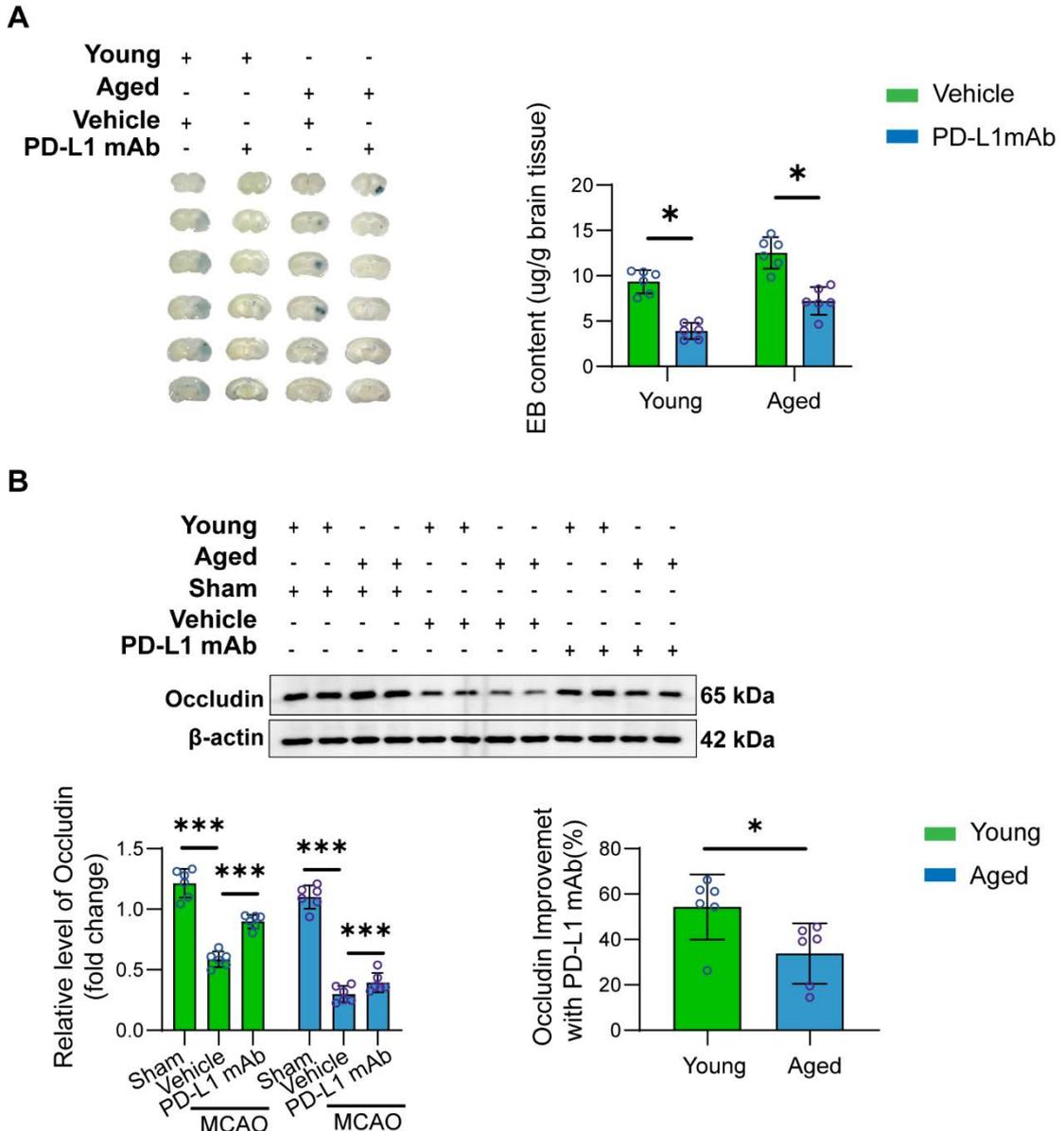
Fig. 3.21 PD-L1 mAb enhances Claudin-5 expression in cerebral vasculature after ischemic stroke



注：(A)免疫荧光共染图像显示 ZO-1（绿色）与内皮细胞标志物 CD31（红色）在小鼠脑血管中的共定位。PD-L1 mAb 处理后，Young 和 Aged 组 Claudin-5 表达均有增强。DAPI（蓝色）标记细胞核，放大图展示典型血管结构中的 ZO-1 表达情况。比例尺：大图 20  $\mu\text{m}$ ，放大图 10  $\mu\text{m}$ 。(B)左图：ZO-1 在 CD31<sup>+</sup>区域的平均荧光强度 (MFI) 定量分析；右图：PD-L1 mAb 处理组相较于 Vehicle 组的改善幅度(%)。(均数 $\pm$ 标准差,  $n=6$ , \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

图 3.22 PD-L1 mAb 增强缺血性卒中小鼠脑血管紧密连接蛋白 ZO-1 的表达

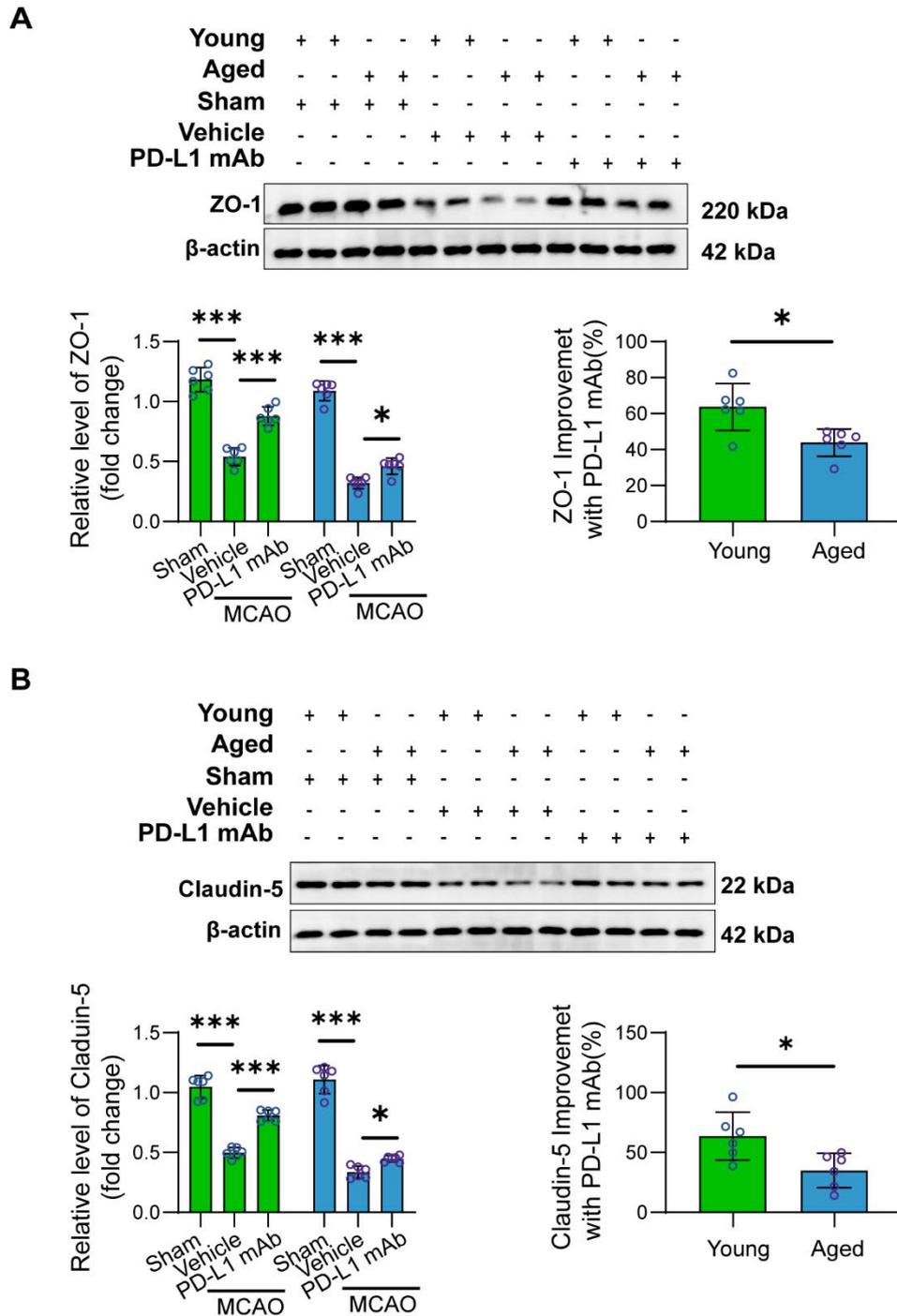
Fig. 3.22 PD-L1 mAb enhances ZO-1 expression in cerebral vasculature after ischemic stroke



注：(A)采用伊文氏蓝（EB）渗漏实验评估血脑屏障（BBB）通透性变化。左图的大脑冠状切片代表性图像，蓝色染色情况反映 EB 渗漏程度；右图 EB 在脑组织中含量的定量分析。结果显示，缺血性卒中后 BBB 通透性显著升高，PD-L1 mAb 处理显著降低 EB 渗漏水平，其中 Young 组改善更为明显。(B)Western blot 分析脑组织中紧密连接蛋白 Occludin 的表达水平。左图蛋白条带及其定量分析结果，右图 PD-L1 mAb 相较 Vehicle 组对 Occludin 表达的提升幅度。结果显示，缺血性卒中后 Occludin 表达显著下降，PD-L1 mAb 处理可有效恢复其表达，且在 Young 组中改善幅度更大。(均数±标准差, n=6, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001)

图 3.23 PD-L1 mAb 减轻缺血性卒中引起的血脑屏障破坏并增强 Occludin 蛋白表达

Fig. 3.23 PD-L1 mAb attenuates ischemic stroke-induced BBB disruption and enhances Occludin expression



注：(A) Western blot 检测脑组织中 ZO-1 蛋白表达。左图为代表性条带图及其定量分析，显示缺血性卒中后 ZO-1 表达在青年与老年小鼠中均显著下降，PD-L1 mAb 可显著恢复表达；右图为相对改善率分析，提示青年小鼠改善幅度更高；(B) Western blot 检测 Claudin-5 蛋白表达。左图显示 PD-L1 mAb 显著提升缺血性卒中后 Claudin-5 水平，青年组改善更为显著；右图为改善率分析。（均数±标准差，n=6，\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 3.24 PD-L1 mAb 增强缺血性卒中后紧密连接蛋白 ZO-1 和 Claudin-5 的表达

Fig. 3.24 PD-L1 mAb enhances expression of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 after ischemic stroke

## 2.5 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后外周免疫及促炎因子的年龄差异性影响

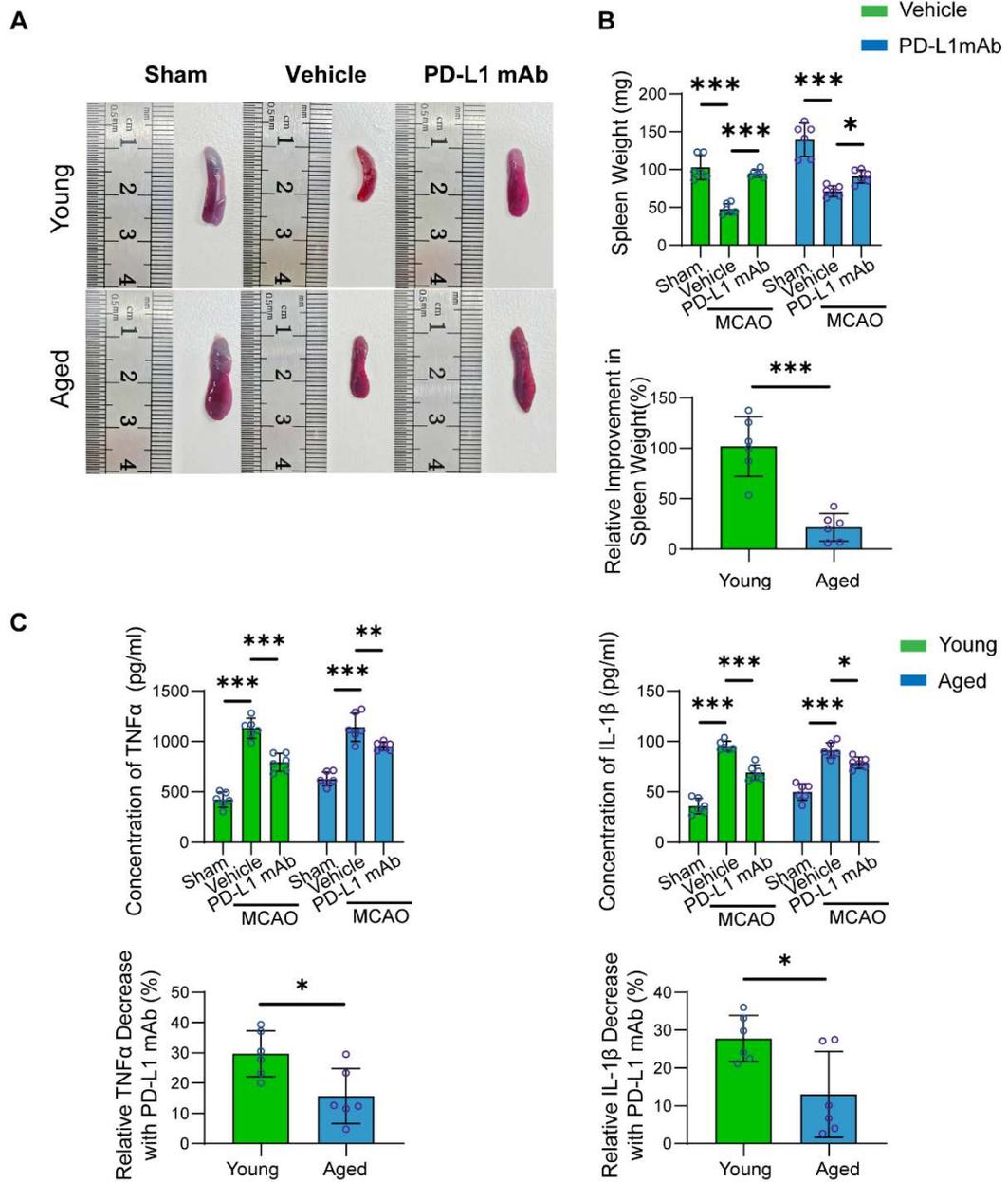
基于前面转录组测序结果显示差异表达基因 (DEGs) 主要富集于炎症、免疫反应和细胞凋亡。因此, 我们进一步研究 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后对外周免疫、促炎因子及细胞凋亡的年龄差异性调节作用。

### 2.5.1 PD-L1 mAb 减少缺血性卒中后脾脏萎缩

为了评估 PD-L1 mAb 对脾脏萎缩的作用, 我们首先检测了 MCAO 后脾脏重量的变化 (图 3.25A)。结果显示, 与 Sham 组相比, MCAO 诱导后的脾脏显著萎缩。然而, PD-L1 mAb 处理显著改善了脾脏萎缩情况。进一步的定量分析 (图 3.25B) 表明, PD-L1 mAb 处理显著增加了脾脏的重量 ( $P < 0.001$ ), 且 Young 组的脾脏恢复程度明显优于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。这一结果表明, PD-L1 mAb 能有效缓解缺血性卒中后的脾脏萎缩, 尤其在年轻小鼠中效果更为显著, 可能与免疫系统衰老的差异有关。

### 2.5.2 PD-L1 mAb 降低缺血性卒中后促炎因子的表达

为了进一步评估 PD-L1 mAb 的抗炎作用, 我们利用 ELISA 检测了血清中促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平 (图 3.25C)。结果显示, MCAO 后 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 而 PD-L1 mAb 显著降低了这两种促炎因子的表达 ( $P < 0.001$ )。特别地, Young 组的促炎因子下降幅度显著高于 Aged 组 ( $P < 0.05$ )。这一现象可能与免疫衰老相关, 暗示老年小鼠在 PD-L1 mAb 介导的抗炎作用上可能存在一定的减弱。因此, 年龄因素可能影响 PD-L1 mAb 的免疫调节效果。



注：(A)不同年龄小鼠缺血性卒中后脾脏外观图像展示。Sham 组脾脏大小正常，MCAO+Vehicle 组脾脏明显萎缩，PD-L1 mAb 处理后脾脏体积恢复明显。(B)上图：脾脏重量定量分析，结果显示 PD-L1 mAb 处理显著逆转缺血性卒中后脾脏萎缩；下图：脾脏重量改善率比较，青年组的恢复效果显著高于老年组。(C)上排图：血清中 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  浓度分析，缺血性卒中后显著升高，PD-L1 mAb 显著抑制炎症因子释放；下排图：炎症因子下降幅度计算结果显示，青年组在 PD-L1 mAb 下的炎症改善幅度高于老年组。（均数 $\pm$ 标准差， $n=6$ ，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 3.25 PD-L1 mAb 对不同年龄小鼠缺血性卒中后脾脏变化及炎症因子释放的调控作用

Fig. 3.25 PD-L1 mAb mitigates post-ischemic stroke splenic atrophy and pro-inflammatory

### cytokine Levels

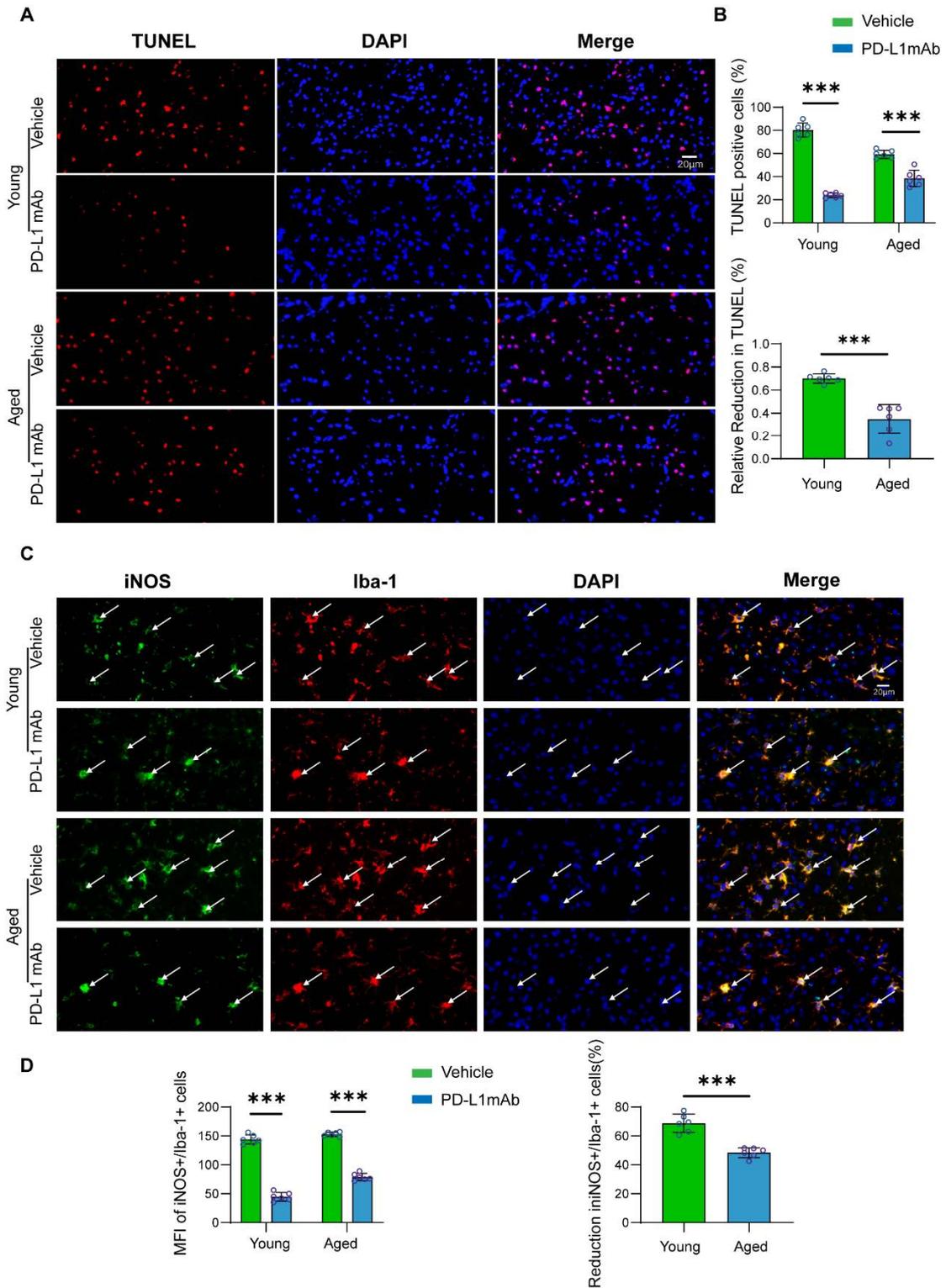
#### 2.5.3 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后细胞凋亡的抑制作用

进一步地，我们研究了 PD-L1 mAb 在缺血性卒中后对细胞凋亡的作用。通过 TUNEL 染色检测脑组织中的细胞凋亡（图 3.26A），结果显示，MCAO 后，Young 和 Aged 组的小鼠脑组织中 TUNEL<sup>+</sup>细胞数量显著增加，表明细胞凋亡显著上升。PD-L1 mAb 处理后，TUNEL<sup>+</sup>细胞数量明显减少，显示其在抑制细胞凋亡方面具有保护作用。定量分析（图 3.26B）进一步证实，PD-L1 mAb 显著降低了 Young 和 Aged 组中的 TUNEL<sup>+</sup>细胞比例，且 Young 组的改善效果显著优于 Aged 组（ $P < 0.001$ ）。这些结果表明，PD-L1 mAb 在减少缺血性卒中后细胞凋亡方面展现了强大的细胞保护作用，尤其在年轻小鼠中效果更加显著。

#### 2.5.4 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后巨噬细胞激活的抑制作用

通过 iNOS 和 Iba-1 共染技术，我们进一步检测了 M1 型巨噬细胞的激活情况（图 3.26C）。MCAO 后，Young 和 Aged 组中 iNOS<sup>+</sup> Iba-1<sup>+</sup>巨噬细胞数量显著增加，表明 M1 型巨噬细胞被激活。PD-L1 mAb 治疗后，促炎性 M1 型巨噬细胞的激活显著减少，且这一效果在 Young 组中尤为显著。定量分析（图 3.26D）表明，PD-L1 mAb 显著降低了 Young 和 Aged 组中 iNOS<sup>+</sup> Iba-1<sup>+</sup>细胞的 MFI（平均荧光强度）（ $P < 0.001$ ），且 Young 组的改善幅度显著高于 Aged 组（ $P < 0.001$ ）。这些数据表明，PD-L1 mAb 有效地抑制了巨噬细胞的促炎激活，尤其在年轻小鼠中，其抗炎效果更加明显。

这些结果表明，PD-L1 mAb 在缺血性卒中后的免疫调节中发挥了显著作用，特别是，在年轻小鼠中，PD-L1 mAb 的免疫调节效果显著优于老年小鼠，这可能与免疫衰老引起的免疫反应差异有关。老年小鼠对 PD-L1 mAb 治疗的反应较弱，提示免疫衰老可能在一定程度上限制了其治疗效果。总体而言，这些发现为开发针对不同年龄段患者的缺血性卒中治疗方案提供了新的见解和理论支持。



注: (A) TUNEL 染色显示青年与老年小鼠在梗死周围区域的神经元凋亡情况(红色为 TUNEL 阳性, 蓝色为 DAPI 标记核; 比例尺: 20  $\mu$ m); (B) TUNEL 阳性细胞的定量分析及 PD-L1 mAb 干预后的相对减少百分比; (C) 免疫荧光染色显示梗死周围区域中促炎标志物 iNOS (绿) 与巨噬细胞标志物 Iba-1 (红) 的共表达, 白色箭头指示 iNOS<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>双阳性细胞 (DAPI 标记核, 蓝色; 比例尺: 20  $\mu$ m); (D) iNOS<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>巨噬细胞的平均荧光强度 (MFI) 及其相对

降低百分比。(均数±标准差, n=6。 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

图 3.26 PD-L1 mAb 减轻缺血性卒中后不同年龄小鼠的神经元凋亡与促炎性巨噬细胞活化

Fig. 3.26 PD-L1 mAb attenuates neuronal apoptosis and proinflammatory macrophage activation after ischemic stroke in young and aged mice

### 3 讨论

#### 3.1 缺血性卒中后 MoDM 中 PD-L1 表达的动态变化及意义

缺血性卒中不仅引发局部脑组织的缺血损伤,还会激活系统性免疫反应,进而深刻影响疾病进程。近年来,单核细胞来源巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MoDM)因其在缺血性卒中后扮演的双重角色——既可促进炎症反应导致继发性神经损伤,也能在修复阶段参与组织重建——而受到广泛关注<sup>[23]</sup>。MoDM 在缺血性卒中早期迅速浸润缺血脑区,并在局部微环境的影响下活化为促炎的 M1 型或抗炎的 M2 型表型,其活化方向在很大程度上决定了缺血性卒中后的神经炎症状态与组织修复结局<sup>[23]</sup>。然而,MoDM 活化的分子调控机制仍不完全明确,尤其是免疫检查点分子 PD-L1 在其中的功能尚待深入阐明。

本研究发现,缺血性卒中显著诱导 PD-L1 在脑组织中上调,尤其在 Iba-1<sup>+</sup> 的巨噬细胞中表达增强。传统观点认为,PD-L1 主要通过 PD-1 结合调控 T 细胞功能,限制免疫反应的持续性和强度<sup>[84]</sup>。然而,越来越多的证据提示,PD-L1 亦可在 T 细胞非依赖的机制中直接调控髓系细胞的功能状态。已有研究显示,PD-L1 可促进巨噬细胞向 M1 型活化,增强其促炎基因表达<sup>[85]</sup>,而其缺失或阻断则可抑制 M1 型相关基因,增强 M2 型表型,从而减轻组织炎症<sup>[86]</sup>。本研究在缺血性卒中模型中进一步证实,PD-L1 的上调与 MoDM 中 M1 型标志物(如 iNOS、TNF- $\alpha$ )的表达增强以及 M2 型标志物(如 IL-10、Arg1)的下调相伴,提示 PD-L1 在缺血性卒中后通过促进 MoDM 向促炎方向活化,可能加剧局部炎症反应并阻碍组织修复。

MoDM 活化过程高度依赖缺血性卒中后微环境中的炎症信号,如 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等已被证实可促进其向 M1 型偏移<sup>[23]</sup>。作为炎症反应中的调控因子,PD-L1 可能在这一信号轴中发挥协同或放大作用。尽管既往研究多聚焦于 PD-L1 调控 T 细胞功能的免疫抑制作用<sup>[87]</sup>,本研究则进一步拓展了其在先天免疫系统中的功能

维度,表明 PD-L1 也可直接影响 MoDM 的功能命运,并通过调节其活化方向进而调控缺血性卒中后炎症进展。

综上所述,本研究揭示了 PD-L1 在缺血性卒中后单核来源巨噬细胞中的促炎作用,提示其不仅是 T 细胞调控的关键分子,也可能是介导先天免疫细胞功能重编程的重要调节因子。这一发现丰富了我们对缺血性卒中后巨噬细胞炎症调控机制的理解,并为 PD-L1 作为缺血性卒中免疫干预靶点提供了新的理论支持。

### 3.2 PD-L1 mAb 对缺血性卒中神经保护作用的年龄差异

在前面明确缺血性卒中后 PD-L1 于 MoDM 中表达显著上调的基础上,我们进一步探讨了其免疫干预的治疗潜力及年龄相关性。本研究发现,缺血性卒中急性期内,年轻小鼠脑组织中 PD-L1 表达水平明显高于老年小鼠,尤其集中于浸润性单核来源巨噬细胞。这一差异提示 PD-L1 介导的免疫调节能力具有年龄差异性,年轻个体可能具备更强的免疫适应反应。随后通过 PD-L1 中和抗体(PD-L1 mAb)干预实验,我们发现该治疗在不同年龄组均展现出一定的神经保护作用,但在年轻小鼠中效果更为显著,包括更大幅度的梗死体积减少、更快的运动功能恢复以及血脑屏障结构的显著改善;而在老年小鼠中,虽然亦观察到一定程度的缓解,但整体治疗效应明显减弱。

PD-L1 mAb 所诱导的保护作用不仅表现在形态学改善上,还伴随多维度功能指标的改善:神经凋亡(TUNEL)减少,促炎巨噬细胞(iNOS<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>)活化水平降低,外周炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )释放减少,以及血脑屏障紧密连接蛋白(ZO-1、Claudin-5、Occludin)表达增强。这些变化在年轻个体中更为显著,提示其神经保护效应可能依赖于更为高效的免疫调节与血管修复能力。

与本研究一致,已有多项研究报道老年小鼠在缺血性卒中模型中虽然梗死体积相对较小,但神经功能障碍却更为严重<sup>[88-91]</sup>。这种结构与功能的不一致可能源于以下多种机制:一方面,老年个体可能因侧支循环发育较好而限制了梗死区扩展<sup>[88]</sup>;另一方面,其大脑基础代谢水平降低,也可能在急性期减轻部分损伤<sup>[92]</sup>。但这类“结构保护”并未带来功能获益,老年缺血性卒中小鼠常表现出炎症反应放大、BBB 持续性损伤与神经可塑性下降等特点<sup>[88, 89, 93]</sup>,这些因素可能限制了其对免疫治疗的响应。此外,衰老过程还伴随着神经网络的结构破坏与突触功能的下降,进一步降低了其对损伤的代偿能力<sup>[94]</sup>。

已有研究指出, PD-L1 信号轴在缺血性卒中后的免疫调节中起关键作用, 不仅可通过 PD-1 通路限制过度激活的 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应, 缓解继发性损伤<sup>[32, 95]</sup>, 亦能促进巨噬细胞向抗炎表型转化, 助力炎症缓解与组织修复<sup>[95]</sup>。而年轻个体更强的神经可塑性与血管重建能力<sup>[40, 96]</sup>, 可能增强了对 PD-L1 阻断的应答。相比之下, 老年个体免疫功能失调和慢性低度炎症状态 (inflamm-aging) 可能限制了 PD-L1 阻断的免疫调节潜力。

综上, PD-L1 mAb 在缺血性卒中免疫治疗中展现出显著的年龄差异性, 其治疗效果受到机体免疫状态与修复能力的共同影响。未来缺血性卒中干预策略应充分考虑年龄差异, 探索适用于老年个体的联合调控方案, 以提升临床转化的可行性。

### 3.3 PD-L1 mAb 介导免疫调节与血管保护作用的机制探索

基于 PD-L1 阻断在缺血性卒中模型中展现出的年龄相关治疗差异, 我们进一步探讨其潜在机制。本研究显示, PD-L1 表达在缺血性卒中后并非均质上调, 而在年轻小鼠脑组织中, 尤其是 MoDM 细胞中表达水平显著高于老年组, 提示年轻个体在免疫调节响应上具有更强的活性基础。这一差异可能解释了 PD-L1 mAb 在年轻缺血性卒中小鼠中表现出更强神经保护效果的现象。

功能性实验支持该观点: PD-L1 mAb 处理显著减少梗死体积, 改善神经功能, 同时抑制中枢和外周促炎反应, 增强血脑屏障结构蛋白的表达。这一过程中, PD-L1 阻断可能通过抑制 MoDM 向 M1 型活化倾向、增强 M2 相关修复信号, 协同改善局部神经炎症与血管通透性, 从而缓解组织损伤并促进功能恢复。上述效应在年轻小鼠中更为突出, 提示 PD-L1 mAb 可能通过调控 MoDM 的活化状态, 促进抗炎修复型 M2 表型形成, 从而在免疫稳态与血管功能维持中协同发挥作用。

然而, 在老年小鼠中, 尽管 PD-L1 表达亦有所上调, 但治疗效果明显减弱。该差异可能源于衰老过程中免疫系统及血管修复能力的整体退化。已有研究指出, 衰老伴随的“慢性低度炎症状态” (inflamm-aging) 使机体长期处于促炎环境, 削弱了对外源性免疫干预的动态调节能力, 同时导致炎症分辨能力下降<sup>[97, 98]</sup>。此外, 老年个体的血管内皮细胞再生能力和紧密连接蛋白表达本就受限, 从而进一步影响 PD-L1 阻断在血脑屏障修复方面的疗效<sup>[94]</sup>。虽然老年小鼠缺血性卒中后的梗死体积相对较小, 但神经功能恢复能力更差, 可能反映出神经可塑性不足、修复

信号微弱以及炎症持久性等多重因素的协同作用。

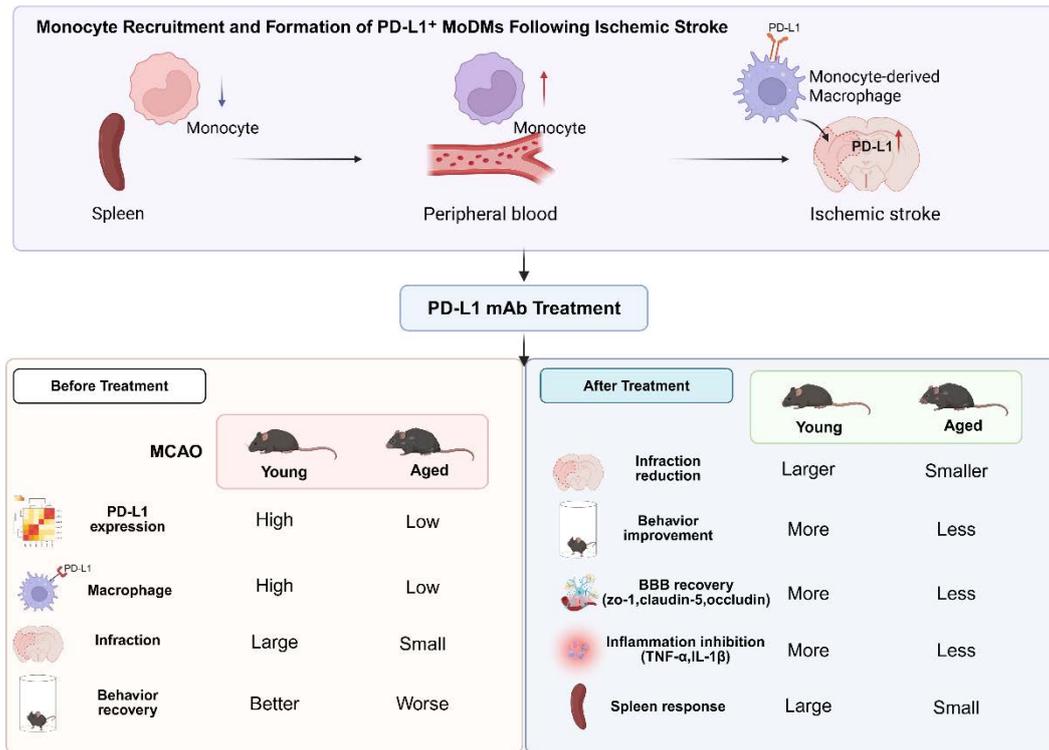
综上所述，PD-L1 mAb 的治疗效果不仅受缺血性卒中后免疫激活程度的调控，还受到个体免疫适应能力与血管修复潜能共同制约。本研究强调，年龄是影响免疫检查点阻断疗效的重要因素之一，未来的缺血性卒中免疫治疗策略需结合年龄相关的生理基础特征，探索更具个体化和精准性的干预路径。特别是在老年人群中，或需联合应用促进炎症分辨、增强血管再生或改善神经可塑性的治疗手段，以协同提升 PD-L1 阻断疗法的效果并拓展其临床适应性。

## 4. 结论

**4.1** 缺血性卒中后 PD-L1 表达显著上调，主要分布于单核来源巨噬细胞(MoDM)，其表达及功能调节在不同年龄阶段存在差异。

**4.2** PD-L1 中和抗体可通过调控巨噬细胞活化、抑制炎症反应及增强血脑屏障紧密连接蛋白表达，有效减轻脑组织损伤并改善神经功能，且在年轻个体中疗效更为显著。

**4.3** 衰老削弱了机体对 PD-L1 介导免疫调节和神经保护的响应，提示缺血性卒中免疫治疗策略应充分考虑年龄因素，并探索针对老年个体的联合干预方案以提升治疗效果。



注：缺血性卒中诱导外周单核细胞募集并向脑组织迁移，在局部分化为表达 PD-L1 的单核来源巨噬细胞 (MoDM)，其数量及 PD-L1 表达水平在年轻小鼠中高于老年小鼠。PD-L1 mAb 可通过调节 MoDM 活性，抑制炎症因子（如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ）表达，增强血脑屏障结构蛋白（ZO-1、Claudin-5、Occludin）表达，从而减轻脑损伤并改善神经行为表现。该治疗在年轻个体中效果更显著，提示衰老削弱了 PD-L1 介导的免疫调控能力，缺血性卒中免疫干预策略需充分考虑年龄相关差异。

图 3.27 PD-L1 调控单核来源巨噬细胞功能介导缺血性卒中后神经保护的作用研究

Fig. 3.27 PD-L1-mediated modulation of MoDM function contributes to neuroprotection after ischemic stroke

## 第四部分 PD-L1 通过单核来源巨噬细胞介导缺血性卒中后免疫调控与神经保护的作用及机制研究

### 前言

在本研究前两部分中,我们系统揭示了缺血性卒中患者外周免疫系统的动态变化,发现 PD-L1 在髓系细胞中显著上调,且与缺血性卒中严重程度密切相关。进一步的动物实验表明,PD-L1 阻断治疗可显著减轻神经损伤、恢复神经功能、改善炎症环境并保护血脑屏障结构,其中年轻个体的疗效尤为显著。然而,PD-L1 介导的神经保护效应是否依赖于特定免疫细胞,尤其是缺血性卒中后主要浸润脑组织的单核来源巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MoDM),仍缺乏直接证据,成为理解其作用机制的关键环节。

MoDM 是缺血性卒中后最早浸润缺血脑组织的外周免疫细胞群体之一,具有显著的可塑性,可在微环境信号驱动下向 M1 促炎型或 M2 修复型活化,并通过分泌细胞因子调节中枢炎症、组织损伤与修复过程<sup>[23]</sup>。已有研究表明,MoDM 在缺血性卒中后可释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等促进炎症扩散,也可通过分泌 IL-10、TGF- $\beta$ 促进炎症分辨<sup>[23]</sup>。因此,其活化状态在缺血性卒中病理过程中发挥双向调控作用。

近年来,PD-L1 作为免疫检查点分子,其在髓系细胞中的功能逐渐受到关注。有研究指出,PD-L1 的表达不仅调节 T 细胞活性,也可能直接影响巨噬细胞的活化状态与功能<sup>[99]</sup>。在炎症性疾病模型中,PD-L1 上调被发现可增强巨噬细胞 M1 活化倾向,而 PD-L1 缺失或阻断则可促进 M2 型转化、减轻局部炎症<sup>[100, 101]</sup>。尽管 PD-L1 在缺血性卒中模型中也表现出上调趋势,尤其富集于 CD11b<sup>+</sup>髓系细胞群体,但是否主要来源于 MoDM,以及其神经保护效应是否依赖 MoDM 的参与,目前尚不明确。

在前述研究中,我们证实了 PD-L1 可调控 MoDM 的功能状态并在缺血性卒中后发挥神经保护作用。然而,尚不明确该保护作用是否确由 MoDM 介导,以及其在调控免疫微环境中的具体机制。因此,本部分进一步聚焦于 MoDM 在 PD-L1 介导免疫调控中的关键角色,系统评估其对缺血性卒中后炎症反应与神经保护的调节效应及机制基础。

为探讨 PD-L1 是否通过 MoDM 介导缺血性卒中后的免疫调控作用，本研究引入氯膦酸脂质体（Clodronate Liposomes, Clo-Lip）选择性清除 MoDM<sup>[102]</sup>。该方法已广泛应用于炎症、肿瘤与神经系统疾病研究中，具有良好的时效性和细胞特异性<sup>[103]</sup>。Clo-Lip 被 MoDM 摄取后可诱导其选择性凋亡，从而实现缺血性卒中后 MoDM 的短期清除。此前研究利用 Clo-Lip 证实单核细胞在脑组织损伤、炎症调控和功能恢复中的关键作用<sup>[104, 105]</sup>，但尚未将其与免疫检查点治疗策略结合，系统评估 PD-L1 作用机制的细胞依赖性。

基于前期研究发现 PD-L1 在缺血性卒中后 MoDM 中表达显著上调，且其阻断可产生神经保护作用，本研究进一步探讨 PD-L1 是否通过 MoDM 发挥免疫调控效应及其潜在机制。通过构建 MoDM 缺失模型并联合 PD-L1 中和抗体干预，系统评估 MoDM 是否为 PD-L1 介导神经保护与炎症调节的重要效应细胞。动物实验采用 Clo-Lip 选择性清除 MoDM，并结合行为学、组织学、流式细胞术及转录组学等手段，分析 MoDM 清除对 PD-L1 介导的神经功能恢复、脑组织损伤、炎症反应、免疫浸润及信号通路激活的影响。本研究旨在明确 MoDM 在 PD-L1 信号介导缺血性卒中后免疫调控中的关键作用，为免疫检查点靶向干预提供理论支持，并为缺血性卒中后精准免疫治疗策略的建立奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验采用 8-10 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠，其余同第二部分，详见第二部分 1.1.1。

#### 1.1.2 主要仪器设备

详见第二部分 1.1.3

#### 1.1.3 主要试剂与耗材

本实验中部分试剂与抗体详见第二部分 1.1.4，此外新增以下试剂：

表 4.1 主要试剂与耗材

Tab. 4.1 List of main reagents and consumables

试剂/材料	供应商（国家）
PD-L1 单克隆抗体（BP0101, clone 10F.9G2）	BioXcell (美国)
Isotype Control 抗体（anti-KLH, LTF-2）	BioXcell (美国)
Clodronate Liposome（Clo-Lip）	Liposoma (荷兰)
PBS Liposome（PBS-Lip, Clo-Lip 对照）	Liposoma (荷兰)
Western blot 一抗（Bax, C-Cas3, Cas3, PI3K, p-Akt, Akt, Actin）	CST/Abcam/Proteintech（美国/英国/中国）
免疫荧光染色抗体（CD68）	Abcam (英国)
流式抗体（CD11b, CD45, Ly6C, PD-L1）	BioLegend (美国)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 缺血性卒中模型（tMCAO）

采用线栓法（tMCAO）诱导短暂性脑缺血/再灌注损伤（详见第二部分 1.2.1）。

#### 1.2.2 实验分组与处理

实验动物随机分为以下实验组：

- （1）Sham 组：仅分离血管，但不插入线栓；
- （2）tMCAO 组：建立短暂性大脑中动脉闭塞（tMCAO）模型；
- （3）tMCAO+Vehicle 组：tMCAO 后尾静脉注射 PBS 作为溶剂对照；

- (4) tMCAO+PBS-Lip 组: 尾静脉注射 PBS Liposome (Clo-Lip 对照);
- (5) tMCAO+Clo-Lip 组: 术前 24h 和术后第 1 天尾静脉注射 Clo-Lip(200 $\mu$ L/只) 以耗竭 MoDM;
- (6) tMCAO+PD-L1 mAb 组: tMCAO 后 1h 进行 PD-L1 mAb 治疗 (50 $\mu$ g/100 $\mu$ L,IV);
- (7) tMCAO+PD-L1 mAb+Clo-Lip 组: 联合 PD-L1 mAb 处理与 Clo-Lip 介导的 MoDM 耗竭。

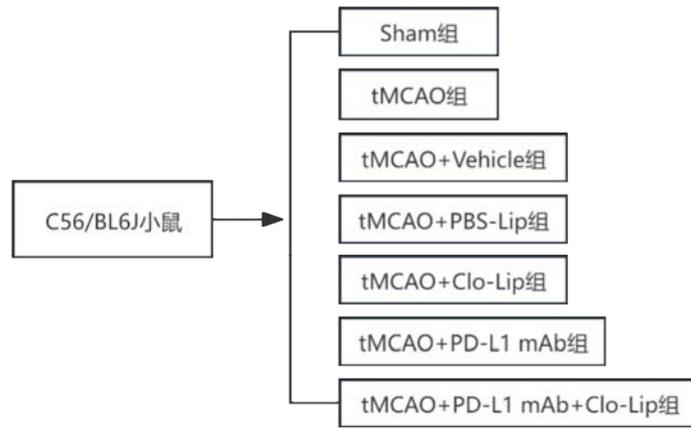


图 4.1 动物实验分组示意图

Fig. 4.1 Schematic diagram of animal experimental grouping

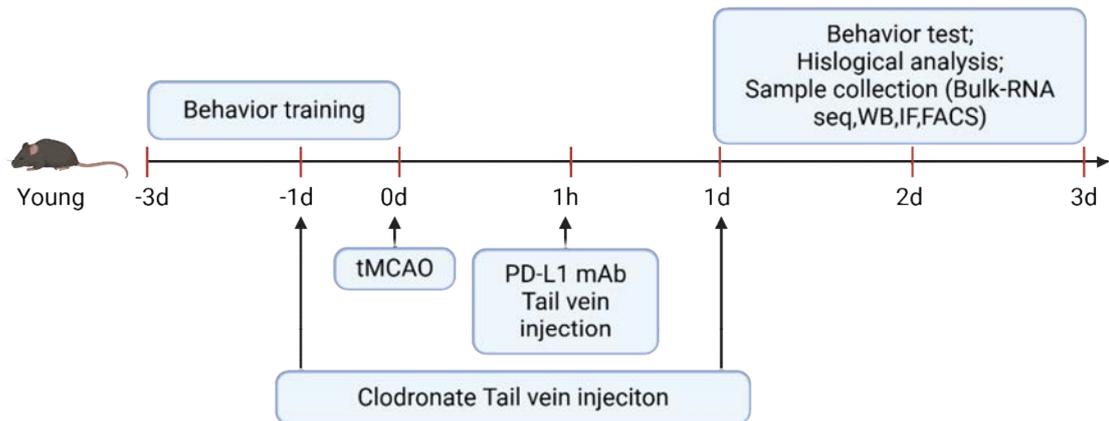


图 4.2 药物治疗示意图

Fig. 4.2 Schematic diagram of drug treatment

### 1.2.3 体重及行为学评估

详见第二部分 1.2.3。

#### 1.2.4 组织病理学分析

详见第二部分 1.2.4。

#### 1.2.5 Western Blot

取脑组织样本，加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，进行冰浴裂解 30 分钟，随后进行离心（12,000g，10 分钟，4°C），收集上清液。蛋白浓度通过 BCA 法测定，取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转膜至 PVDF 膜上（具体操作步骤已在第二部分详细描述），简单地说，膜用 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 小时，随后加入以下一抗，4°C 孵育过夜：Bax（1:1000）、C-Caspase3（1:1000）、Caspase3（1:1000）、PI3K（1:1000）、Akt（1:1000）、p-Akt（1:1000）、Actin（1:5000）。

第二天，使用 HRP 标记的二抗（1:5000）室温孵育 2 小时。使用 ECL 显色法检测蛋白条带信号，并通过 ImageJ 软件对条带灰度值进行定量分析。

#### 1.2.6 脑组织 FACS 实验方法

##### (1) 样本制备

##### 1) Percoll 工作液的配制

表 4.2 Percoll 工作液的配置

Tab. 4.2 Composition of percoll working solution

Percoll 浓度	Percoll 原液(mL)	10XPBS(mL)	1XPBS(mL)
Percoll 工作液	9	1	—
30%Percoll	3	—	7
60%Percoll	6	—	4
70%Percoll	7	—	3

实验中使用 70%和 30% Percoll 进行密度梯度离心，以分离脑组织免疫细胞。

##### 2) PBS 灌注取脑

首先，小鼠经腹腔注射 10%水合氯醛（50 $\mu$ L/10g 体重）进行深度麻醉。随后，剪开右心耳，利用 20mL 生理盐水通过左心室灌注，确保血液充分冲洗干净，以肝脏、肠道颜色变白为判断标准。灌注完成后，迅速断头取脑，小心剥离嗅球、小脑及脑干，仅保留大脑皮层部分，并立即置于预冷 PBS 中。脑组织取材后，移入 70 $\mu$ m 滤网（预先湿润），用 5mL PBS 逐步冲洗，同时剪碎组织，以确保

细胞充分释放。滤过液收集至 50mL 离心管，用于后续细胞分离及分析。

### 3) 细胞分离

脑组织经密度梯度离心法提取单个核细胞。首先，将组织消化液处理后的细胞悬液以 1500rpm×5min 离心去除上清。细胞沉淀用 70%Percoll 悬浮，并缓慢加入 70%Percoll 于 30%Percoll 下层，形成密度梯度层。随后，样本于室温 2000rpm×20min（升速 1 或 slow，降速 0 或 off）离心。离心后，最上层髓鞘层吸出丢弃，30%和 70%Percoll 之间的白膜层为单个核细胞层，小心吸取 3mL 并转移至 15mL 离心管中。加入 PBS 至 15mL，2000rpm×5min 离心去上清后，重复洗涤一次。最终，细胞重悬于 1mL 1%BSA，涡旋混匀后转移至流式管，并以 1500rpm×4min 离心去除上清。细胞计数后调整至  $1 \times 10^7$  cells/mL，每管取 100 $\mu$ L 进行流式染色。

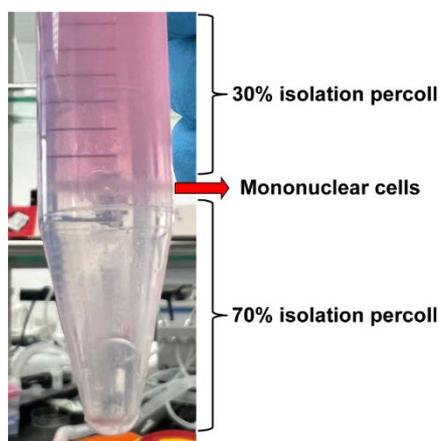


图 4.3 离心后单个核细胞分离展示图

Fig. 4.3 Mononuclear cells after centrifugation

### (2) Panel 染色方案

表 4.3 流式抗体 Panel 信息

Tab. 4.3 Antibody panel used for flow cytometry

标记	供应商	稀释比例
CD11b-FITC	BioLegend (USA)	1:200
CD45-APC	BioLegend (USA)	1:200
Ly6C-PE	BioLegend (USA)	1:200
PD-L1-PE-Cy7	BioLegend (USA)	1:200

### (3) 细胞表面染色及流式细胞术检测

单细胞悬液制备后，取  $1 \times 10^6$  细胞于  $100 \mu\text{L}$  1%BSA 中重悬，并加入相应荧光标记抗体（按 panel 配方）， $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30min。孵育后，以 PBS 洗涤两次（ $2000\text{rpm} \times 5\text{min}$ ），随后用 4%PFA 在  $4^\circ\text{C}$  固定 15min。最终，细胞重悬于 FACS Buffer，并使用 BD Biosciences 流式细胞仪（激光配置 488nm、561nm、640nm）进行检测。数据分析采用 FlowJo 软件，统计 MoDM（ $\text{CD11b}^+\text{CD45}^+\text{Ly6C}^+$ ）及 PD-L1 表达情况。

### 1.2.7 生物信息学分析方法

#### （1）差异基因富集分析

为探究 PD-L1 mAb 处理引起的基因功能变化，对差异表达基因（DEGs）进行 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）和 GO（Gene Ontology）富集分析。KEGG 通路分析采用 clusterProfiler（v3.14.3）进行，设定  $P < 0.05$  作为显著性阈值，重点关注 PI3K-Akt、MAPK、趋化因子信号通路及 TNF 信号通路，以揭示炎症及免疫调节相关机制。GO 功能富集分析从信号调节、细胞黏附、细胞-细胞相互作用及离子通道功能等生物学过程（BP）进行评估，结合分子功能（MF）和细胞组分（CC）进一步解析 DEGs 的潜在功能及作用机制。

#### （2）免疫浸润分析

为评估 PD-L1 mAb 处理对缺血性卒中后免疫微环境的影响，采用 CIBERSORT（v1.0.3）计算 AP 组（PD-L1 mAb 处理）和 AMP 组（Clo-Lip 预处理后 PD-L1 mAb 处理）的免疫细胞浸润比例，分析 M0、M1、M2 型巨噬细胞及单核细胞在不同处理组中的变化趋势，并采用 Wilcoxon 秩和检验比较两组间的差异，设定  $P < 0.05$  作为显著性阈值，以揭示 PD-L1 介导的巨噬细胞调控作用。

其余生物信息学分析同第二部分。

### 1.2.8 统计学分析

同第二部分。

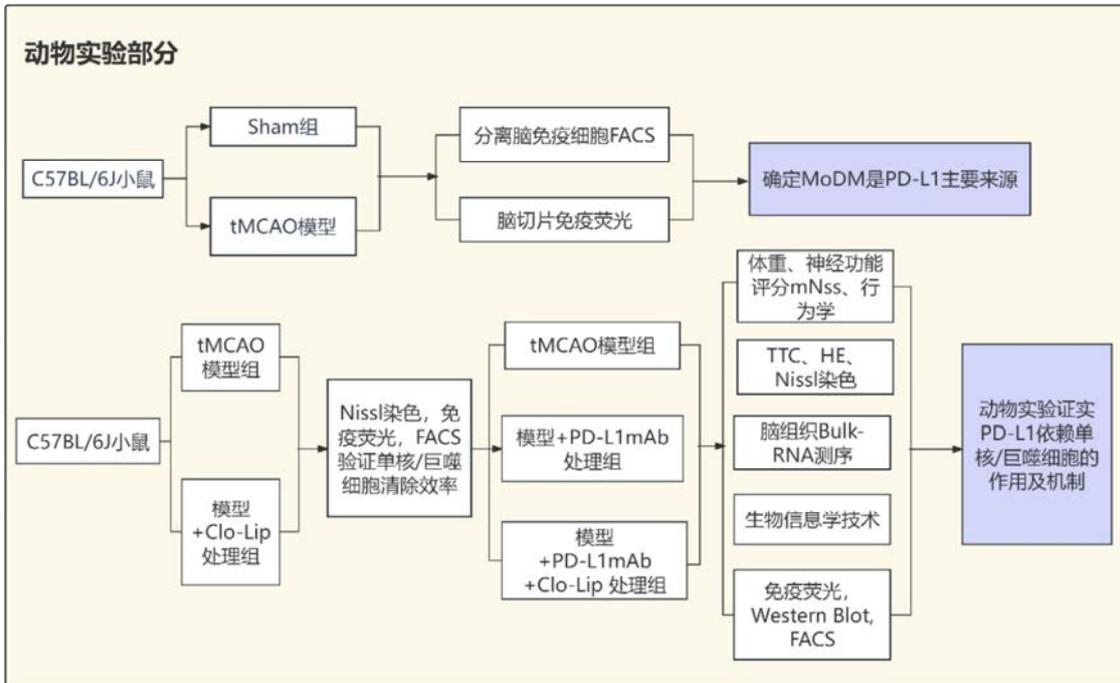


图 4.4 第三部分技术路线图

Fig. 4.4 Experimental design and workflow in Part 3

## 2 结果

### 2.1 缺血性卒中后 MoDM 募集及其 PD-L1 表达上调

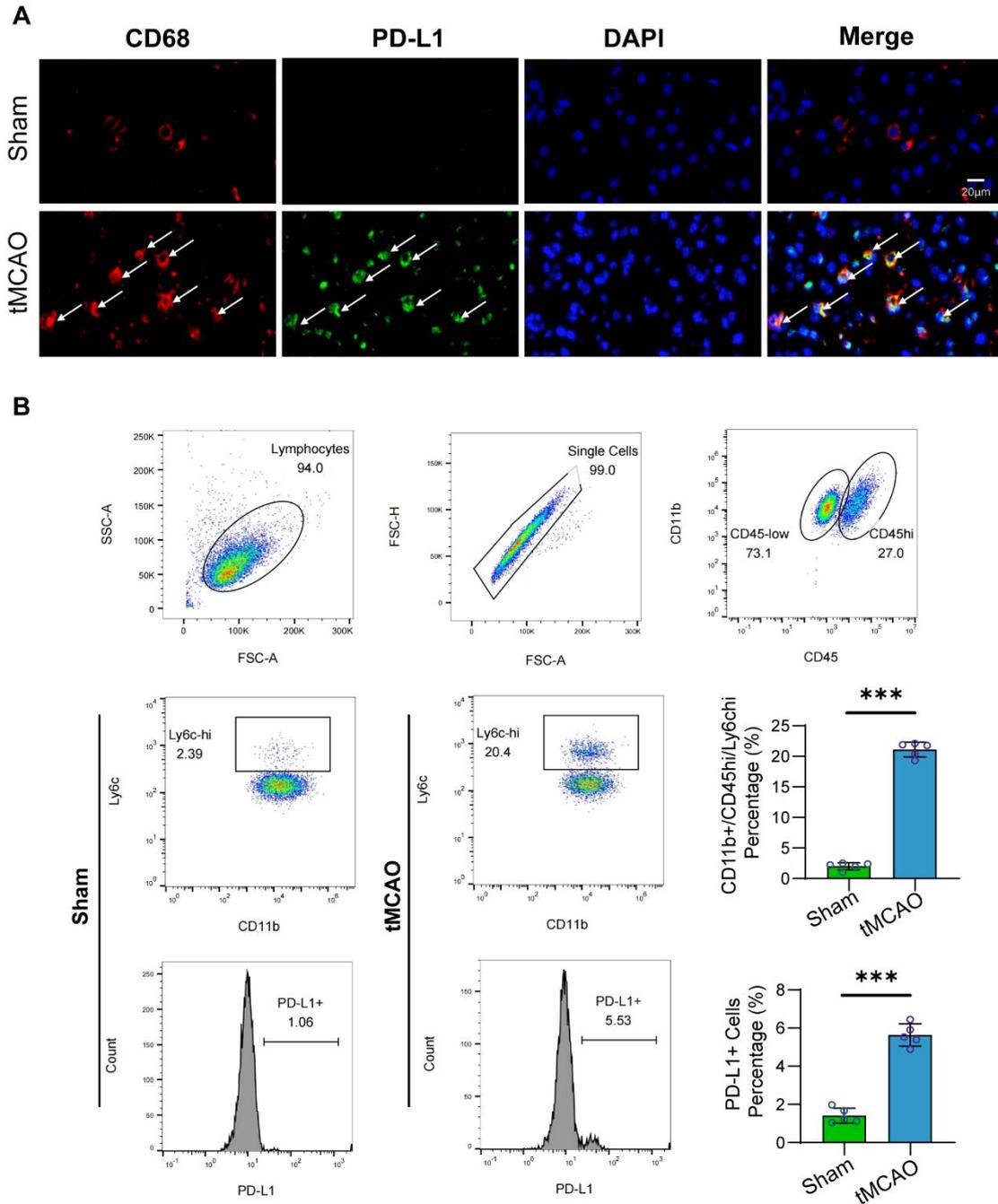
在前期研究中，PD-L1 在缺血性卒中后外周单核细胞中表达下调，但其在脑组织中是否由特定细胞群表达并发挥功能尚未明确。为此，本节重点分析缺血性卒中后脑组织中 MoDM 的募集特征及其 PD-L1 表达情况。

为明确缺血性卒中后单核来源巨噬细胞（monocyte-derived macrophages, MoDM）的脑内浸润特征及其 PD-L1 表达变化，本研究采用免疫荧光染色与流式细胞术对 Sham 与 tMCAO 小鼠脑组织中 MoDM 的分布及其 PD-L1 表达情况进行系统分析。

免疫荧光结果显示，Sham 组中脑组织仅散在分布少量 CD68<sup>+</sup>细胞（红色荧光），PD-L1 信号（绿色荧光）几乎不可见。而在 tMCAO 模型中，缺血区域 CD68<sup>+</sup>细胞数量显著增多，伴随 PD-L1 信号强度明显增强。两者在空间上高度共定位（白色箭头），提示 PD-L1 主要表达于缺血性卒中后浸润的 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞，而非静息态小胶质细胞或其他胶质细胞（图 4.5A）。

进一步,流式细胞术结果证实了脑组织中 MoDM 的浸润特征。通过 FSC/SSC 排除淋巴细胞后,可根据 CD11b 与 CD45 表达水平将脑内髓系细胞划分为两类: CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> (小胶质细胞, MiDM) 和 CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup> (单核来源巨噬细胞, MoDM)。结果显示, tMCAO 小鼠中 CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>/Ly6C<sup>hi</sup> MoDM 的占比较 Sham 组显著升高 ( $P < 0.001$ ), 表明缺血性卒中诱导大量 MoDM 向脑组织迁移。此外, PD-L1<sup>+</sup> MoDM 细胞比例也较 Sham 显著升高 ( $P < 0.001$ ) (图 4.5B)。

综上所述,本研究结果明确提示:本节结果显示,缺血性卒中后 MoDM 大量募集至脑组织,且是 PD-L1 的主要表达细胞,提示其可能在缺血性卒中相关的免疫调控中发挥关键作用。



注：(A) 免疫荧光共染显示，在 tMCAO 模型小鼠脑组织中，PD-L1（绿）与巨噬细胞标志物 CD68（红）在梗死区域高度共表达，提示浸润性巨噬细胞为 PD-L1 主要来源。DAPI（蓝）标记细胞核，白色箭头指示 PD-L1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>细胞（比例尺：20 μm）；(B) 流式细胞术分析显示，tMCAO 组 CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>Ly6c<sup>+</sup>单核来源巨噬细胞（MoDM）比例显著上升，且 PD-L1<sup>+</sup>细胞显著增加。右图为 CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>Ly6c<sup>+</sup>细胞比例及其 PD-L1<sup>+</sup>阳性率的定量分析。（均数±标准差，n=5；\*\*\*P < 0.001）

图 4.5 缺血性卒中后 MoDM 显著浸润脑组织并高表达 PD-L1

Fig. 4.5 MoDMs infiltrate the brain and upregulate PD-L1 after ischemic stroke

## 2.2 Clo-Lip 选择性清除 MoDM 并有效抑制脑组织 PD-L1 信号活性

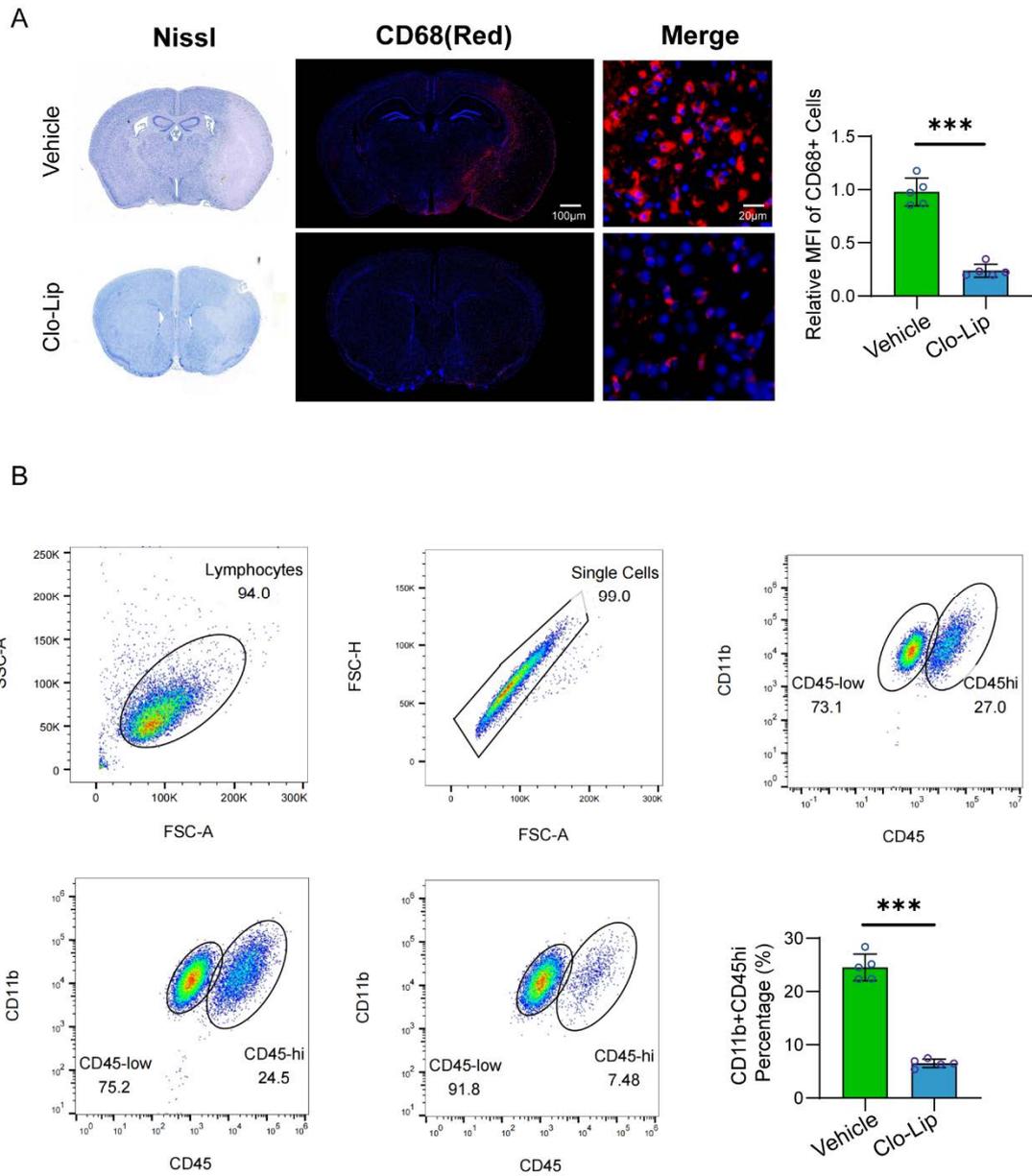
在明确 MoDM 为 PD-L1 主要表达细胞后，下一步需构建特异性清除模型，以探究其在 PD-L1 介导功能中的作用基础。本节采用 Clo-Lip 选择性清除 MoDM，验证其对脑内 PD-L1 信号活性的影响。

为验证 Clo-Lip 对单核来源巨噬细胞（MoDM）的特异性清除效果及其对 PD-L1 表达的影响，本研究在 tMCAO 模型小鼠中进行 Clo-Lip 或 Vehicle 处理，并通过 Nissl 染色、CD68 免疫荧光及流式细胞术系统评估 MoDM 的浸润情况与 PD-L1 表达变化。

组织学分析显示，Vehicle 组中缺血半球存在广泛神经元损伤（Nissl 染色苍白区显著），而 Clo-Lip 处理后梗死区域明显缩小（图 4.6A）。进一步的 CD68 免疫荧光染色显示，Vehicle 组缺血灶周围聚集大量 CD68<sup>+</sup>细胞（红色荧光），且细胞密度和荧光强度均较高；而 Clo-Lip 处理组中 CD68<sup>+</sup>细胞显著减少，其平均荧光强度（MFI）明显下降（\*\*\* $P < 0.001$ ），提示外周 MoDM 浸润明显受抑。

流式细胞术结果进一步证实 Clo-Lip 对 MoDM 具有特异性清除效应（图 4.6B）。在排除淋巴细胞后，通过 CD45 和 CD11b 联合染色识别 MoDM（CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>）与小胶质细胞（CD45<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>），结果显示，Vehicle 组中 MoDM 占 CD11b<sup>+</sup>细胞比例显著高于 Clo-Lip 组，而小胶质细胞比例未显著变化。此外，Clo-Lip 处理后 MoDM 表面 PD-L1 表达水平亦显著下调（\*\*\* $P < 0.001$ ），提示 MoDM 是缺血性卒中后脑组织中 PD-L1 的主要来源，且其清除可有效抑制局部 PD-L1 信号活性。

综上所述，Clo-Lip 处理可有效清除缺血性卒中后脑组织中的 MoDM，并显著降低 PD-L1 信号强度，为后续功能验证实验提供了可靠的工具基础。



注：(A)Nissl 染色结合 CD68 免疫荧光结果显示，缺血性卒中模型小鼠经 Clo-Lip 处理后，脑组织中 CD68<sup>+</sup>细胞显著减少，提示 MoDM 有效清除。右侧柱状图为 CD68<sup>+</sup>细胞的平均荧光强度 (MFI) 定量分析 (n=5, 均数±标准差)。(B)流式细胞术进一步验证了 MoDM 清除效果。Clo-Lip 处理组中 CD11b<sup>+</sup>CD45hi 单核来源巨噬细胞 (MoDM) 比例显著低于对照组。右侧柱状图为 CD11b<sup>+</sup>CD45hi 细胞比例统计结果。(均数±标准差, n=5; \*\*\*P < 0.001)

图 4.6 Clo-Lip 处理有效清除缺血性卒中后脑组织中的 MoDM

Fig. 4.6 Clo-Lip treatment effectively eliminates MoDMs in the ischemic brain

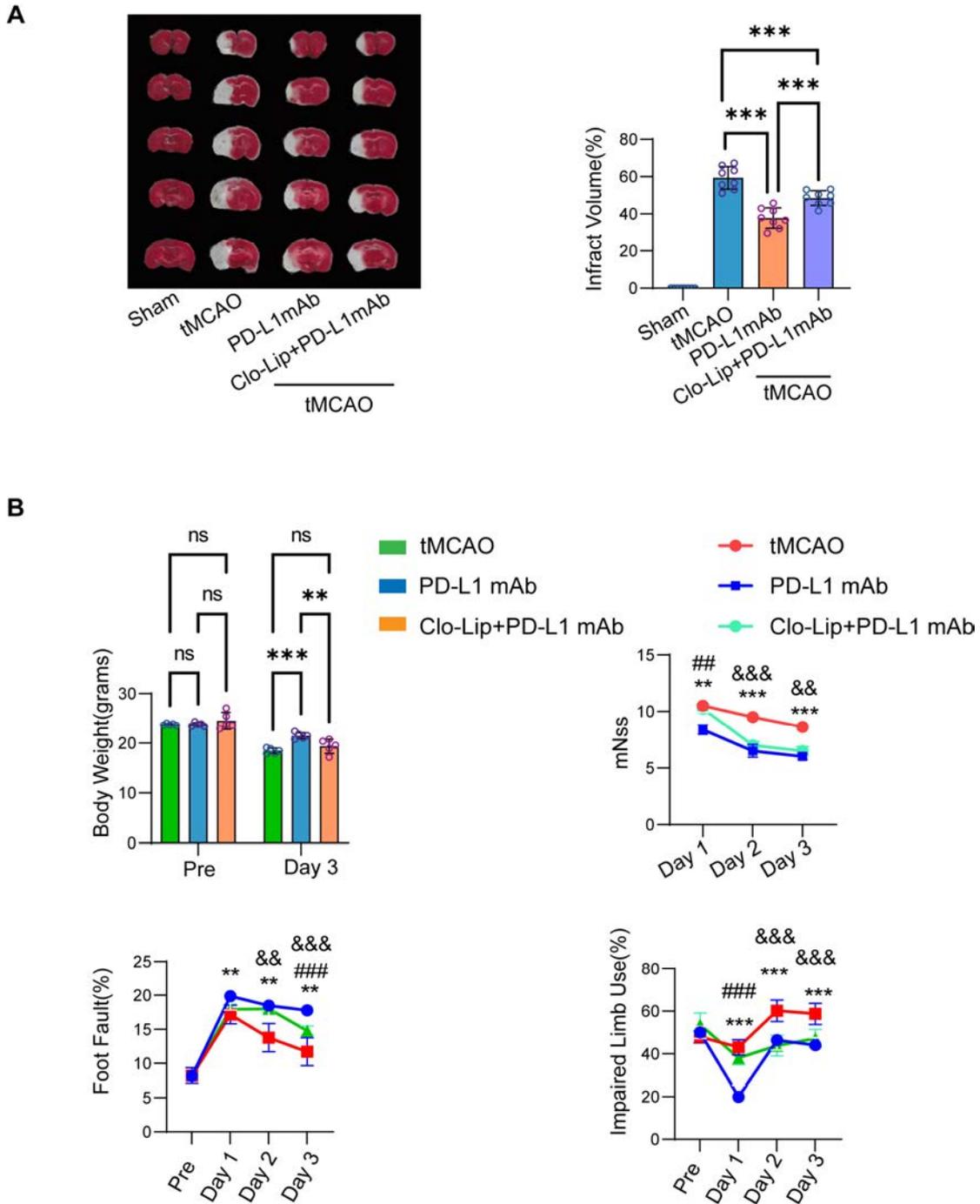
## 2.3 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 介导的神经保护作用

在建立 MoDM 清除模型的基础上, 本节进一步评估 MoDM 在 PD-L1 阻断治疗中是否发挥关键作用, 通过行为学及组织学评估 PD-L1 mAb 介导的神经保护效果是否因 MoDM 缺失而受损。

### 2.3.1 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对脑梗死体积与神经功能的改善效应

为进一步探讨 PD-L1 通过单核来源巨噬细胞 (MoDM) 发挥神经保护作用的具体机制, 采用 Clo-Lip 处理清除 MoDM, 并评估其对 PD-L1 mAb 介导的神经保护作用的影响。首先, TTC 染色分析缺血性卒中后梗死体积变化 (图 4.7A)。结果显示, tMCAO 组小鼠的梗死体积显著增加, 而 PD-L1 mAb 处理后梗死体积明显减少。然而, 在 Clo-Lip 处理后, PD-L1 mAb 介导的梗死体积缩小效应部分丧失 ( $P < 0.001$ ), 提示 PD-L1 主要通过 MoDM 介导其神经保护作用。

为了进一步评估单核/巨噬细胞清除对 PD-L1 mAb 介导的神经功能恢复的影响, 分别检测了体重变化、mNSS 评分、Foot Fault 评估和 Cylinder Test (图 4.7B)。体重变化分析显示, tMCAO 组小鼠体重显著下降, PD-L1 mAb 处理可减缓体重下降, 而 Clo-Lip 处理后 PD-L1 mAb 介导的保护作用减弱 ( $P < 0.01$ )。mNSS 评分分析发现, PD-L1 mAb 处理显著改善神经功能, 但在 Clo-Lip 处理后, 该改善作用明显受限 ( $P < 0.01$ )。Foot Fault 评估显示, tMCAO 组小鼠运动协调能力显著下降, 而 PD-L1 mAb 处理可明显改善该功能, 但 Clo-Lip 处理后 PD-L1 mAb 介导的运动功能恢复作用减弱 ( $P < 0.01$ )。此外, Cylinder Test 结果显示, PD-L1 mAb 处理可促进受损肢体的功能恢复, 而 Clo-Lip 处理后, 该保护作用显著削弱 ( $P < 0.001$ )。这些结果表明, MoDM 可能是 PD-L1 介导神经功能恢复的重要介质, 其清除削弱了 PD-L1 mAb 的保护效应。



注：(A)TTC 染色显示各组小鼠脑梗死体积。定量分析结果显示，PD-L1 mAb 组与 Clo-Lip+PD-L1 mAb 组均可显著减小 tMCAO 诱导的脑梗死体积，但 Clo-Lip+PD-L1 mAb 较 PD-L1 mAb 保护效应显著减弱。(B)各组小鼠体重变化、神经功能评分 (mNSS)、Grid walking test 中的足错率 (Foot Fault%) 和 Cylinder test 中受损肢体使用率 (Impaired Limb Use%) 比较。结果显示，PD-L1 mAb 可显著改善缺血性卒中后神经行为表现，而 Clo-Lip+PD-L1 mAb 处理削弱了该改善效应。(均数±标准差，n=6-8； ns,  $P > 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  与 tMCAO 组比较；##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  与 PD-L1 mAb 组比较；&&  $P <$

0.01,  $P < 0.001$  与 Clo-Lip 组比较)

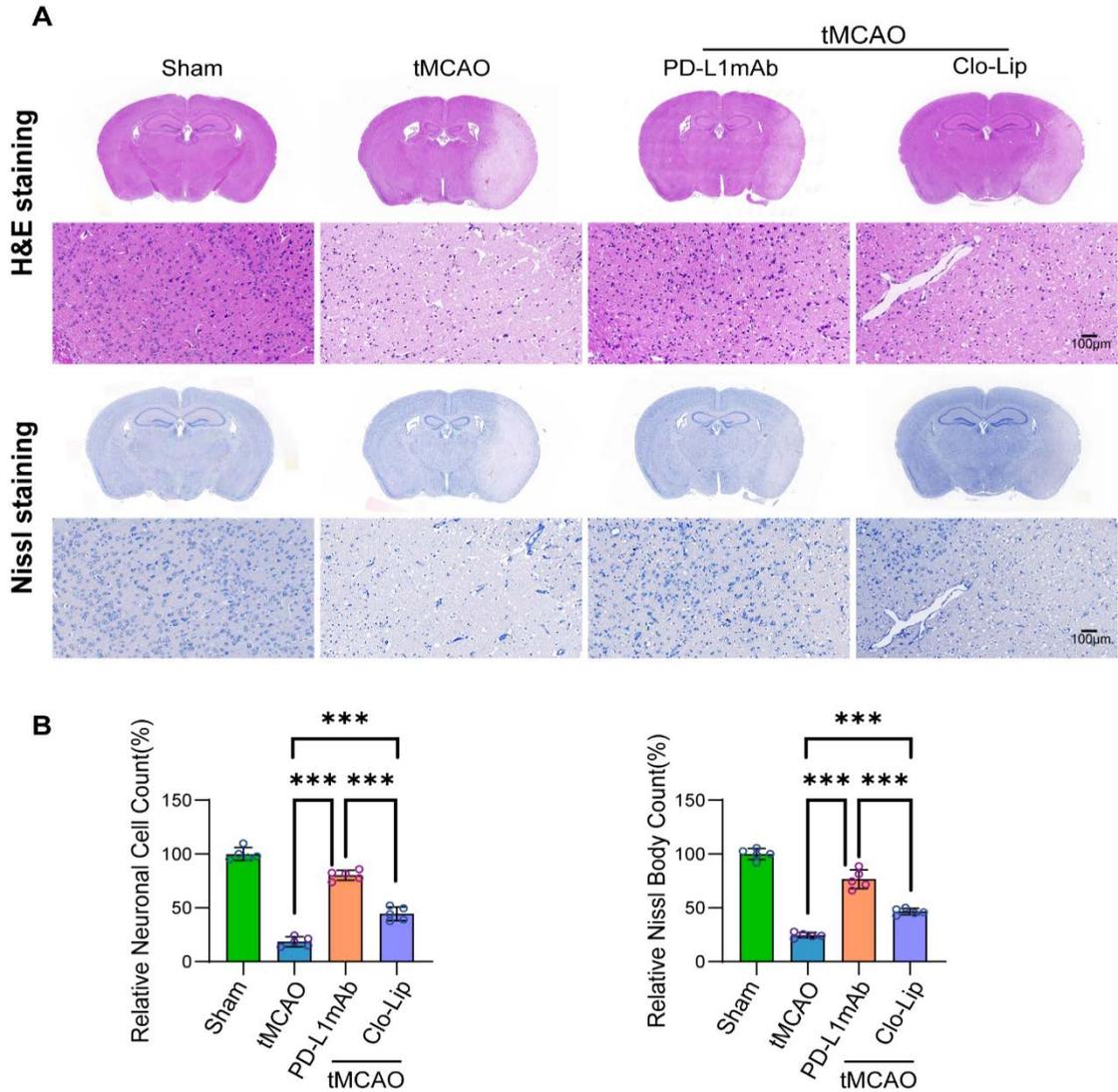
图 4.7 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后脑损伤与神经功能的改善作用

**Fig. 4.7 Depletion of MoDM attenuates the neuroprotective effects of PD-L1 mAb after ischemic stroke**

### 2.3.2 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对脑组织结构完整性的保护作用

此外, 为探讨 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后神经元存活的影响, 以及单核/巨噬细胞清除是否削弱该保护作用, 进行了 H&E 和 Nissl 染色分析 (图 4.8A)。H&E 染色显示, Sham 组小鼠神经元排列紧密, 细胞形态完整, 而 tMCAO 组小鼠神经元数量明显减少, 细胞坏死加重。PD-L1 mAb 处理后, 神经元损伤明显减少, 但在 Clo-Lip 处理组中, 这一保护作用显著减弱。Nissl 染色进一步证实了这一趋势, tMCAO 组小鼠 Nissl 体明显丢失, 而 PD-L1 mAb 处理可部分恢复 Nissl 体表达。然而, 在 Clo-Lip 处理后, Nissl 体丢失依然严重。

神经元存活的定量分析 (图 4.8B) 显示, PD-L1 mAb 处理显著提高神经元存活率, 而在 Clo-Lip 处理组中, 神经元存活率显著降低 ( $P < 0.001$ )。这些结果进一步表明, MoDM 可能在 PD-L1 介导的神经保护过程中发挥关键作用, 其清除削弱了 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后脑损伤的保护效应。



注：(A)H&E 染色与 Nissl 染色显示各组小鼠脑组织神经元结构变化。Sham 组神经元结构完整，tMCAO 组出现明显神经元丢失和组织稀疏，PD-L1 mAb 治疗可显著改善神经元保存，Clo-Lip 处理后该保护效应被部分削弱。(B)相应的神经元细胞数与 Nissl 小体数量的定量分析。结果表明，PD-L1 mAb 可显著提高缺血性卒中后神经元细胞与 Nissl 小体的保留程度，而 Clo-Lip 处理削弱了该效应。（均数±标准差，n=6；\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 4.8 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后神经元结构的保护作用

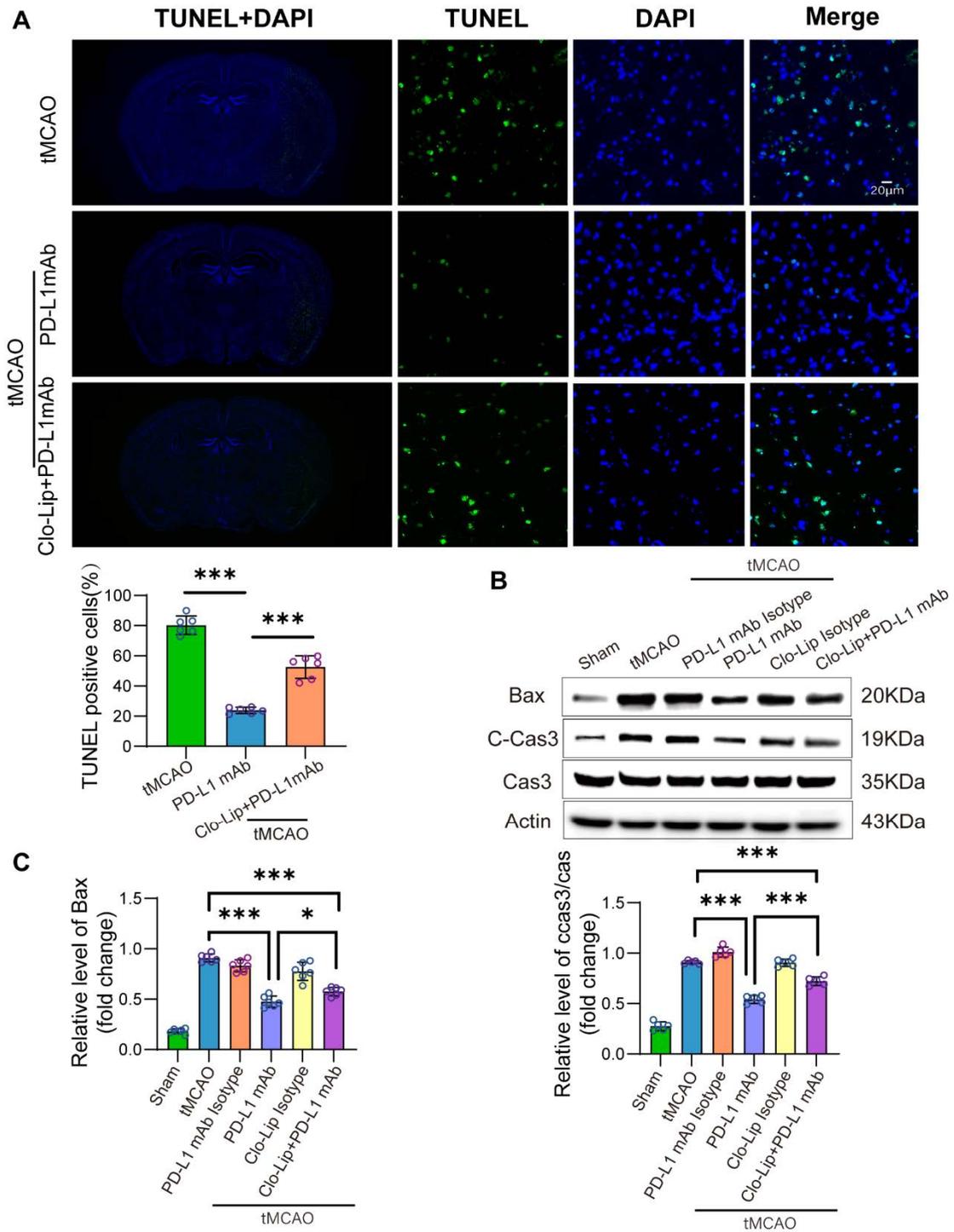
Fig. 4.8 MoDM depletion diminishes the neuroprotective effect of PD-L1 mAb after ischemic stroke

### 2.3.3 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 介导的神经元凋亡抑制效应

为了进一步探讨 MoDM 在 PD-L1 mAb 介导的神经保护中的作用, 采用 TUNEL 染色及 Western blot 分析神经元凋亡相关指标。

TUNEL 免疫荧光染色显示, 与 tMCAO 组相比, PD-L1 mAb 处理显著减少缺血性卒中脑组织中的凋亡细胞比例 ( $P < 0.001$ ) (图 4.9A)。然而, 在 Clo-Lip 预处理后, PD-L1 mAb 介导的抗凋亡作用显著减弱 ( $P < 0.001$ ), 提示 MoDM 可能在 PD-L1 mAb 介导的抗凋亡过程中发挥关键作用。

Western blot 结果显示, PD-L1 mAb 处理后 Bax 和 Cleaved-Caspase3 (C-Cas3) 表达水平显著下降 ( $P < 0.001$ ), 而 Clo-Lip 预处理后 PD-L1 mAb 介导的 Bax 和 C-Cas3 抑制作用明显减弱 ( $P < 0.05$ ) (图 4.9B, 4.9C)。这些结果表明, MoDM 清除可削弱 PD-L1 mAb 介导的抗凋亡效应, 进一步强调 MoDM 在缺血性卒中后 PD-L1 依赖性神经保护中的作用。



注：(A)TUNEL 染色显示 tMCAO 后皮层区域细胞凋亡显著增加，PD-L1 mAb 干预可显著减少 TUNEL 阳性细胞，而 MoDM 清除（Clo-Lip）处理后该抑制作用减弱。(B)Western blot 检测各组脑组织中 Bax、Caspase-3（Cas3）及 C-Cas3 的表达。(C)Bax 及 C-Cas3/Cas3 的定量分析结果进一步表明，PD-L1 阻断可显著降低促凋亡信号的激活，MoDM 清除可部分逆转该效应。（均数±标准差，n=6，\* $P < 0.05$ ；\*\*\* $P < 0.001$ ）

图 4.9 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对缺血性卒中后神经元凋亡的抑制作用

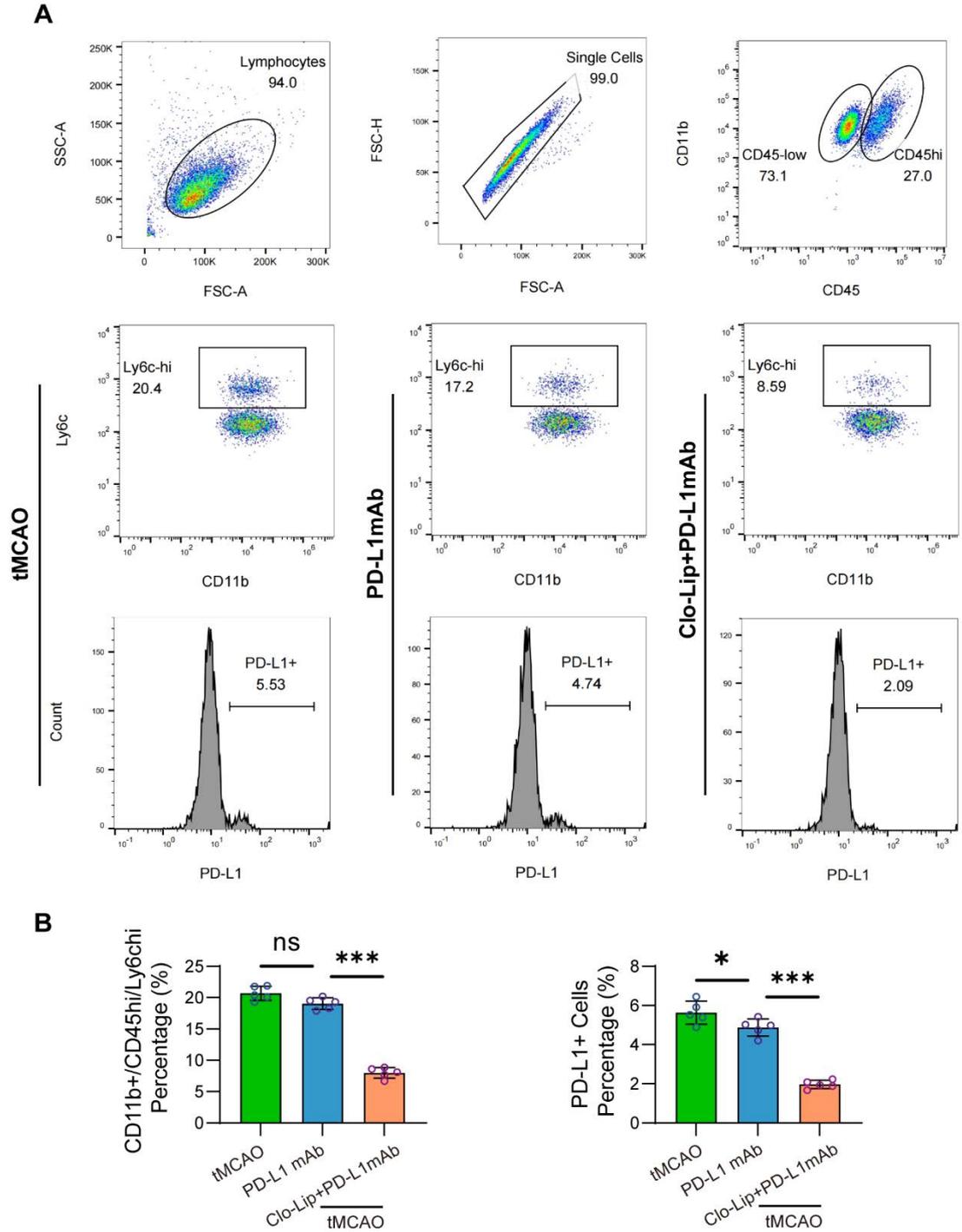
**Fig. 4.9 MoDM depletion attenuates the anti-apoptotic effects of PD-L1 mAb following ischemic stroke**

2.3.4 MoDM 清除干扰 PD-L1 mAb 的免疫调节功能与关键细胞群稳定性

为了进一步验证 MoDM 在 PD-L1 mAb 介导的免疫调控中的作用,利用流式细胞术分析了 MoDM (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>) 在不同处理组中的变化(图 4.10)。门控策略显示,PD-L1 mAb 处理后,MoDM 在缺血性卒中脑组织中的比例并未发生显著变化 ( $P > 0.05$ ),但在 Clo-Lip 预处理后(AMP 组),MoDM 细胞比例显著下降 ( $P < 0.001$ ) (图 4.10B)。

进一步分析 MoDM 亚群变化,发现 PD-L1 mAb 处理对 Ly6c<sup>hi</sup> MoDM 细胞比例无显著影响,但在 AMP 组中,Ly6c<sup>hi</sup> MoDM 细胞显著减少(图 4.10A),提示 MoDM 可能是 PD-L1 mAb 介导的免疫调控关键细胞群。此外,MoDM 中 PD-L1<sup>+</sup>细胞的表达水平在 AP 组与 tMCAO 组相似,但在 Clo-Lip 预处理后(AMP 组),PD-L1<sup>+</sup> MoDM 细胞比例显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 4.10B)。

这些结果表明,MoDM 可能是 PD-L1 介导缺血性卒中后免疫调控的关键效应细胞,而 MoDM 清除可显著削弱 PD-L1 mAb 介导的免疫调节作用,进一步强调了 PD-L1 在 MoDM 依赖性免疫调控中的重要性。



注：(A) FACS 展示脑组织中免疫细胞（CD45<sup>+</sup>）及 Ly6C<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> MoDM 的鉴定方式，并评估其在 tMCAO 组、PD-L1 mAb 组及 Clo-Lip+PD-L1 mAb 组中的 PD-L1 表达情况；(B) 定量分析显示，Clo-Lip+PD-L1 mAb 组中 MoDM（CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>Ly6C<sup>hi</sup>）比例显著下降，PD-L1<sup>+</sup>细胞占比亦显著减少。（均数±标准差，n=5；ns,  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ）

图 4.10 MoDM 清除削弱 PD-L1 mAb 对 Ly6C<sup>+</sup>高表达 MoDM 中 PD-L1 表达的抑制作用

Fig. 4.10 MoDM depletion reduces PD-L1 expression in Ly6C<sup>hi</sup> MoDM after ischemic

## stroke

## 2.4 MoDM 清除对 PD-L1 mAb 介导转录应答与免疫微环境调节的影响

在 PD-L1 mAb 治疗效果被 MoDM 清除削弱的基础上,本节进一步从转录组和免疫细胞浸润水平两方面探讨 MoDM 清除对局部免疫调控机制的影响。

为了进一步探讨 MoDM 在 PD-L1 mAb 介导的神经保护中的作用,本研究对 PD-L1 mAb 处理组 (AP) 和单核/巨噬细胞清除后 PD-L1 mAb 处理组 (AMP) 的脑组织转录组进行了 RNA-seq 分析。

主成分分析 (PCA) 结果显示, AP 组和 AMP 组在基因表达模式上存在明显差异 (图 4.11A), 提示单核/巨噬细胞清除可影响 PD-L1mAb 介导的基因调控模式。进一步的火山图分析显示, 与 AP 组相比, AMP 组中有大量差异表达基因 (DEGs), 其中多个基因显著上调或下调 (图 4.11B)。热图分析进一步揭示了 DEGs 的表达模式, 表明 MoDM 清除对脑组织局部基因调控产生深远影响 (图 4.11C)。

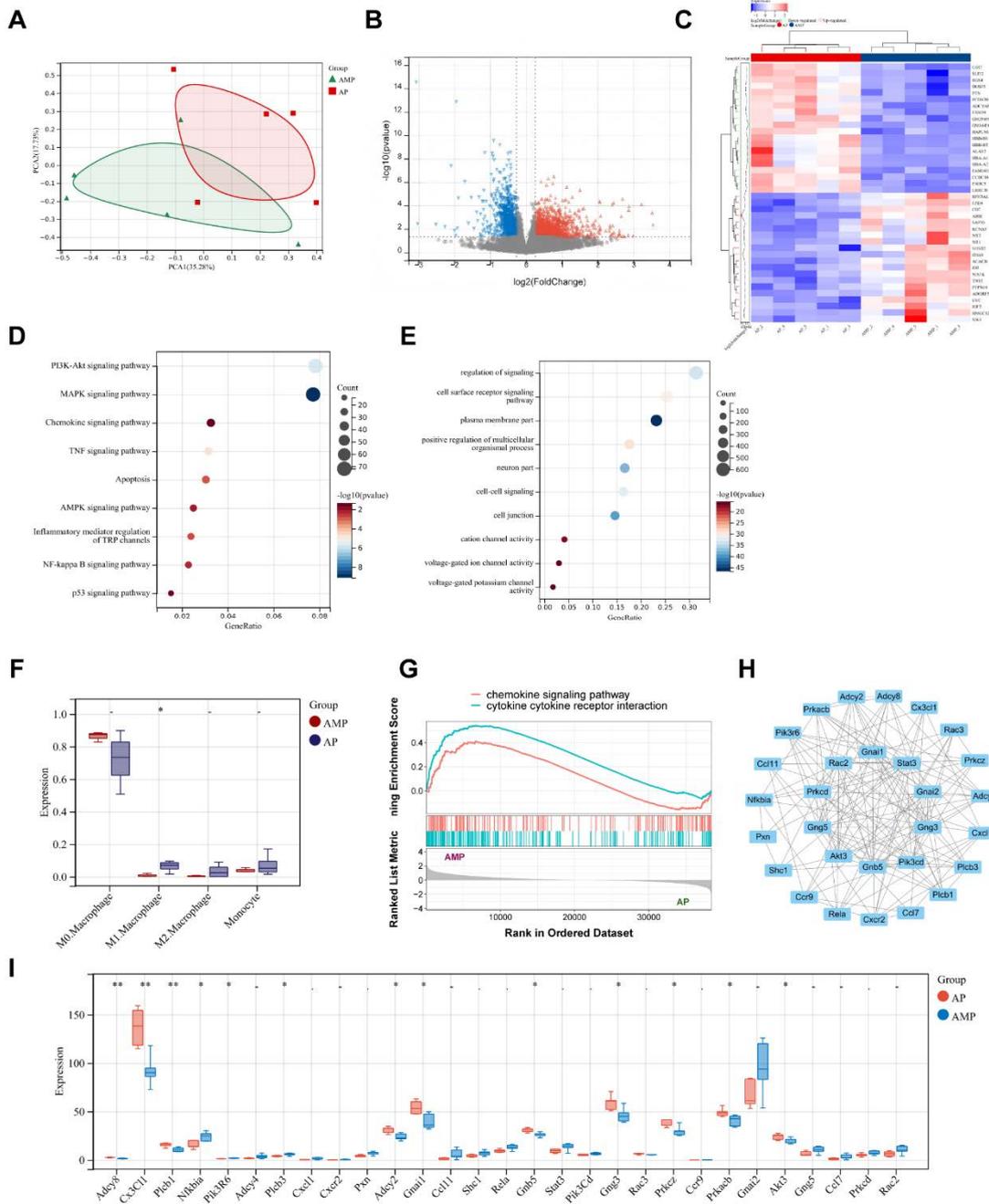
为了进一步解析 MoDM 在 PD-L1 mAb 介导的免疫调控中的潜在机制, 本研究对 DEGs 进行了 KEGG 通路富集分析。结果显示, DEGs 主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、趋化因子信号通路及 TNF 信号通路 (图 4.11D), 提示 MoDM 可能通过这些通路参与 PD-L1 介导的免疫调节。此外, GO 功能富集分析表明, DEGs 主要涉及细胞黏附、细胞-细胞相互作用及炎症信号调控 (图 4.11E), 进一步支持 MoDM 在 PD-L1 mAb 介导的免疫微环境调节中的关键作用。

为了进一步验证 Clo-Lip 处理对外周单核/巨噬细胞浸润的抑制作用, 本研究对 AP 组和 AMP 组进行了免疫浸润分析 (图 4.11F)。结果显示, AMP 组中 M0 型巨噬细胞的比例显著上调 ( $P < 0.05$ ), 而 M1 型、M2 型巨噬细胞及单核细胞的比例虽无显著性差异, 但均呈下调趋势。这一结果与 Clo-Lip 处理导致 MoDM 浸润减少的预期一致, 进一步证明 Clo-Lip 处理有效抑制了外周单核/巨噬细胞向缺血脑组织的浸润。

此外, GSEA 富集分析进一步显示, 与 AMP 组相比, AP 组的趋化因子信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用通路显著富集 (图 4.11G), 提示 MoDM 可能通过调控趋化因子网络介导 PD-L1 mAb 的保护作用。蛋白-蛋白相互作用

(PPI) 网络分析揭示, AMP 组中的差异表达基因主要集中在免疫调控相关分子 (如 PI3K、Rac2、Nfkb1) (图 4.11H)。关键 DEGs 进一步分析显示, AMP 组中促炎相关基因 (Ccl4、Ccl7、Cxcl9) 及免疫信号分子 (Ptk2、Gng2、Pld2) 发生显著变化 ( $P < 0.05$ ) (图 4.11I), 提示 MoDM 可能通过这些基因调控 PD-L1 介导的炎症反应。

本部分结果表明, MoDM 清除后脑组织的转录特征显著改变, 炎症相关通路活性上调, 免疫细胞亚群比例发生重构, 提示 MoDM 在维持 PD-L1 mAb 介导的免疫微环境稳态中发挥重要调节作用。



注：(A) 主成分分析（PCA）显示 AP 组（PD-L1 mAb）与 AMP 组（Clo-Lip+PD-L1 mAb）在转录表达谱上明显分离；(B) 火山图展示差异表达基因（DEGs），红色为上调，蓝色为下调（ $|\log_2FC| > 1, P < 0.05$ ）；(C) 热图显示 AMP 组多种炎症与免疫调节基因表达下调；(D-E) KEGG 与 GO 富集分析显示差异基因主要参与趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用、紧密连接等相关功能通路；(F) CIBERSORT 分析显示 AMP 组中 M0 型巨噬细胞比例上调，M1 型、M2 型及单核细胞比例下降，但差异无统计学意义；(G) GSEA 验证趋化因子与细胞因子通路在 AP 组中显著富集，提示 MoDM 清除可减弱 PD-L1 mAb 诱导的免疫激活；(H) PPI 网络揭示免疫相关差异基因的潜在功能连接；(I) 多个关键免疫调控相关趋化因子在

AMP 组中表达下调。(n=5, ns,  $P > 0.05$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ )

#### 图 4.11 转录组分析揭示 PD-L1 mAb 介导的 MoDM 相关免疫调节机制

**Fig. 4.11 Transcriptomic profiling reveals MoDM-associated immunomodulatory mechanisms of PD-L1 mAb in ischemic stroke**

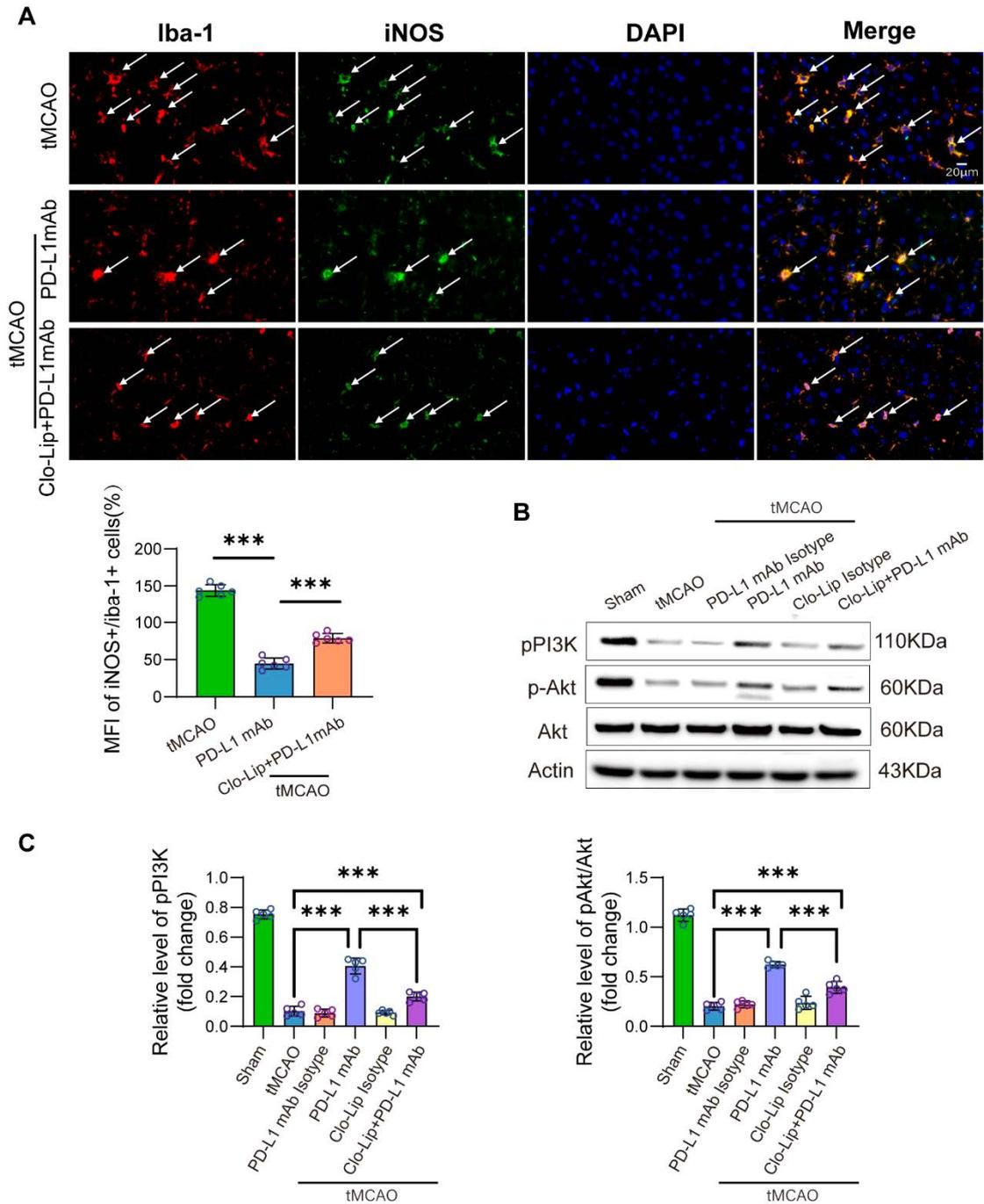
### 2.5 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 对促炎极化及 PI3K/Akt 信号通路的调节作用

为进一步明确 MoDM 参与 PD-L1 介导免疫调节的具体机制, 本节聚焦其对促炎极化表型及信号通路激活的影响。PD-L1 可能通过调节 MoDM 活化状态影响缺血性卒中后炎症反应。本研究进一步采用免疫荧光和 Western blot 分析 PD-L1 mAb 对 MoDM M1 活化及 PI3K/Akt 信号通路的影响。

免疫荧光结果显示, 与 tMCAO 组相比, PD-L1 mAb 处理后 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS<sup>+</sup>细胞的荧光强度显著降低( $P < 0.001$ )(图 4.12A), 提示 PD-L1 mAb 可能抑制 M1 活化。然而, 在 Clo-Lip 预处理后, PD-L1 mAb 介导的 iNOS 下降趋势部分逆转, 提示 MoDM 清除削弱了 PD-L1 mAb 对 M1 活化的抑制作用。

为进一步阐明分子机制, Western blot 分析发现, tMCAO 组小鼠脑组织中 PI3K 与 p-Akt 表达水平显著下调, 而 PD-L1 mAb 处理可显著激活 PI3K/Akt 通路(图 4.12B)。然而, Clo-Lip 联合干预后, PD-L1 mAb 激活该通路的能力明显减弱(图 4.12C), 提示 PD-L1 mAb 对 PI3K/Akt 通路的正调控效应在 MoDM 缺失状态下被削弱。

这部分结果表明, MoDM 在 PD-L1 调控下可有效限制 M1 型极化及增强 PI3K/Akt 信号通路活性, 其清除削弱了上述调节作用, 进一步验证 MoDM 作为 PD-L1 信号传导关键效应细胞的角色。



注：(A) 免疫荧光显示，tMCAO 后脑组织中 iNOS<sup>+</sup>Iba-1<sup>+</sup>促炎型巨噬细胞显著增加，PD-L1 mAb 显著抑制其表达，Clo-Lip 预处理可部分逆转该效应。DAPI 标记细胞核，白色箭头指示双阳性细胞（比例尺：20 μm）。下方为 MFI 定量结果；(B) Western blot 显示，PD-L1 mAb 上调 p-PI3K 和 p-Akt 表达，Clo-Lip 干预减弱该激活效应；(C) 定量分析证实 PD-L1 mAb 可激活 PI3K/Akt 通路，MoDM 清除后该效应明显减弱。（均数±标准差，n=5-6，\*\*\* P < 0.001）

图 4.12 MoDM 清除减弱 PD-L1 mAb 介导的抗炎作用及 PI3K/Akt 通路激活

Fig. 4.12 MoDM depletion attenuates PD-L1 mAb-mediated anti-inflammatory effects and PI3K/Akt activation after ischemic stroke

### 3 讨论

在本研究的前两部分中，我们系统揭示了 PD-L1 在缺血性卒中后的表达上调特征及其免疫阻断的神经保护作用，并提示该作用可能依赖于单核来源巨噬细胞（MoDM）的功能状态。为进一步明确 PD-L1 免疫调控的关键靶细胞及其作用机制，第三部分研究在 MoDM 清除的基础上，结合分子和功能水平验证，深入探讨了 PD-L1 是否通过 MoDM 介导炎症调节与神经保护作用。结果表明，PD-L1 介导的神经保护效应高度依赖 MoDM 的存在，且该过程涉及 PI3K/Akt 信号通路激活、免疫微环境调节和巨噬细胞活化状态改变，进一步明确了 MoDM 作为缺血性卒中免疫治疗潜在靶点的关键价值。

#### 3.1 MoDM 在 PD-L1 介导的缺血性卒中神经保护中的关键作用

单核来源巨噬细胞（MoDM）是缺血性卒中后最早募集进入缺血脑组织的外周髓系细胞，具备显著的时序性和空间特征，在急性期介导炎症反应、亚急性期参与组织修复<sup>[80]</sup>。其募集过程主要依赖于局部炎症因子、黏附分子及趋化因子的协同作用。其中，CCL2/CCR2 趋化轴在缺血性卒中后的单核细胞迁移中起核心作用<sup>[106, 107]</sup>。Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>单核细胞作为募集主力，能被缺血灶中多种细胞（如内皮细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞及神经元）分泌的 CCL2 所驱动，迅速迁移至病灶区域。而 CXCL12/CXCR4 趋化轴则进一步精细调控单核细胞在缺血脑区的边缘定位与区域分布，其缺失会显著削弱 MoDM 的浸润与局灶聚集能力<sup>[108]</sup>。

值得注意的是，这些进入脑组织的 Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>单核细胞在组织环境中可转化为 Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> MoDM，逐步在血管周围及梗死边缘区高度聚集，沿穿通血管迁移至更深层皮质，形成缺血性卒中后炎症反应的空间骨架<sup>[108]</sup>。相对而言，稳态下具免疫监视功能的 Ly6C<sup>low</sup>“巡逻型”单核细胞在缺血性卒中后的募集极其有限，且对病程进展与组织修复无明显影响<sup>[109]</sup>，进一步强调了 CCR2<sup>+</sup> MoDM 在缺血性卒中免疫过程中的主导地位。

在本研究中，我们观察到 MoDM 是缺血性卒中后脑组织中 PD-L1 表达最显著的髓系细胞类型，而脑内常驻的小胶质细胞及其他免疫细胞并未呈现类似表达趋势。这一空间表达特征提示，MoDM 可能是 PD-L1 介导免疫调控效应的主要执行细胞。进一步通过 Clo-Lip 选择性清除 MoDM 后发现，PD-L1mAb 诱导的

梗死体积缩小、神经功能恢复及神经元凋亡抑制等神经保护效应均明显减弱,提示 MoDM 的存在是 PD-L1 发挥保护作用的必要条件。

传统观点认为,PD-L1 主要通过 T 细胞上 PD-1 结合,诱导 T 细胞功能抑制,从而参与中枢神经系统疾病的免疫调节<sup>[110]</sup>。然而,本研究的结果表明,PD-L1 亦可通过直接调控髓系细胞,特别是 MoDM 的功能状态,发挥缺血性卒中后的免疫保护效应。这一发现与近年来对髓系细胞在缺血性卒中后免疫反应调节中关键角色的持续揭示相呼应<sup>[111]</sup>,也为 PD-L1 功能的再认识提供了新的证据。

总体而言,本研究不仅明确了 MoDM 是缺血性卒中后 PD-L1 表达的核心细胞来源,更通过功能实验验证了 MoDM 在 PD-L1 介导神经保护中的中介地位。上述发现拓展了对免疫检查点作用机制的理解,提示未来缺血性卒中免疫治疗策略中应重视 MoDM 的靶向调控,并探索其与免疫检查点干预的协同潜能。

### 3.2 MoDM 参与 PD-L1 调控的 PI3K/Akt 通路与巨噬细胞活化机制

PI3K/Akt 信号通路在调控缺血性卒中后免疫炎症反应中发挥着关键作用,既参与细胞存活、代谢调节与应激响应,也广泛介入免疫细胞的活化状态与功能塑型<sup>[112]</sup>。已有研究表明,该通路的激活可通过负向调节 NF- $\kappa$ B 信号,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等促炎因子的表达,从而减轻缺血性脑组织的继发性损伤<sup>[113]</sup>。本研究发现,在 PD-L1 mAb 干预下,小鼠缺血脑组织中 PI3K 及其下游效应分子 p-Akt 在 MoDM 中表达显著上调,提示 PD-L1 信号可能通过 MoDM 介导 PI3K/Akt 通路的激活,参与缺血性卒中后炎症反应的调控。进一步通过 Clo-Lip 选择性清除 MoDM 后观察到,PD-L1 mAb 诱导的 PI3K/Akt 活化趋势明显削弱,提示 MoDM 在该通路的信号传导中发挥着不可或缺的作用。

除炎症信号调控外,PI3K/Akt 通路还被广泛认为是巨噬细胞表型极化的关键调控因子。既往研究显示,该通路的持续活化可抑制 M1 型极化所需的分子程序(如 iNOS、CD86 等),同时上调 Arg-1、CD163 等 M2 型标志物,促进巨噬细胞向抗炎修复方向转化;而其受抑则会增强 M1 型趋向,激发促炎功能<sup>[114, 115]</sup>。在本课题中,我们观察到,PD-L1 mAb 处理后 MoDM 中 iNOS<sup>+</sup>细胞的比例显著下降,并与 PI3K/Akt 信号上调趋势一致,提示 PD-L1 可能通过 MoDM 内源性 PI3K/Akt 通路的激活,抑制其 M1 型极化倾向,进而实现抗炎效应的诱导。相应地,在 MoDM 清除模型中,上述调节效应不再出现,转录组测序结果亦显示多

个促炎通路（包括 TNF 信号、趋化因子轴）重新上调，进一步从功能丧失的角度验证了 MoDM 在 PD-L1 介导免疫调控中的中枢地位。

MoDM 作为缺血性卒中后募集至缺血脑组织的主要外周髓系细胞类型，其表型具有高度的可塑性，可根据局部微环境信号的变化趋向于 M1 或 M2 型极化<sup>[116]</sup>。文献报道表明，在缺血性卒中早期 MoDM 多呈 M1 型表型，释放炎症因子以清除坏死组织；而在恢复阶段，则逐步转向 M2 型，参与炎症抑制和组织修复<sup>[115, 117]</sup>。虽然本研究未设置时间序列以动态监测 MoDM 极化状态的变化，但横断面结果提示，在 PD-L1 mAb 干预下，MoDM 呈现出促炎极化特征减弱的趋势，结合通路活化和表型变化的双重证据，进一步支持 PD-L1–MoDM–PI3K/Akt 信号轴在缺血性卒中后免疫调节中的关键作用。

本课题的关键发现在于，系统性揭示了 PD-L1 可通过调控 MoDM 中 PI3K/Akt 信号通路，从而影响其极化方向，介导缺血性卒中后的免疫炎症反应。这一发现不仅深化了对 PD-L1 作用机制的认识，尤其是在髓系免疫细胞层面的延展，也首次明确了 MoDM 在 PD-L1 信号效应中的双重角色：既是信号通路的响应细胞，也是功能调节的执行效应者。相较于既往研究多聚焦于 T 细胞或中枢常驻小胶质细胞所揭示的 PD-L1 调控模式，本研究从外周免疫系统的角度出发，突出了 MoDM 在缺血性卒中后免疫应答与炎症缓解过程中的关键地位。综上所述，本研究结果支持 PD-L1–MoDM–PI3K/Akt 通路在缺血性卒中后免疫调控中可能发挥关键作用，为进一步探索外周髓系细胞在缺血性卒中炎症响应中的功能机制提供了理论支撑。

### 3.3 MoDM 介导 PD-L1 相关免疫细胞浸润与炎症通路调控

在缺血性卒中后炎症反应中，外周单核细胞募集至缺血脑组织并分化为单核来源巨噬细胞（MoDM）是中枢免疫重塑的关键步骤之一<sup>[118]</sup>。已有研究表明，Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>单核细胞在缺血性卒中后 24 小时内开始浸润缺血半球，并在第 3 至 7 天达到峰值，随后数量逐渐下降，而部分细胞则在脑组织中持续存在并转化为 CX3CR1<sup>+</sup>的修复型巨噬细胞，直至缺血性卒中后第 14 至 28 天<sup>[23]</sup>。这些浸润的 MoDM 具有高度可塑性，其募集过程受 CCL2/CCR2 轴调控，而其在组织内的定向分布则与 CX3CR1、局部黏附分子表达等密切相关<sup>[71]</sup>。MoDM 不仅参与病灶清除和炎症放大过程，还可能通过调节细胞因子网络，影响免疫细胞的

募集与活化，在连接中枢与外周免疫之间发挥重要作用<sup>[116]</sup>。

在免疫细胞亚群特异性分析中，我们观察到缺血性卒中脑组织中 PD-L1 主要在募集的 MoDM 群体中高表达，而非常驻小胶质细胞或其他细胞类型。这一结果提示 MoDM 不仅是 PD-L1 信号的响应细胞，更可能是其主要的表达来源。在此基础上，我们进一步探讨其是否参与 PD-L1 介导的免疫调控过程，包括对免疫细胞浸润与炎症通路的影响。免疫细胞组成分析显示，在 PD-L1 mAb 干预条件下，MoDM 清除导致外周 M0 型巨噬细胞比例升高，而 M1/M2 型巨噬细胞及单核细胞比例下降，提示 MoDM 可能通过调节局部炎症信号影响外周免疫细胞的募集与极化状态<sup>[114]</sup>。

进一步的转录组分析结果显示，MoDM 缺失伴随多种趋化因子（如 Ccl4、Ccl7、Cxcl9）表达上调，提示 MoDM 在稳态条件下可能负向调节趋化因子表达，限制促炎细胞的过度募集。GSEA 分析进一步支持了这一观点：PD-L1 mAb 处理可显著抑制趋化因子信号通路及细胞因子受体相互作用通路，而这一抑制作用在 MoDM 缺失后被明显削弱。这些结果表明 MoDM 可能是 PD-L1 介导免疫细胞迁移信号调控的关键中介，在缺血性卒中后免疫稳态维持中发挥桥梁作用。然而，本研究的机制推断主要基于细胞亚群构成变化与转录组通路富集结果，尚缺乏对 MoDM 调控免疫细胞迁移行为的直接实验证据。未来可考虑通过体外趋化实验、Transwell 迁移实验或体内免疫细胞追踪等功能性实验，明确 MoDM 是否具备调控其他免疫细胞迁移、归巢或定向募集的能力，从而进一步验证其在免疫重塑中的作用机制。

在免疫信号传导层面，PD-L1 诱导的 PI3K/Akt 通路激活亦依赖 MoDM 的存在。已有研究指出，PI3K/Akt 信号可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CCL2 等炎症因子的表达，从而减轻局部促炎环境<sup>[119, 120]</sup>。本研究发现，PD-L1 mAb 可显著增强 MoDM 中 PI3K/Akt 通路活性，并伴随炎症通路下调，提示 MoDM 可能通过 PI3K/Akt 依赖机制调节炎症迁移轴活性，从而参与 PD-L1 的免疫抑制功能。MoDM 的清除不仅削弱了 PI3K/Akt 活化，也解除 PD-L1 mAb 对炎症趋化信号的负调控，最终导致免疫细胞构成和信号通路的双重改变。

综上所述，MoDM 在 PD-L1 介导的免疫调控中不仅是信号响应与执行细胞，更是 PD-L1 的重要表达来源。其通过调节 PI3K/Akt 通路与炎症迁移通路，影响

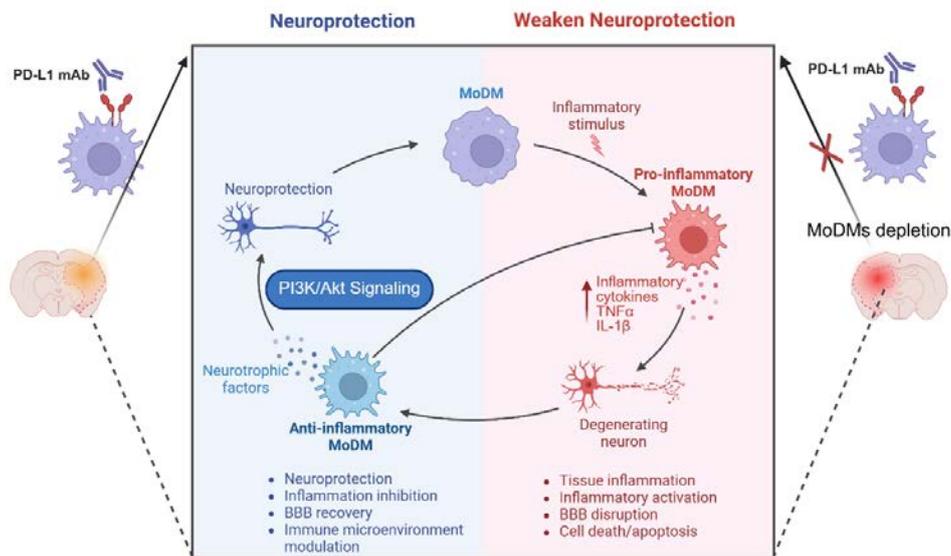
缺血性卒中后免疫细胞的募集与活化。MoDM 的缺失削弱了 PD-L1 的信号调节功能，并显著改变免疫细胞组成和炎症通路活性，进一步证实了其在缺血性卒中炎症调控网络中的关键作用。该发现丰富了对 PD-L1 髓系免疫机制的理解，也为靶向 MoDM 的免疫干预策略提供了理论基础与实验证据支持。

## 4 结论

**4.1** 缺血性卒中后脑组织中 PD-L1 主要表达于大量募集的 MoDM，构成局部免疫调控的关键信号来源。

**4.2** MoDM 的存在对于 PD-L1 中和抗体发挥神经保护作用至关重要，其缺失明显减弱治疗对脑损伤、神经功能及细胞存活的改善效果。

**4.3** MoDM 通过抑制促炎活化、维持 PI3K/Akt 信号活性并调控免疫微环境，在缺血性卒中后炎症控制与组织修复中发挥核心作用，明确其为 PD-L1 靶向干预的重要细胞基础。



注：本图概括了 PD-L1 在缺血性卒中后神经保护中的作用机制及 MoDM 的关键调节地位。缺血性卒中诱导大量 MoDM 募集至脑组织，并成为局部 PD-L1 表达的主要来源。PD-L1 mAb 治疗可促进 MoDM 极化为抗炎表型，激活 PI3K/Akt 信号通路，增强神经营养因子表达，从而抑制炎症反应、维持血脑屏障完整性并减轻神经元损伤。然而，MoDM 清除后上述保护效应显著减弱，PD-L1 介导的免疫调控功能亦随之受损，提示 MoDM 在 PD-L1 干预中的核心中介作用。

**图 4.13 PD-L1 通过 MoDM 介导缺血性卒中后免疫调控与干预机制**

**Fig. 4.13 PD-L1-mediated post-ischemic stroke immune regulation and therapeutic mechanism via MoDM**

## 第五部分 结论与展望

### 1 全文总结

本研究聚焦于程序性死亡配体 1 (PD-L1) 在缺血性卒中免疫调控中的作用机制, 围绕“PD-L1-MoDM 轴”展开系统性研究, 结合人源免疫组学数据与动物实验, 明确其在炎症调控与神经保护中的关键功能。主要研究结论如下(图 5.1):

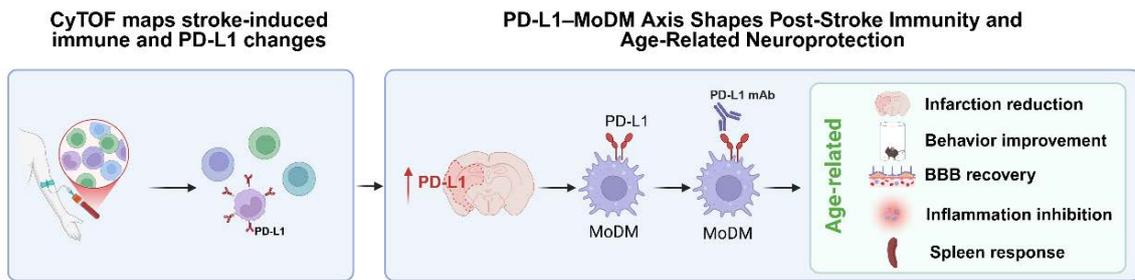
- 1.1 缺血性卒中后, 外周单核细胞的组成发生显著变化, 经典单核细胞比例升高, 中间型单核细胞减少, 伴随 PD-1 和 PD-L1 表达水平整体下调。
- 1.2 在动物模型中, PD-L1 中和抗体可减轻脑组织损伤、改善神经功能及血脑屏障完整性, 其治疗效果在不同年龄组中存在差异。
- 1.3 单核来源巨噬细胞 (MoDM) 是卒中脑组织中 PD-L1 的主要来源, PD-L1 抗体主要通过 MoDM 介导其免疫调节与神经保护效应。

### 2 展望

基于上述研究结果, 本文进一步提出以下展望, 以期后续机制解析与治疗策略优化提供理论支持和实验参考:

- 2.1 机制验证层面: 尽管本研究通过 Clo-Lip 技术实现了 MoDM 的功能性清除, 但尚缺乏遗传水平的直接证据。未来可利用 LysM-Cre、CX3CR1-Cre 或 CCR2-Cre 等髓系特异性系统, 联合 PD-L1 条件性敲除小鼠, 构建髓系特异性 PD-L1 缺失模型, 从遗传层面精准验证 MoDM 是否为 PD-L1 信号介导免疫调控与神经保护的必要中介。
- 2.2 临床转化路径: 本研究基于动物模型验证 PD-L1 阻断干预的神经保护效应, 未来研究可聚焦于 PD-L1 干预剂型优化、给药时机和靶向递送技术开发, 并开展非人灵长类模型或临床前研究, 推动其向临床免疫治疗的可转化进展。
- 2.3 衰老与个体化治疗策略拓展: 鉴于本研究揭示了 PD-L1 调控在不同年龄群体中作用的差异性, 未来研究可进一步结合免疫衰老机制, 开发适用于不同年龄人群的个体化免疫干预方案, 提升缺血性卒中后免疫治疗的精准性与广泛适应性。

综上所述, PD-L1-MoDM 轴在缺血性卒中后的免疫调控中发挥关键作用, 具有重要的临床干预潜力。本研究为缺血性卒中后炎症调控机制提供了新的认识, 也为开发靶向髓系细胞的免疫治疗策略奠定了理论基础。



注：本图总结展示了 PD-L1 在缺血性卒中免疫调控中的关键作用路径。缺血性卒中引起外周单核细胞构成变化（cMono 上升，PD-L1 表达下调），部分单核细胞迁移至脑组织并分化为 MoDM，成为脑组织中 PD-L1 的主要表达来源。PD-L1 通过 MoDM 参与炎症调节、血脑屏障修复和细胞凋亡控制，从而实现神经保护作用。PD-L1 中和抗体干预在青年动物中疗效更为显著，MoDM 清除可削弱干预效果，提示 MoDM 在 PD-L1 相关免疫调控中发挥关键调节作用。

图 5.1 PD-L1 介导的免疫调控在缺血性卒中神经保护及干预机制中的作用研究

Fig. 5.1 The role of PD-L1-mediated immune regulation in neuroprotection and the mechanisms of its therapeutic intervention after ischemic stroke

参考文献

- [1] Wu S, Wu B, Liu M, Chen Z, Wang W, Anderson CS, Sandercock P, Wang Y, Huang Y, Cui L. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *The Lancet Neurology*, 2019, 18(4): 394-405.
- [2] Liu M, Wu B, Wang W-Z, Lee L-M, Zhang S-H, Kong L-Z. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies [J]. *The Lancet Neurology*, 2007, 6(5): 456-64.
- [3] O'donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study [J]. *The Lancet*, 2010, 376(9735): 112-23.
- [4] 国家卫生健康委脑卒中防治工程委员会,中华医学会神经外科学分会神经介入学组,中华医学会放射学分会介入学组,等.急性大血管闭塞性缺血性卒中血管内治疗中国专家共识(2019年修订版)[J]. 2019.DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2019.09.002.
- [5] Campbell B. V, De Silva, DA, Macleod, M [J]. R, Coutts, SB, Schwamm, LH, & Davis, S M, 2019,, 5(1): 70.
- [6] Ebrahimi N, Abdulwahid A-HRR, Mansouri A, Karimi N, Bostani RJ, Beiranvand S, Adelian S, Khorram R, Vafadar R, Hamblin MR. Targeting the NF- $\kappa$ B pathway as a potential regulator of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2024, 81(1): 106.
- [7] Joo SP, Xie W, Xiong X, Xu B, Zhao H. Ischemic postconditioning protects against focal cerebral ischemia by inhibiting brain inflammation while attenuating peripheral lymphopenia in mice [J]. *Neuroscience*, 2013, 243:149-57.
- [8] Gu LJ, Xiong XX, Ito T, Lee J, Xu BH, Krams S, Steinberg GK, Zhao H. Moderate hypothermia inhibits brain inflammation and attenuates stroke-induced immunodepression in rats [J]. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2014, 20(1): 67-75.
- [9] Liu C, Yang J, Zhang C, Geng X, Zhao H. Remote ischemic conditioning reduced cerebral ischemic injury by modulating inflammatory responses and ERK activity in type 2 diabetic mice [J]. *Neurochemistry international*, 2020, 135:104690.
- [10] Fang W, Zhai X, Han D, Xiong X, Wang T, Zeng X, He S, Liu R, Miyata M, Xu B. CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional

- recovery after ischemic stroke in mice [J]. *Theranostics*, 2018, 8(13): 3530.
- [11] Wang Y, Jin H, Wang Y, Yao Y, Yang C, Meng J, Tan X, Nie Y, Xue L, Xu B. Sult2b1 deficiency exacerbates ischemic stroke by promoting pro-inflammatory macrophage polarization in mice [J]. *Theranostics*, 2021, 11(20): 10074.
- [12] Liesz A, Zhou W, Na S-Y, Hämmerling GJ, Garbi N, Karcher S, Mracsko E, Backs J, Rivest S, Veltkamp R. Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke [J]. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33(44): 17350-62.
- [13] Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke [J]. *Neurological research*, 2008, 30(8): 783-93.
- [14] Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke [J]. *Journal of neuroinflammation*, 2019, 16(1): 1-24.
- [15] Zhu Y, Duan S, Wang M, Deng Z, Li J. Neuroimmune interaction: A widespread mutual regulation and the weapons for barrier organs [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10:906755.
- [16] Kim J, Erice C, Rohlwick UK, Tucker EW. Infections in the developing brain: The role of the neuro-immune axis [J]. *Frontiers in Neurology*, 2022, 13:805786.
- [17] Cui P, McCullough LD, Hao J. Brain to periphery in acute ischemic stroke: mechanisms and clinical significance [J]. *Frontiers in neuroendocrinology*, 2021, 63:100932.
- [18] Zhang SR, Phan TG, Sobey CG. Targeting the immune system for ischemic stroke [J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2021, 42(2): 96-105.
- [19] Klegeris A. Regulation of neuroimmune processes by damage-and resolution-associated molecular patterns [J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(3): 423.
- [20] Bustamante A, Simats A, Vilar-Bergua A, García-Berrocso T, Montaner J. Blood/brain biomarkers of inflammation after stroke and their association with outcome: from C-reactive protein to damage-associated molecular patterns [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13:671-84.
- [21] Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-70.
- [22] Jian Z, Liu R, Zhu X, Smerin D, Zhong Y, Gu L, Fang W, Xiong X. The involvement and therapy target of immune cells after ischemic stroke [J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10:2167.

- [23] Wicks EE, Ran KR, Kim JE, Xu R, Lee RP, Jackson CM. The translational potential of microglia and monocyte-derived macrophages in ischemic stroke [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13:897022.
- [24] Darwish SF, Elbadry AM, Elbokhomy AS, Salama GA, Salama RM. The dual face of microglia (M1/M2) as a potential target in the protective effect of nutraceuticals against neurodegenerative diseases [J]. *Frontiers in Aging*, 2023, 4:1231706.
- [25] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. *Cancer cell*, 2015, 27(4): 450-61.
- [26] Kim JE, Patel K, Jackson CM. The potential for immune checkpoint modulators in cerebrovascular injury and inflammation [J]. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2021, 25(2): 101-13.
- [27] Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2018, 11:1-20.
- [28] Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells [J]. *Immunology and cell biology*, 2018, 96(1): 21-33.
- [29] Kuol N, Stojanovska L, Nurgali K, Apostolopoulos V. PD-1/PD-L1 in disease [J]. *Immunotherapy*, 2018, 10(2): 149-60.
- [30] Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. Programmed death-1 pathway limits central nervous system inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2578-83.
- [31] Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. IL-10-producing B-cells limit CNS inflammation and infarct volume in experimental stroke [J]. *Metabolic brain disease*, 2013, 28:375-86.
- [32] Bodhankar S, Chen Y, Lapato A, Dotson AL, Wang J, Vandenbark AA, Saugstad JA, Offner H. PD-L1 monoclonal antibody treats ischemic stroke by controlling central nervous system inflammation [J]. *Stroke*, 2015, 46(10): 2926-34.
- [33] Gilman NV. Analysis for science librarians of the 2018 nobel prize in physiology or medicine: The life and work of James P. Allison and Tasuku Honjo [J]. *Science & Technology Libraries*, 2019, 38(1): 1-29.

- [34] Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24:65-97.
- [35] Kozłowski M, Borzyszkowska D, Cymbaluk-Płoska A. The Role of TIM-3 and LAG-3 in the Microenvironment and Immunotherapy of Ovarian Cancer [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(11): 2826.
- [36] Shibru B, Fey K, Fricke S, Blaudszun A-R, Fürst F, Weise M, Seiffert S, Weyh MK, Köhl U, Sack U. Detection of immune checkpoint receptors—a current challenge in clinical flow cytometry [J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12:694055.
- [37] Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed death-1 (PD-1): PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(11): 7372-9.
- [38] Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4 [J]. *Nature immunology*, 2005, 6(3): 280-6.
- [39] Fife BT, Griffin MD, Abbas AK, Locksley RM, Bluestone JA. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116(8): 2252-61.
- [40] Zhao J, Roberts A, Wang Z, Savage J, Ji R-R. Emerging role of PD-1 in the central nervous system and brain diseases [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2021, 37(8): 1188-202.
- [41] Chen H, Zha J, Tang R, Chen G. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3): Solving a key puzzle in autoimmune diseases [J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 121:110418.
- [42] Liu Y, Chen S, Liu S, Wallace KL, Zille M, Zhang J, Wang J, Jiang C. T-cell receptor signaling modulated by the co-receptors: Potential targets for stroke treatment [J]. *Pharmacological Research*, 2023, 192:106797.
- [43] Huang L. Increased systemic immune-inflammation index predicts disease severity and functional outcome in acute ischemic stroke patients [J]. *The neurologist*, 2023, 28(1): 32-8.
- [44] Huang Y-W, Yin X-S, Li Z-P. Association of the systemic immune-inflammation index (SII) and clinical outcomes in patients with stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13:1090305.
- [45] Zhang Y, Xing Z, Zhou K, Jiang S. The predictive role of systemic inflammation response

index (SIRI) in the prognosis of stroke patients [J]. *Clinical interventions in aging*, 2021, 1997-2007.

[46] Xiong Y, Gu H, Zhao X-Q, Yang X, Wang C, Wang Y-L, Liu L-P, Zhou Q, Fisher M, Li Z. Clinical characteristics and in-hospital outcomes of varying definitions of minor stroke: from a large-scale nation-wide longitudinal registry [J]. *Stroke*, 2021, 52(4): 1253-8.

[47] Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, Martin RH, Moy CS, Barsan WG, Waldman BD, Tamariz D, Ryckborst KJ, Alias, Neurological Emergencies Treatment Trials I. High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) Part 2: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(11): 1049-58.

[48] Pancioli AM, Adeoye O, Schmit PA, Khoury J, Levine SR, Tomsick TA, Sucharew H, Brooks CE, Crocco TJ, Gutmann L, Hemmen TM, Kasner SE, Kleindorfer D, Knight WA, Martini S, McKinney JS, Meurer WJ, Meyer BC, Schneider A, Scott PA, Starkman S, Warach S, Broderick JP, Investigators C-E. Combined approach to lysis utilizing eptifibatid and recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke-enhanced regimen stroke trial [J]. *Stroke*, 2013, 44(9): 2381-7.

[49] Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U, Investigators SIT. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(6): 562-71.

[50] Gittins M, Lugo-Palacios D, Vail A, Bowen A, Paley L, Bray B, Tyson S. Stroke impairment categories: A new way to classify the effects of stroke based on stroke-related impairments [J]. *Clinical Rehabilitation*, 2021, 35(3): 446-58.

[51] Roberts PS, Krishnan S, Burns SP, Ouellette D, Pappadis MR. Inconsistent classification of mild stroke and implications on health services delivery [J]. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 2020, 101(7): 1243-59.

[52] Merlino G, Smeralda C, Lorenzut S, Gigli GL, Surcinelli A, Valente M. To treat or not to treat: Importance of functional dependence in deciding intravenous thrombolysis of “mild stroke” patients [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(3): 768.

[53] Ferrari J, Reynolds A, Knoflach M, Sykora M. Acute ischemic stroke with mild symptoms—to thrombolysed or not to thrombolysed? [J]. *Frontiers in Neurology*, 2021, 12:760813.

[54] Wang Y, Xu B, Xue L. Applications of CyTOF in Brain Immune Component Studies [J].

Engineering, 2022, 16:187-97.

[55] Li Y, Wang Y, Yao Y, Griffiths BB, Feng L, Tao T, Wang F, Xu B, Stary CM, Zhao H. Systematic Study of the Immune Components after Ischemic Stroke Using CyTOF Techniques [J].

J Immunol Res, 2020, 2020:9132410.

[56] Wang Y, Jin H, Wang Y, Yao Y, Yang C, Meng J, Tan X, Nie Y, Xue L, Xu B, Zhao H, Wang F. Sult2b1 deficiency exacerbates ischemic stroke by promoting pro-inflammatory macrophage polarization in mice [J]. Theranostics, 2021, 11(20): 10074-90.

[57] Yao Y, Li Y, Ni W, Li Z, Feng L, Wang Y, Meng J, Zhao H. Systematic Study of Immune Cell Diversity in ischemic postconditioning Using High-Dimensional Single-Cell Analysis with Mass Cytometry [J]. Aging Dis, 2021, 12(3): 812-25.

[58] Yao Y, Ni W, Feng L, Meng J, Tan X, Chen H, Shen J, Zhao H. Comprehensive immune modulation mechanisms of Angong Niuhuang Wan in ischemic stroke: Insights from mass cytometry analysis [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(7): e14849.

[59] Moawad MHED, Salem T, Alaaeldin A, Elaraby Y, Awad PD, Khalifa AA, Naggar AE, Mohamed KA, Elhalal M, Badr M. Safety and efficacy of intravenous thrombolysis: a systematic review and meta-analysis of 93,057 minor stroke patients [J]. BMC neurology, 2025, 25(1): 33.

[60] Xiong Y, Wakhloo AK, Fisher M. Advances in acute ischemic stroke therapy [J]. Circulation research, 2022, 130(8): 1230-51.

[61] Dai Y, Zhan Y, Lu M, He Z, Liu Y. Advances in the Mechanisms of Hemorrhagic Transformation and Therapeutic Agents after Intravenous Thrombolysis in Ischemic Stroke [J]. Yangtze Medicine, 2024, 8(1): 29-40.

[62] Kovács KB, Bencs V, Hudák L, Oláh L, Csiba L. Hemorrhagic transformation of ischemic strokes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(18): 14067.

[63] Simats A, Liesz A. Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities [J]. EMBO molecular medicine, 2022, 14(9): e16269.

[64] Endres M, Moro MA, Nolte CH, Dames C, Buckwalter MS, Meisel A. Immune pathways in etiology, acute phase, and chronic sequelae of ischemic stroke [J]. Circulation research, 2022, 130(8): 1167-86.

[65] Wang R, Liu Y, Ye Q, Hassan SH, Zhao J, Li S, Hu X, Leak RK, Rocha M, Wechsler LR. RNA sequencing reveals novel macrophage transcriptome favoring neurovascular plasticity after

- ischemic stroke [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2020, 40(4): 720-38.
- [66] Leng X, Wang D. minor stroke is not minor [M]. BMJ Publishing Group Ltd. 2023.
- [67] Chen H, Khunte M, Malhotra A, Gandhi D, Colasurdo M. Endovascular thrombectomy versus medical management for moderate-to-severe anterior cerebral artery occlusion stroke [J]. *Journal of Neurology*, 2024, 271(9): 6247-54.
- [68] Krawczyk RS, Christoffersen LC, Danielsen AK, Kruuse C. Motivators for physical activity in patients with minor stroke: a qualitative study [J]. *Disability and Rehabilitation*, 2023, 45(2): 277-85.
- [69] Qiu Y-m, Zhang C-l, Chen A-q, Wang H-l, Zhou Y-f, Li Y-n, Hu B. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: targets for immune therapy? [J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12:678744.
- [70] Zhao H, Li Y, Zhang Y, He W-Y, Jin W-N. Role of immune and inflammatory mechanisms in stroke: a review of current advances [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2022, 29(4): 255-68.
- [71] Bai M, Sun R, Cao B, Feng J, Wang J. Monocyte-related cytokines/chemokines in cerebral ischemic stroke [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2023, 29(12): 3693-712.
- [72] Cho Y-E, Lee H, Bae HR, Kim H, Yun S, Vorn R, Cashion A, Rucker MJ, Afzal M, Latour L. Circulating immune cell landscape in patients who had mild ischaemic stroke [J]. *Stroke and vascular neurology*, 2022, 7(4):
- [73] Wu F, Liu Z, Zhou L, Ye D, Zhu Y, Huang K, Weng Y, Xiong X, Zhan R, Shen J. Systemic immune responses after ischemic stroke: from the center to the periphery [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13:911661.
- [74] Lei T-Y, Ye Y-Z, Zhu X-Q, Smerin D, Gu L-J, Xiong X-X, Zhang H-F, Jian Z-H. The immune response of T cells and therapeutic targets related to regulating the levels of T helper cells after ischaemic stroke [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18:1-17.
- [75] Huang W, Wang J, Liu C, Yang C, Chen Z, Ding J, Jiang W, Wang Y, Meng Y, Li L. Norepinephrine promotes activated B cells to identify and kill effector CD8<sup>+</sup> T cells through FasL/Fas pathway in spleen mononuclear cells isolated from experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2025, 125:294-307.
- [76] Porsch F, Mallat Z, Binder CJ. Humoral immunity in atherosclerosis and myocardial infarction: from B cells to antibodies [J]. *Cardiovascular research*, 2021, 117(13): 2544-62.

- [77] Khanam A, Chua JV, Kottilil S. Immunopathology of chronic hepatitis B infection: role of innate and adaptive immune response in disease progression [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5497.
- [78] Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 pathway: signaling, cancer, and beyond [J]. *Regulation of cancer Immune checkpoints: Molecular and cellular mechanisms and therapy*, 2020, 33-59.
- [79] Zhang P, Wang Y, Miao Q, Chen Y. The therapeutic potential of PD-1/PD-L1 pathway on immune-related diseases: Based on the innate and adaptive immune components [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 167:115569.
- [80] Blank-Stein N, Mass E. Macrophage and monocyte subsets in response to ischemic stroke [J]. *European journal of immunology*, 2023, 53(10): 2250233.
- [81] Jo W, Won T, Daoud A, Čiháková D. Immune checkpoint inhibitors associated cardiovascular immune-related adverse events [J]. *Frontiers in immunology*, 2024, 15:1340373.
- [82] Shao Y, Yang WY, Nanayakkara G, Saaoud F, Issa MB, Xu K, Lu Y, Jiang X, Mohsin S, Wang H. Immune Checkpoints Are New Therapeutic Targets in Regulating Cardio-, and Cerebro-Vascular Diseases and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Immunosuppression [J]. *International journal of drug discovery and pharmacology*, 2024, 3(4): 100022.
- [83] Yao Y, Ni W, Feng L, Meng J, Tan X, Chen H, Shen J, Zhao H. Comprehensive immune modulation mechanisms of Angong Niu Huang Wan in ischemic stroke: Insights from mass cytometry analysis [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(7): e14849.
- [84] Yi M, Niu M, Xu L, Luo S, Wu K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2021, 14(1-13).
- [85] Wang X-P, Guo W, Chen Y-F, Hong C, Ji J, Zhang X-Y, Dong Y-F, Sun X-L. PD-1/PD-L1 axis is involved in the interaction between microglial polarization and glioma [J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 133:112074.
- [86] Wei Y, Liang M, Xiong L, Su N, Gao X, Jiang Z. PD-L1 induces macrophage polarization toward the M2 phenotype via Erk/Akt/mTOR [J]. *Experimental cell research*, 2021, 402(2): 112575.
- [87] van Gulijk M, van Krimpen A, Schetters S, Eterman M, van Elsas M, Mankor J, Klaase L, de Bruijn M, van Nimwegen M, van Tienhoven T. PD-L1 checkpoint blockade promotes regulatory T

- cell activity that underlies therapy resistance [J]. *Science Immunology*, 2023, 8(83): eabn6173.
- [88] Beker MC, Aydinli FI, Caglayan AB, Beker M, Baygul O, Caglayan A, Popa-Wagner A, Doeppner TR, Hermann DM, Kilic E. Age-associated resilience against ischemic injury in mice exposed to transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Molecular Neurobiology*, 2023, 60(8): 4359-72.
- [89] Ritzel RM, Lai Y-J, Crapser JD, Patel AR, Schrecengost A, Grenier JM, Mancini NS, Patrizz A, Jellison ER, Morales-Scheihing D. Aging alters the immunological response to ischemic stroke [J]. *Acta neuropathologica*, 2018, 136:89-110.
- [90] Manwani B, Liu F, Scranton V, Hammond MD, Sansing LH, McCullough LD. Differential effects of aging and sex on stroke induced inflammation across the lifespan [J]. *Experimental neurology*, 2013, 249:120-31.
- [91] Manwani B, Liu F, Xu Y, Persky R, Li J, McCullough LD. Functional recovery in aging mice after experimental stroke [J]. *Brain, behavior, and immunity*, 2011, 25(8): 1689-700.
- [92] Cunnane SC, Trushina E, Morland C, Prigione A, Casadesus G, Andrews ZB, Beal MF, Bergersen LH, Brinton RD, de la Monte S. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2020, 19(9): 609-33.
- [93] Van Avondt K, Strecker JK, Tulotta C, Minnerup J, Schulz C, Soehnlein O. Neutrophils in aging and aging-related pathologies [J]. *Immunological Reviews*, 2023, 314(1): 357-75.
- [94] Wang C, Börger V, Mohamud Yusuf A, Tertel T, Stambouli O, Murke F, Freund N, Kleinschnitz C, Herz J, Gunzer M. Postischemic neuroprotection associated with anti-inflammatory effects by mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles in aged mice [J]. *Stroke*, 2022, 53(1): e14-e8.
- [95] Kim JE, Lee RP, Yazigi E, Atta L, Feghali J, Pant A, Jain A, Levitan I, Kim E, Patel K. Soluble PD-L1 reprograms blood monocytes to prevent cerebral edema and facilitate recovery after ischemic stroke [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2024, 116:160-74.
- [96] Han R, Luo J, Shi Y, Yao Y, Hao J. PD-L1 (programmed death ligand 1) protects against experimental intracerebral hemorrhage-induced brain injury [J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2255-62.
- [97] Suenaga J, Hu X, Pu H, Shi Y, Hassan SH, Xu M, Leak RK, Stetler RA, Gao Y, Chen J. White matter injury and microglia/macrophage polarization are strongly linked with age-related

long-term deficits in neurological function after stroke [J]. *Experimental neurology*, 2015, 272:109-19.

[98] Wang Z, Li X, Spasojevic I, Lu L, Shen Y, Qu X, Hoffmann U, Warner DS, Paschen W, Sheng H. Increasing O-GlcNAcylation is neuroprotective in young and aged brains after ischemic stroke [J]. *Experimental neurology*, 2021, 339:113646.

[99] Li W, Wu F, Zhao S, Shi P, Wang S, Cui D. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: A key player in tumor immunotherapy [J]. *Cytokine & growth factor reviews*, 2022, 67:49-57.

[100] Kerneur C, Cano CE, Olive D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13:1026954.

[101] Ren J, Xu B, Ren J, Liu Z, Cai L, Zhang X, Wang W, Li S, Jin L, Ding L. The importance of M1-and M2-polarized macrophages in glioma and as potential treatment targets [J]. *Brain Sciences*, 2023, 13(9): 1269.

[102] Culemann S, Knab K, Euler M, Wegner A, Garibagaoglu H, Ackermann J, Fischer K, Kienhöfer D, Crainiciuc G, Hahn J. Stunning of neutrophils accounts for the anti-inflammatory effects of clodronate liposomes [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2023, 220(6).

[103] Mass E. The stunning clodronate [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2023, 220(6): e20230339.

[104] Uchikawa H, Kameno K, Kai K, Kajiwara S, Fujimori K, Uekawa K, Fujiwara Y, Mukasa A, Kim-Mitsuyama S, Hasegawa Y. Pretreatment with clodronate improved neurological function by preventing reduction of posthemorrhagic cerebral blood flow in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurocritical care*, 2023, 39(1): 207-17.

[105] Gudenschwager Basso EK, Ju J, Soliman E, de Jager C, Wei X, Pridham KJ, Olsen ML, Theus MH. Immunoregulatory and neutrophil-like monocyte subsets with distinct single-cell transcriptomic signatures emerge following brain injury [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 41.

[106] Geng H, Chen L, Tang J, Chen Ya, Wang L. The role of CCL2/CCR2 Axis in cerebral ischemia-reperfusion injury and treatment: from animal experiments to clinical trials [J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(7): 3485.

[107] Xu T, Wang X, Ma C, Ji J, Xu W, Shao Q, Liao X, Li Y, Cheng F, Wang Q. Identification of

potential regulating effect of baicalin on NF $\kappa$ B/CCL2/CCR2 signaling pathway in rats with cerebral ischemia by antibody-based array and bioinformatics analysis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 284:114773.

[108] Werner Y, Mass E, Ashok Kumar P, Ulas T, Händler K, Horne A, Klee K, Lupp A, Schütz D, Saaber F. Cxcr4 distinguishes HSC-derived monocytes from microglia and reveals monocyte immune responses to experimental stroke [J]. *Nature neuroscience*, 2020, 23(3): 351-62.

[109] Kim I-d, Ju H, Minkler J, Madkoo A, Park KW, Cho S. Obesity-induced Ly6CHigh and Ly6CLow monocyte subset changes abolish post-ischemic limb conditioning benefits in stroke recovery [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2024, 44(5): 689-701.

[110] Manenti S, Orrico M, Masciocchi S, Mandelli A, Finardi A, Furlan R. PD-1/PD-L axis in neuroinflammation: new insights [J]. *Frontiers in Neurology*, 2022, 13:877936.

[111] Klement JD, Redd PS, Lu C, Merting AD, Poschel DB, Yang D, Savage NM, Zhou G, Munn DH, Fallon PG. Tumor PD-L1 engages myeloid PD-1 to suppress type I interferon to impair cytotoxic T lymphocyte recruitment [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 620-36. e9.

[112] Qin C, Yang S, Chu Y-H, Zhang H, Pang X-W, Chen L, Zhou L-Q, Chen M, Tian D-S, Wang W. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal transduction and targeted therapy*, 2022, 7(1): 215.

[113] Liu T, Wang W, Li X, Chen Y, Mu F, Wen A, Liu M, Ding Y. Advances of phytotherapy in ischemic stroke targeting PI3K/Akt signaling [J]. *Phytotherapy Research*, 2023, 37(12): 5509-28.

[114] Wang H, Zhang S, Xie L, Zhong Z, Yan F. Neuroinflammation and peripheral immunity: Focus on ischemic stroke [J]. *International immunopharmacology*, 2023, 120:110332.

[115] Lyu J, Xie D, Bhatia TN, Leak RK, Hu X, Jiang X. Microglial/Macrophage polarization and function in brain injury and repair after stroke [J]. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2021, 27(5): 515-27.

[116] Han D, Liu H, Gao Y. The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke [J]. *Neurological Sciences*, 2020, 41(12): 3589-607.

[117] Li Y, Xu X, Wu X, Li J, Chen S, Chen D, Li G, Tang Z. Cell polarization in ischemic stroke: molecular mechanisms and advances [J]. *Neural Regeneration Research*, 2025, 20(3): 632-45.

[118] Hang H, Huang L, Mao Y, Wu G. Immune system perspective in intracerebral hemorrhage Research: A focus on monocytes and Macrophages [J]. *Brain Hemorrhages*, 2024.

- [119] Gu C, Zhang Q, Li Y, Li R, Feng J, Chen W, Ahmed W, Soufiany I, Huang S, Long J. The PI3K/AKT pathway—The potential key mechanisms of traditional Chinese medicine for stroke [J]. *Frontiers in medicine*, 2022, 9:900809.
- [120] Zhu H, Zhang Y, Zhong Y, Ye Y, Hu X, Gu L, Xiong X. Inflammation-mediated angiogenesis in ischemic stroke [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021, 15:652647.

## 综述

# 单核细胞与巨噬细胞亚群的多样性解析：标志物特征与功能研究

杭航 综述 伍国锋 审校

### 概要：

单核细胞和巨噬细胞在免疫系统中发挥关键作用，影响组织稳态、炎症反应以及包括缺血性卒中在内的疾病状态。本综述探讨了单核细胞和巨噬细胞的发现历程、生物标志物、极化机制及在人类和动物模型中的功能性亚群，试图阐明单核细胞与巨噬细胞之间复杂的关系、分化途径及其在免疫应答中的作用。近年来，关于巨噬细胞的极化及功能异质性，特别是在分类和亚群划分方面仍存在争议和知识空白。因此，全面理解单核细胞和巨噬细胞的生长、标志物、极化及功能亚群，将有助于指导针对缺血性卒中的靶向治疗策略及精准医学方法。本综述旨在提供单核细胞与巨噬细胞功能性亚群的详细概述，强调清晰的定义和分类标准对优化疾病诊断和治疗策略的重要性，特别是在缺血性卒中等病理状态下。

### 关键词：

单核细胞；巨噬细胞；极化；免疫系统；组织稳态

## 1 引言

人类免疫系统一直是学术界和研究领域的关注重点。在缺血性卒中研究中，免疫系统的作用日益受到重视，尤其是单核细胞和巨噬细胞如何影响缺血性卒中的预后和恢复。免疫系统主要分为两大类：先天免疫，包括巨噬细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞、肥大细胞和树突状细胞；适应性免疫，包括 B 细胞和 T 细胞<sup>[1]</sup>。这些免疫成分协同作用，以应对组织损伤、感染等不良刺激<sup>[1]</sup>。其中，巨噬细胞是先天免疫系统的重要组成部分，作为宿主防御机制的核心<sup>[2]</sup>。

单核细胞和巨噬细胞因其高度的可塑性，在先天免疫系统中占据核心地位，

并在先天免疫与适应性免疫之间架起桥梁。巨噬细胞作为免疫系统的守护者，不仅吞噬病原体和细胞碎片，还作为专业抗原呈递细胞，在先天免疫应答中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。它们主要以两种形式存在：血液循环中的单核细胞衍生巨噬细胞（MoDM）和组织驻留型巨噬细胞（如破骨细胞、神经胶质细胞、肺泡巨噬细胞和库普弗细胞）<sup>[4-6]</sup>。由于缺血性卒中对多个器官（如肝脏、肺、骨髓、心脏、肠道和淋巴结）产生广泛的系统性影响，理解这些器官中巨噬细胞的功能及调控机制至关重要。

在单核细胞和巨噬细胞的研究领域，近年来取得了显著进展，发现了多种细胞表面标志物和功能特征，使这些细胞得以被划分为特定的亚群<sup>[7]</sup>。尽管如此，对这些细胞的理解仍存在许多知识空白，显示出巨噬细胞研究仍是一个充满活力并持续发展的领域<sup>[8,9]</sup>。

本综述旨在深入探讨当前对单核细胞和巨噬细胞亚群的认知，重点关注其在人体及主要实验动物（主要是小鼠）中的细胞标志物及功能。我们的目标是阐明这些细胞的重要性，并强调清晰的定义及分类标准的必要性。尽管本综述的重点不完全聚焦于单核细胞和巨噬细胞在缺血性卒中中的作用，但相关信息有助于深入理解这些细胞在健康与疾病状态下的表现，从而应用于包括缺血性卒中在内的多种病理状态，以优化诊断和治疗策略。

## 2 单核细胞和巨噬细胞的起源与发展研究简史

要理解单核细胞和巨噬细胞的复杂性，首先需认识它们作为吞噬细胞的基本属性。吞噬细胞包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞和肥大细胞，这些特殊的细胞在病原体防御中发挥着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。单核细胞和巨噬细胞属于单核吞噬系统（MPS），广泛分布于血液和组织中，是机体抗病原体防御的重要组成部分<sup>[11]</sup>。

从历史上看，巨噬细胞的发现早于单核细胞（图 1）。俄国科学家Élie Metchnikoff 在 1882 年首次描述了吞噬作用（phagocytosis）。他通过观察海星幼虫对外来物质的吞噬行为，发现了一种能够主动摄取异物的移动细胞，这些细胞后来被确认为哺乳动物的巨噬细胞<sup>[12]</sup>。随后，在人类和小鼠等物种中，研究证实了巨噬细胞在感染防御和组织修复中的关键作用<sup>[13-18]</sup>。

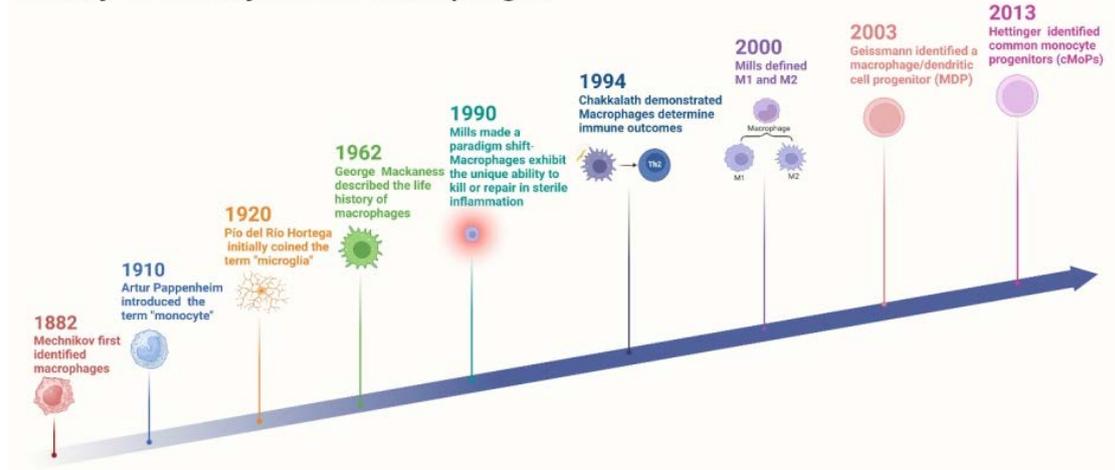
单核细胞的发现较晚，科学家们最初是通过区分不同类型的白细胞，逐步识

别出单核细胞的独立存在。Artur Pappenheim 于 1910 年首次提出了“单核细胞”（monocyte）这一术语<sup>[19]</sup>。单核细胞以其较大的肾形细胞核为特征，被鉴定为一种特殊的循环白细胞亚群<sup>[19]</sup>。这些细胞来源于造血干细胞（HSCs），在骨髓中经历一系列分化阶段，包括共同髓系祖细胞（CMP）和粒-单核细胞祖细胞（GMP）<sup>[20]</sup>。

1920 年，Pío del Río Hortega 提出了“小胶质细胞”（microglia）这一术语，认为其是大脑中的“第三种细胞”，区别于神经元和星形胶质细胞<sup>[21]</sup>。1962 年，George Mackaness 详细研究了巨噬细胞的活化现象，揭示了其在细菌攻击中的作用，这一发现极大地推动了该领域的研究<sup>[22]</sup>。1990 年，科学家们重新评估了长期以来的观点，发现巨噬细胞在无病原体或 T/B 细胞参与的情况下仍可发挥功能，颠覆了适应性免疫主导先天免疫的传统观念<sup>[23]</sup>。

1994 年，研究表明感染 *Leishmania* 的巨噬细胞可刺激 Th2 应答，这一发现表明巨噬细胞本身可能决定免疫反应的方向<sup>[24]</sup>。随后的一系列研究进一步证实，巨噬细胞和先天免疫系统调控几乎所有的免疫反应<sup>[25]</sup>。2000 年，Mills 提出了 M1 和 M2 巨噬细胞极化理论，强调不同的激活模式对免疫反应的影响<sup>[26]</sup>。2003 年，Geissmann 鉴定了一种巨噬细胞/树突状细胞祖细胞（MDP），揭示了树突状细胞与单核细胞之间的联系<sup>[27]</sup>。2013 年，Hettinger 在小鼠骨髓中发现了一种单核细胞祖细胞（cMoP），其可分化为主要的单核细胞亚群和巨噬细胞<sup>[28]</sup>。

### History of Monocytes and Macrophages



注：关键发现包括：Mechnikov 在海星实验中发现巨噬细胞（1882 年）、Pappenheim 提出“单核细胞”概念（1910 年）、del Río Hortega 命名“小胶质细胞”（1920 年）、Mackaness 研究巨噬细胞活化（1962 年）、巨噬细胞在无病原体炎症中的作用被发现（1990 年）、巨噬细

胞对免疫应答的影响（1994年）、Mills 提出 M1/M2 巨噬细胞概念（2000年）、Geissmann 发现巨噬细胞/树突状细胞祖细胞（2003年）、Hettinger 在 小鼠骨髓中鉴定单核细胞祖细胞（2013年）。

图 1 单核细胞和巨噬细胞的起源与发展研究的重要里程碑

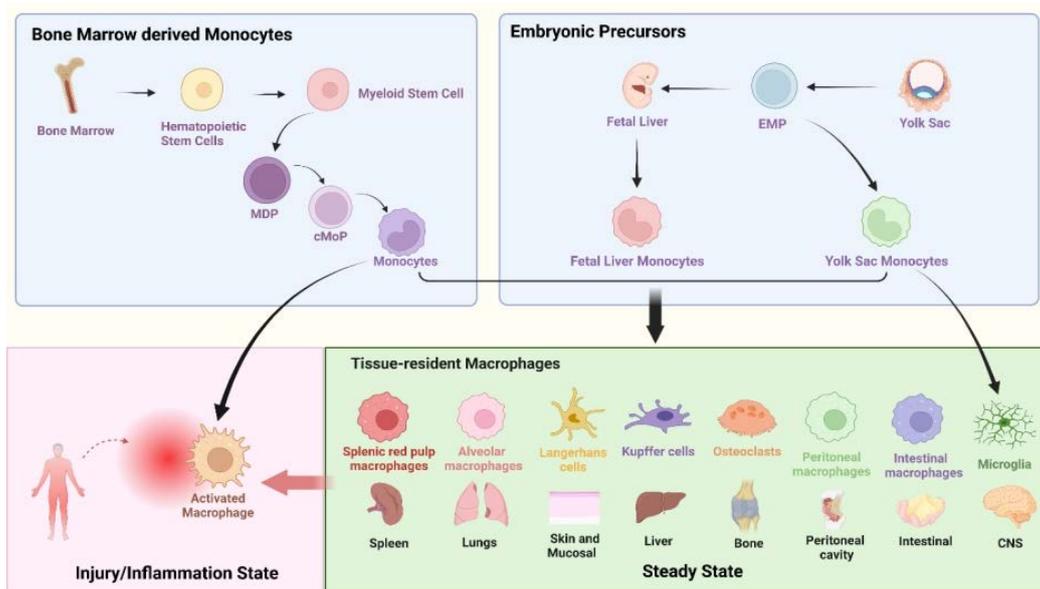
Fig.1 The land marks of research history about the origin and development of Monocytes and Macrophages

### 3 单核细胞与巨噬细胞的关系及差异

单核细胞在骨髓中生成，起源于造血干细胞，并经历共同髓系祖细胞（CMP）和粒-单核细胞祖细胞（GMP）的分化过程<sup>[29]</sup>。它们主要存在于血液循环中，作为前体细胞，在需要时迅速迁移至炎症或损伤部位<sup>[30]</sup>。相较之下，巨噬细胞的起源更具多样性。它们可以由迁移至组织的单核细胞在局部信号的作用下分化而成，也可以来源于胚胎时期的卵黄囊或胎肝前体细胞<sup>[31]</sup>。这些前体细胞在发育过程中进入组织，形成组织驻留型巨噬细胞（图 2）。

值得注意的是，小胶质细胞（microglia）是中枢神经系统的主要驻留巨噬细胞。与可能由单核细胞分化而来的其他组织驻留巨噬细胞不同，小胶质细胞仅源自胚胎期卵黄囊前体细胞<sup>[32]</sup>。这一独特的发育路径造就了一种特化的细胞群体，使其能够维持大脑稳态并应对神经炎症和损伤<sup>[33]</sup>。这种独特的起源进一步揭示了巨噬细胞家族的多样性及免疫系统的高度适应性。

在分布上，单核细胞主要存在于血液中，其半衰期较短（小鼠约 48 小时，人类约 7 天）<sup>[34, 35]</sup>。为了维持其种群稳定，骨髓需要持续补充单核细胞。当机体需要时，单核细胞可迁移至组织，并分化为巨噬细胞或树突状细胞。而巨噬细胞主要驻留于组织中，在感染或损伤发生时进行响应，并维持组织稳态<sup>[36]</sup>。不同组织中的巨噬细胞因环境不同而具有独特性，例如肺泡巨噬细胞（肺）、库普弗细胞（肝脏）和小胶质细胞（大脑）<sup>[37]</sup>。



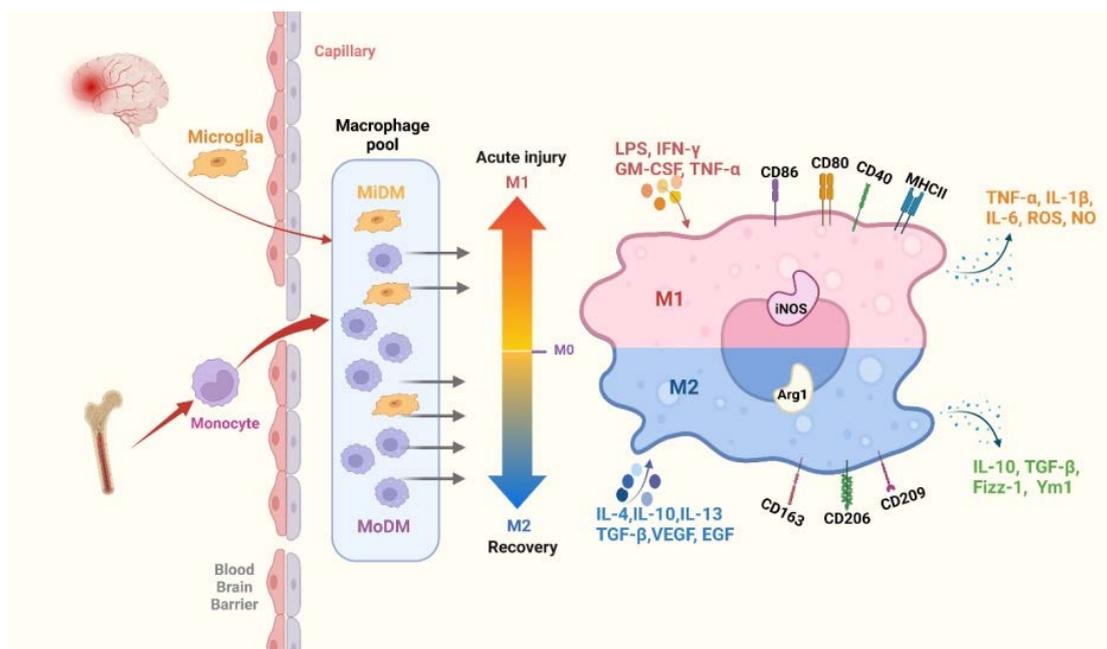
注：单核细胞由骨髓干细胞生成，循环于血液中，并可在组织中分化为巨噬细胞。巨噬细胞具有双重起源：部分由单核细胞分化而来，部分由胚胎时期的卵黄囊或胎肝前体细胞生成，成为组织驻留型巨噬细胞。小胶质细胞与其他巨噬细胞不同，仅来源于卵黄囊前体细胞。

图 2 单核细胞与巨噬细胞的起源、关系及差异

Fig.2 The origin, relationship and difference between monocytes and macrophages

在功能方面，单核细胞主要作为巨噬细胞和树突状细胞的前体<sup>[38]</sup>，同时能够产生促炎细胞因子，如肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 6 (IL-6)，并通过趋化因子招募其他免疫细胞至炎症部位<sup>[39]</sup>。相比之下，巨噬细胞的功能更加广泛，包括吞噬病原体和细胞废物、向 T 细胞呈递抗原，以及释放各种细胞因子和生长因子，以调节炎症、组织修复和血管生成<sup>[40]</sup>。根据环境信号的不同，巨噬细胞可分化为促炎的 M1 型或具有抗炎及组织修复功能的 M2 型<sup>[40]</sup>。

在表型上，单核细胞和巨噬细胞可通过特定的细胞表面标志物加以区分。人类单核细胞通常通过 CD14 和 CD16 的表达来鉴定<sup>[41]</sup>，其中不同亚群根据这些标志物的相对水平进行分类。在小鼠中，单核细胞可通过 CD115 (CSF-1R)、CD11b、Ly6C、CCR2 和 CX3CR1 等标志物鉴定，其中炎症型单核细胞表现出 Ly6C 高表达，而巡逻型单核细胞则 Ly6C 表达较低<sup>[42]</sup>。巨噬细胞的标志物表达因激活状态和组织位置的不同而异。人类和小鼠的巨噬细胞均表现出较强的适应能力，能够根据周围环境的变化调整表型并执行不同的功能。因此，在进行表型鉴定时，需要结合多个标志物和具体的生理背景，以确保准确性<sup>[43]</sup>。



注：缺血性卒中可导致两种不同的巨噬细胞类型的形成：单核细胞衍生的巨噬细胞（MoDM）和小胶质细胞衍生的巨噬细胞（MiDM）。MoDM 是在循环单核细胞穿过受损的血脑屏障后，在局部炎症信号的影响下分化而成。MiDM 则由大脑驻留的小胶质细胞在缺血损伤后激活形成。两类巨噬细胞均可表现出 M1 或 M2 极化特征：M1 巨噬细胞在急性期被激活，产生促炎细胞因子，并表达如 iNOS 和 CD40 等标志物；而 M2 巨噬细胞则主要出现在恢复期，产生抗炎细胞因子，并表达 CD206 和 Arg1 等标志物。

图 3 缺血性卒中后 MoDM 和 MiDM 相关的主要刺激因子、标志物及极化特征

Fig.3 The major primary stimulants, markers and polarization associated with MoDM and MiDM after ischemic stroke

在特定的病理环境中，单核细胞和巨噬细胞之间的相互作用尤为重要，例如缺血性卒中（图 3）。在缺血性卒中的背景下，单核细胞和巨噬细胞的复杂相互作用成为关键因素。缺血性卒中会在大脑中触发一系列复杂的免疫反应<sup>[44]</sup>，其中单核细胞衍生的巨噬细胞（MoDM）<sup>[55]</sup>和小胶质细胞衍生的巨噬细胞（MiDM）<sup>[45, 46]</sup>分别发挥重要作用。

缺血事件发生后，血脑屏障的完整性被破坏，使循环中的单核细胞能够渗透至大脑组织。一旦进入大脑，这些单核细胞便可在局部炎症信号的作用下分化为 MoDM。MoDM 通常表现为促炎表型，通过释放炎症细胞因子和活性氧类物质，加重早期组织损伤<sup>[47, 48]</sup>。然而，它们的功能不仅限于组织破坏，还可在缺血性卒中后期参与组织修复和适应性变化过程，展现出其功能的可塑性。

与此同时，驻留在大脑中的小胶质细胞会迅速对缺血损伤作出反应，并进入激活状态，转变为 MiDM<sup>[46]</sup>。激活的 MiDM 可能对缺血性脑组织产生有害或有益的影响。在缺血事件的早期阶段，MiDM 会促进炎症反应，可能加重神经元损伤。然而，在缺血性卒中恢复的后期阶段，MiDM 可转变为修复表型，参与清除细胞碎片、促进神经再生和突触适应性变化<sup>[49]</sup>。

需要强调的是，MoDM 和 MiDM 之间的功能区分并非绝对固定，两者均表现出表型和功能的异质性，这些差异受缺血性卒中进程阶段及局部微环境的影响。因此，深入了解 MoDM 和 MiDM 的动态相互作用及其在缺血性卒中病理生理学中的作用，可能为开发调节缺血性卒中后炎症反应和促进大脑修复的治疗策略提供新的见解。

总的来说，单核细胞和巨噬细胞虽然不同，但它们之间存在动态关系。单核细胞可在特定条件下转化为巨噬细胞，因此准确的细胞鉴定仍然具有挑战性。同时，不同物种之间的标志物也存在差异，使得动物模型研究的结果难以直接应用于人类。因此，理解单核细胞和巨噬细胞最常见且可靠的标志物至关重要。

## 4 单核细胞和巨噬细胞的生物标志物

尽管单核细胞和巨噬细胞是两种不同的细胞类型，但它们之间具有动态关系，在特定条件下，单核细胞可以转化为巨噬细胞。因此，准确识别和区分这两类细胞较为复杂。此外，不同物种之间的生物标志物存在差异——用于人类细胞的标志物可能与小鼠、大鼠或猪的不同，这使得从动物模型到人类疾病研究的转化充满挑战。

鉴于这些复杂性，理解和识别单核细胞和巨噬细胞最常见且可靠的生物标志物至关重要。其中，人类和小鼠细胞的相关研究最为广泛，为科研和临床研究提供了丰富的信息。在接下来的章节中，我们将深入探讨这些生物标志物的作用及其局限性。

### 4.1 单核细胞标志物

在识别单核细胞和巨噬细胞的基础上，我们进一步探讨单核细胞标志物的细微差别。这些细胞表面分子可作为特定标志物，使我们能够区分和分类这些重要的免疫细胞。出于本综述的目的，我们将重点关注研究最为深入的两个物种：人类和小鼠。这一分析不仅有助于加深对单核细胞生物学的理解，还能促进实验结

果的解析，并为未来研究的设计提供参考（图4）。

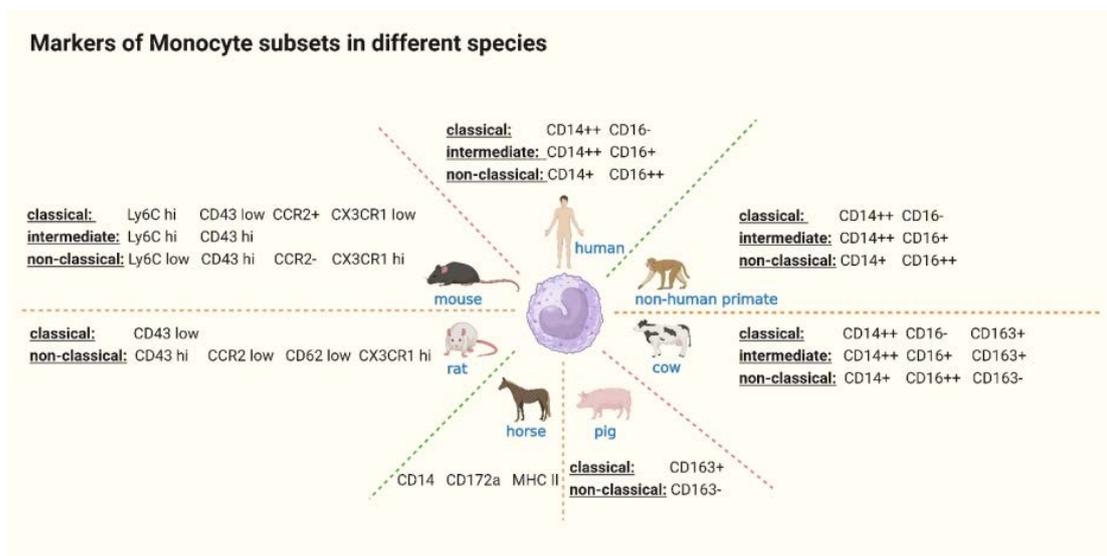


图4 不同物种单核细胞亚群的经典标志物

Fig. 4 Classic markers of monocyte subsets in different species

#### 4.1.1 人类单核细胞标志物

用于鉴定人类单核细胞的最常见标志物是 CD14 和 CD16<sup>[50]</sup>。这些标志物有助于区分不同的单核细胞亚群，并提供有关其功能异质性的宝贵信息。在人类中，已鉴定出三种不同的单核细胞亚群：经典单核细胞（CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>），代表促炎亚群。非经典单核细胞（CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>），与血管监视活动相关<sup>[51]</sup>。中间型单核细胞（CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>），表现出介于经典和非经典单核细胞之间的特征<sup>[52]</sup>。不同单核细胞亚群的功能特性也各不相同。经典单核细胞主要与促炎应答相关。它们高水平表达 CCR2、CD36、CD64 和 CD62L，这些标志物有助于单核细胞迁移至炎症部位并吞噬病原体<sup>[53]</sup>。这些单核细胞参与免疫应答的早期阶段，释放促炎细胞因子，并招募其他免疫细胞至感染或损伤部位。其活化通常与促炎细胞因子的产生相关，例如肿瘤坏死因子 $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）和白细胞介素-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ），从而放大炎症反应<sup>[54]</sup>。中间型和非经典单核细胞通常与抗炎和组织修复功能相关。中间型单核细胞表现出较高水平的 MHC II 类蛋白表达，这表明其可能参与抗原呈递和免疫调节<sup>[55]</sup>。非经典单核细胞（又称巡逻型单核细胞）则表现出独特的基因表达谱，主要参与血管完整性的维持以及组织修复过程<sup>[56]</sup>。这些单核细胞能够巡逻血管内皮，主动扫描潜在威胁，并与内皮细胞相互作用以维持血管稳态。

近年来，单细胞 RNA 测序（Single-cell RNA-seq）技术进一步揭示了四种单

核细胞亚群，包括已知的经典（CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>）和非经典（CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>）单核细胞，还发现了两个新的亚群：Mono3：独特地表达可能影响细胞周期、分化和迁移的基因（如 MXD1、CXCR1、CXCR2、VNN2）。Mono4：表现出细胞毒性基因特征（如 PRF1、GNLY、CTSW），类似于先前报道的“自然杀伤树突状细胞”<sup>[56]</sup>。此外，6-磺基乳糖胺（Slan）被研究为另一种潜在的标志物，以更全面地区分单核细胞亚群。Slan<sup>+</sup> 细胞特征与 CD16<sup>+</sup>非经典单核细胞的特征高度一致<sup>[57]</sup>。研究还发现，经典单核细胞亚群几乎专门表达 CCR2、CXCR1、CXCR2、CLEC4D 和 IL-13R1 等标志物<sup>[58]</sup>。

#### 4.1.2 小鼠单核细胞标志物

小鼠单核细胞的特征主要依赖于 Ly6C 和 CCR2 的表达<sup>[59]</sup>。这些标志物在区分不同单核细胞亚群方面起着关键作用，并提供了关于它们功能特性的宝贵信息。小鼠单核细胞亚群的分类与人类类似，通常分为“经典”（Ly6Chi/CCR2<sup>+</sup>/CD43<sup>low</sup>/CX3CR1<sup>low</sup>）、“中间型”Ly6Chi/CD43<sup>hi</sup>和“非经典”单核细胞（Ly6C<sup>low</sup>/CCR2<sup>-</sup>/CD43<sup>hi</sup>/CX3CR1<sup>hi</sup>）<sup>[50]</sup>。小鼠单核细胞亚群最初的鉴定基于 CX3CR1 启动子驱动 GFP 报告基因表达差异<sup>[60]</sup>。进一步研究揭示了这些亚群在表型和功能上的不同特点，包括它们与血管内皮的相互作用以及细胞因子产生模式。例如，CD43<sup>++</sup>Ly6C<sup>+</sup>CX3CR1<sup>high</sup> 单核细胞亚群在体内与血管内皮的相互作用更强，并且在 TLR4 配体刺激下可产生更高水平的 TNF<sup>[60]</sup>。其他研究进一步揭示了 Ly6C 的表达差异，并发现了相关的受体表达模式。例如，Ly6C<sup>low</sup> 单核细胞的 CD62L 表达水平较低或缺失<sup>[27, 61-63]</sup>。对比人类和小鼠单核细胞亚群的基因表达谱提供了对其相似性和差异性的洞察。尽管两者共享某些特征（例如 Ly6C<sup>low</sup> 小鼠单核细胞富含 Trem14），但在 CD64、CXCR4 和 CD36 等基因的表达模式上仍存在显著差异<sup>[64]</sup>。这些研究强调了理解小鼠单核细胞亚群特定标志物及其功能意义的重要性。

#### 4.1.3 其他物种的单核细胞标志物

除了人类和小鼠的单核细胞标志物，研究还扩展至其他物种，以进一步揭示其免疫特征。研究表明，非人灵长类动物的单核细胞表型特征及亚群分布与人类高度相似。CD14 和 CD16 的表达可用于区分经典（CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>）、中间型（CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>）和非经典（CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>）单核细胞亚群<sup>[65]</sup>。研究还发现，

非人灵长类动物中单核细胞亚群的变化与某些疾病状态相关。此外，CD64、HLA-DR 等标志物的表达已被用于进一步细化对非人灵长类动物单核细胞亚群的理解<sup>[65]</sup>。

Toll 样受体 2 (TLR2) 在循环血单核细胞上的高表达已在人体和两种猕猴物种中得到证实，尤其是在猪尾猕猴 HIV 相关中枢神经系统疾病模型中。因此，TLR2 可作为一个有价值的表面标志物，在某些表型变化影响常规标志物表达的情况下，仍能用于单核细胞的鉴定<sup>[66]</sup>。尽管灵长类动物与人类存在许多相似之处，但最新研究揭示了一些微妙的差异。例如，与人类不同的是，CD16 在灵长类动物中仅在单核细胞和树突状细胞上表达<sup>[67]</sup>。此外，研究表明，CD172g (信号调节蛋白，SIRP，也称 SIRPb2) 在所有已研究的非人灵长类动物的 CD11b+ 单核细胞和粒细胞上表达，但不在 T 细胞上表达<sup>[68]</sup>。在非洲绿猴中，经典单核细胞对 BDCA3 的染色较强，而 BDCA3 通常被认为是人类树突状细胞亚群的标志物<sup>[68]</sup>。另一个例子是 CD56，它在猕猴的单核细胞上表达，而在人类中通常作为 NK 细胞的标准标志物<sup>[69]</sup>。

在大鼠中，单核细胞亚群的分类基于 CD43 的表达水平，其中 CD43++ 细胞表现出较高的 CD4 表达水平。CD43++ 单核细胞包括“经典” (CD43low) 和“非经典” (CD43hi) 亚群，两者在 CCR2 和 CX3CR1 的表达上存在差异<sup>[70, 71]</sup>。

在猪模型中，CD163 的表达可用于定义“经典”(CD163+) 和“非经典”(CD163-) 单核细胞。转录组分析表明，猪的单核细胞与人类单核细胞存在相似性，这表明猪可能是研究单核细胞生物学的有用模型<sup>[72]</sup>。

在牛的研究中，经典、中间型和非经典单核细胞可通过小鼠抗人单克隆抗体 (针对 CD14 和 CD16) 进行鉴定<sup>[73]</sup>。对于马而言，由于其免疫学研究相对较少，目前主要采用 CD14、CD172a (SIRP-alpha) 和 MHC II 等标志物来表征单核细胞，其中 CD14 是一个重要标志物<sup>[74]</sup>。

需要注意的是，尽管这些标志物在不同物种的单核细胞中具有一定的通用性，但它们的表达水平和模式可能因亚群特异性及活化状态的不同而有所变化。因此，仍需进一步研究，以拓展对这些物种单核细胞标志物的理解。

## 4.2 巨噬细胞标志物

### 4.2.1 人类与小鼠巨噬细胞的通用标志物

与单核细胞标志物类似，人类和小鼠的巨噬细胞标志物之间也存在差异。尽管两者均表达一些共同的标志物，但具体的标志物库可能有所不同。一些标志物可能是人类或小鼠巨噬细胞特有的，这主要是由于物种特异性的基因表达模式和免疫应答差异。此外，某些标志物在一种物种中比另一种更常用或研究更深入。因此，在研究和表征巨噬细胞时，应考虑这些物种特异性差异，尤其是在不同实验系统或转化研究中。比较人类和小鼠巨噬细胞的研究有助于识别标志物表达的相似性和差异，并提供对这些细胞功能特性的深入理解（表 1）。

表 1. 人与小鼠中常见的巨噬细胞标志物

Tab. 1. Common macrophage markers in human and mice

Name	Species	Comments	References
F4/80	Mice	An EGF-like transmembrane glycoprotein; expressed on the surface of most tissue macrophages.	[101, 102]
CD11b	Mice Human	An integrin molecule expressed on the surface of myeloid cells, including macrophages. It plays a role in cell adhesion and migration	[103]
CD64 (FcγRI)	Mice Human	An Fc receptor that is highly expressed on macrophages. It is involved in the recognition and phagocytosis of opsonized particles.	[103]
MerTK (c-Mer proto-oncogene tyrosine kinase)	Mice Human	A receptor involved in the clearance of apoptotic cells. It is expressed by tissue-resident macrophages, including microglia in the brain.	[77]
CD68	Mice Human	A glycoprotein that is commonly used as a marker for macrophages and other phagocytic cells.	[104]
CD115 (CSF1R, M-CSFR)	Mice Human	The receptor for colony-stimulating factor 1 (CSF-1), its expression is associated with macrophage lineage commitment.	[105]

表 1 (续表) . 人与小鼠中常见的巨噬细胞标志物

Tab. 1 (Continued) Common macrophage markers in human and mice

Name	Species	Comments	References
CD206 (mannose receptor, MRC1)	Mice  Human	A C-type lectin receptor expressed on the surface of some macrophage subsets. It is involved in binding and endocytosing glycoproteins, particularly those containing mannose residues.	[106]
CD14	Mice  Human	A co-receptor for lipopolysaccharide (LPS) and is expressed on monocytes, macrophages, and some dendritic cells.	[107]
CD169 (Siglec-1)	Human  Mice	A type I transmembrane protein and belongs to the sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (Siglec) family, expressed on macrophages in the subcapsular sinus of lymph nodes and other macrophage subsets in certain tissues.	[108, 109]
CD163	Human	A scavenger receptor and hemoglobin-haptoglobin (Hb-Hp) complex-binding protein that is predominantly expressed on anti-inflammatory M2 macrophages.	[110]
CD11c	Mice  Human	An integrin molecule expressed on the surface of myeloid cells, including macrophages. It plays a role in cell adhesion and migration.	[111, 112]
CD33 (Siglec-3)	Human	A sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (Siglec) expressed on macrophages and myeloid cells.	[113]

需要注意的是, 这并非所有巨噬细胞标志物的列表, 仍有许多其他标志物可用于鉴定和表征人类和小鼠的巨噬细胞。具体标志物的选择取决于研究背景和所关注的巨噬细胞亚群。例如, 功能性标志物 iNOS 和 Arg1 在区分巨噬细胞不同活化状态方面至关重要。iNOS 主要与促炎的 M1 型巨噬细胞相关, 该型巨噬细

胞可产生一氧化氮(NO),这是一种在病原体清除过程中具有细胞毒性的分子<sup>[75]</sup>。相反, Arg1 主要由抗炎的 M2 型巨噬细胞表达,该型细胞在组织修复和免疫调节过程中起重要作用<sup>[76]</sup>。

此外,这些标志物并非巨噬细胞所独有,也可能由其他细胞类型表达。因此,在鉴定巨噬细胞亚群时,通常需要综合多种标志物进行分析。具体的标志物选择应根据研究背景、目标物种以及巨噬细胞的独特特性来确定。

#### 4.2.2 组织驻留巨噬细胞:分布、功能及标志物特征(以小鼠为例)

在介绍了通用巨噬细胞标志物之后,我们进一步探讨不同组织中巨噬细胞群体的多样性(图2)。组织驻留巨噬细胞(tissue-resident macrophages)作为免疫哨兵,不仅在病原体防御中发挥作用,还参与组织形成、适应性变化和稳态维持。单核细胞来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MoDMs)则源自循环单核细胞,在炎症、病原体清除和抗原呈递过程中起关键作用。

巨噬细胞在不同组织中表现出显著的多样性。每种组织驻留巨噬细胞群体都具有独特的分子和功能特征,以适应其特定的生理需求和免疫调控。虽然我们已介绍了一些常见的巨噬细胞标志物及其作用,但应认识到,组织驻留巨噬细胞的鉴定与特征分析仍是研究的热点领域。不同组织可能含有独特的巨噬细胞亚群,因此,需要进一步的研究来全面定义这些细胞的标志物及其功能。不同组织中存在着多种典型的驻留巨噬细胞,它们在维持组织稳态、免疫调节及病原体清除方面发挥关键作用<sup>[77]</sup>。肺泡巨噬细胞位于肺泡内,主要负责清除吸入的颗粒和病原体<sup>[78]</sup>;库普弗细胞分布于肝窦,具有吞噬衰老或损伤红细胞的能力,并在肝脏免疫应答中发挥调节作用<sup>[79]</sup>;小胶质细胞作为中枢神经系统的主要巨噬细胞类型,不仅维持脑部稳态,还参与突触可塑性及神经损伤后的免疫应答<sup>[80]</sup>;朗格汉斯细胞存在于皮肤和黏膜,能够识别和呈递抗原,在皮肤免疫调控中具有重要作用<sup>[81]</sup>。除了这些研究较为深入的驻留巨噬细胞外,其他组织也存在不同类型的巨噬细胞,例如,破骨细胞是骨组织中特化的巨噬细胞,主要负责骨骼适应性变化和修复;腹膜巨噬细胞位于腹腔,参与炎症应答和吞噬作用;脾脏红髓巨噬细胞在清除衰老红细胞及调节脾脏免疫功能方面发挥作用;肾脏巨噬细胞参与肾脏免疫调节和病原体清除;心脏巨噬细胞在心脏组织中负责免疫调控并清除细胞碎片;此外,脂肪组织巨噬细胞在维持代谢稳态和炎症调控过程中同样发挥重要功能<sup>[4]</sup>。

随着巨噬细胞生物学研究的深入，新兴技术（如单细胞 RNA 测序和质谱流式细胞术）正在揭示巨噬细胞的异质性和可塑性。这些工具有助于识别新的标志物，并提供更深入的见解，以理解巨噬细胞亚群的复杂表型和功能。

尽管用于人类和小鼠的单核细胞标志物已经较为成熟，但人类组织或器官中的巨噬细胞标志物研究仍不及小鼠研究深入。在小鼠研究中，已对各组织特异性巨噬细胞群体及其相关标志物进行了详细鉴定，而在人类组织中的巨噬细胞种类和功能仍需要进一步探索。为了提供更全面的概述，表 2 总结了不同组织驻留巨噬细胞的分布、功能及其相关标志物。

表 2 小鼠与人类中巨噬细胞的亚群、分布部位、功能及标志物

Tab. 2. Macrophage subsets and locations, functions, and markers in mice and human

Name	Locations	Mice Markers	Human Markers	References
Alveolar macrophages	The alveoli of the lungs	CD11b, CD11c, Siglec-F, F4/80, CD64, MARCO, CD206, CD68, CD169, MerTK	CD11b, CD11c, CD14, CD68, CD86, CD163, CD206	[114-117]
Kupffer cells	The liver sinusoids	F4/80, CD68, CD11b, CD206, MerTK, CD16/32, TIM-4	CD14, CD68, CD163, CD11b, CD11c, CD206, HLA-DR	[118-121]
Microglia	The central nervous system (CNS)	CD11b, CD45, CD68, CX3CR1, Iba1, TMEM119, P2RY12, Siglec-H, CD172a	CD11b, CD45, CD68, CX3CR1, TMEM119, P2RY12, CD33, TREM2, Siglec1, HLA-DR	[103, 122-126]

表 2 (续表) 小鼠与人类中巨噬细胞的亚群、分布部位、功能及标志物

Tab. 2 (Continued) Macrophage subsets and locations, functions, and markers in mice and

human				
Name	Locations	Mice Markers	Human Markers	References
Langerhans cells	The epidermis of the skin and mucosal epithelia	CD207, CD11c, EpCAM, CD103, MerTK, E-cadherin, CD40, SIRP $\alpha$ , MHC class II	CD1a, CD207, E-cadherin, CD11c, CD83, CD45, HLA-DR, SIRP $\alpha$	[127-132]
Osteoclasts	Bone tissue	CD51, CD61, TRAP, RANK, CTSK, NFATC1, OSCAR, DC-STAMP, Beta3-tublin	CD51, CD61, TRAP, RANK, CTSK, NFATC1, OSCAR, DC-STAMP, Beta3-tublin, CAII	[133-136]
Peritoneal macrophages	The peritoneal cavity	F4/80, CD11b, CD16/32, CD14, MerTK, CD115, CD206, CD80, CD86	CD14, CD68, CD163, CD11b, CD206, F4/80, CD163L1, CD169, CD204	[137, 138]
Splenic macrophages	The red pulp of the spleen	F4/80, CD11b, CD68, MerTK, SIGN-R1, CD169, CD11c, CD206, CD115, CD86, CD80	CD14, CD169, CD11b, CD11c, CD64, CD68, CD163, CD206, HLA-DR, DC-SIGN,	[139-141]

表 2 (续表) 小鼠与人类中巨噬细胞的亚群、分布部位、功能及标志物

Tab. 2 (Continued) Macrophage subsets and locations, functions, and markers in mice and human

Name	Locations	Mice Markers	Human Markers	References
Intestinal macrophages	The intestinal lamina propria and Peyer's patches	F4/80, CD11b, CD68, CD103, CD11c, MerTK, CX3CR1, SIGNR1, CD64, CD80, CD86, MHC class II	CD14, CD68, CD11b, CD11c, CD163, CD206, CD80, CD86, CD64, HLA-DR, CD209, MerTK	[142-144]

尽管表格中列出的标志物有助于区分不同类型的巨噬细胞,但目前组织驻留巨噬细胞的特定标志物鉴定仍在研究中,尚未建立完整的标志物列表。因此,进一步的研究仍然需要深入探索这些细胞的特异性标志物,以全面理解其功能和生物学特性。

## 5 巨噬细胞的极化与功能性亚群

巨噬细胞可以极化为 M1 型和 M2 型,分别代表促炎和抗炎状态。在这些亚群内,进一步存在功能和标志物表达特征的异质性。巨噬细胞的极化和功能性亚群受微环境影响,并在理解免疫应答及开发靶向治疗策略中具有重要意义(图 3)。

### 5.1 巨噬细胞极化: M1 和 M2 表型及其标志物特征

巨噬细胞表现出显著的可塑性,能够根据微环境的变化采取不同的功能表型。其中, M1 和 M2 型巨噬细胞的极化状态已被广泛研究。M1 型巨噬细胞通常与促炎反应相关,而 M2 型巨噬细胞则参与组织修复、免疫调节和抗炎过程。巨噬细胞的极化受多种信号通路和转录因子的复杂相互作用调控,导致不同的基因表达谱和标志物特征。以下部分将详细介绍 M1 和 M2 巨噬细胞的特征、标志物及其极化驱动因素。

巨噬细胞可以呈现不同的活化状态,主要分为 M1 和 M2 功能性表型,二者在功能和标志物表达上存在明显区别: M1 型巨噬细胞(经典激活巨噬细胞, classically activated macrophages) 响应促炎信号,被认为是促炎性

(pro-inflammatory) 的。它们产生大量促炎细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-12, 并释放活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS)。此外, M1 型巨噬细胞表达 iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 和 MHC II 分子等标志物, 在宿主防御中起重要作用。然而, 若过度或长期激活, M1 型巨噬细胞可能导致组织损伤和慢性炎症<sup>[40]</sup>。M2 型巨噬细胞 (替代激活巨噬细胞, alternatively activated macrophages) 响应抗炎信号, 被认为是抗炎性 (anti-inflammatory) 的。它们主要产生抗炎细胞因子, 如 IL-10, 并表达 CD206 (甘露糖受体)、CD163 和 Arg1 (精氨酸酶 1) 等标志物。M2 型巨噬细胞在组织修复、伤口愈合和炎症消退过程中发挥关键作用。此外, M2 型巨噬细胞能够促进 Th2 免疫应答, 帮助宿主抵御胞外病原体。然而, M2 极化的异常调控可能导致免疫抑制和肿瘤进展<sup>[40]</sup>。

在实验研究和临床应用中, 标志物特征可用于识别和区分 M1 与 M2 巨噬细胞: M1 型巨噬细胞通常表达 iNOS、CD80 和 CD86; M2 型巨噬细胞则表达 CD163、CD206 和 Arg1<sup>[83]</sup>。这些标志物可作为巨噬细胞极化的指示物, 并揭示其功能特性。然而, 巨噬细胞的活化是一个动态过程, 受微环境和外界刺激的影响, 标志物表达可能发生变化。因此, 深入理解巨噬细胞的极化机制及其标志物特征, 将有助于开发针对不同疾病的靶向治疗策略。

## 5.2 巨噬细胞功能表型的发展概念

巨噬细胞功能表型的研究由来已久, 最早可追溯至 1983 年。Nathan 在当时提出, 细胞介导的免疫反应对抗胞内病原体的能力, 主要依赖于淋巴细胞分泌的一种巨噬细胞激活因子 (macrophage-activating factor, MAF), 该因子可激活巨噬细胞的氧化代谢并增强其抗菌活性<sup>[84]</sup>。Nathan 假设 MAF 可能是干扰素- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), 能够诱导经典活化型 (M1) 巨噬细胞<sup>[85]</sup>。同年, Gordon 发现白细胞介素 4 (IL-4) 可诱导“替代性激活”巨噬细胞 (M2 型), 表现出对甘露糖化配体的内吞清除能力增强, 同时 MHC II 抗原表达受限, 促炎细胞因子分泌减少, 这一特征与 IFN $\gamma$  诱导的 M1 型表型形成对比<sup>[86]</sup>。

2000 年, Mills 提出了 M1/M2 巨噬细胞概念, 表明巨噬细胞的反应可独立于 T 细胞, 并能够引导 Th1 和 Th2 免疫反应。因此, 巨噬细胞被重新命名为 M1 型和 M2 型, 以强调先天免疫在免疫系统中的核心调控作用<sup>[26]</sup>。2001 年, Anderson 和 Mosser 进一步定义了调节性巨噬细胞 (Mreg), 其 IL-12 产生水平低于经典

活化巨噬细胞,但IL-10产生水平较高,并能分泌TGF- $\beta$ 诱导调节性T细胞(Tregs),从而在免疫耐受和免疫调节中发挥重要作用<sup>[87]</sup>。2002年,Mantovani进一步将M2型巨噬细胞细分为M2a、M2b和M2c亚群<sup>[88]</sup>:M2a型(由IL-4和IL-13诱导)主要用于抑制M1基因表达,并在组织修复过程中清除细胞碎片。M2b型(由免疫复合物、LPS和IL-1诱导)具有免疫调节能力。M2c型(由糖皮质激素、TGF- $\beta$ 、IL-10和CCL13诱导)可抑制M1型巨噬细胞,并获得调节功能<sup>[27]</sup>。2021年,Leibovich提出了M2d型,该表型通过腺苷依赖途径,由M1型巨噬细胞转换而来,不同于IL-4/IL-13依赖的M2a型。M2d巨噬细胞可受IL-6和腺苷A2a受体调控,并在血管生成过程中发挥作用<sup>[88]</sup>。

除M1/M2经典分类外,心血管研究进一步揭示了巨噬细胞的功能可塑性,并定义了Mhem、MHb、HA-mac、Mox和M4等亚群:2004年,Philippidis发现M(Hb)巨噬细胞,该亚群在吞噬血红蛋白/结合珠蛋白(hemoglobin/haptoglobin, Hb/Hp)复合物后形成,并高度表达M2型标志物(MR和CD163)<sup>[89]</sup>。2009年,Boyle发现了一种动脉粥样硬化保护型巨噬细胞(HA-mac),该亚群主要存在于病灶内出血区域,并能有效清除血红蛋白,同时减少氧化应激<sup>[90]</sup>。2010年,Kadl发现氧化磷脂(oxidized phospholipids)在动脉粥样硬化病变中积累,可诱导一种氧化脂质相关巨噬细胞(Mox),其基因表达特征表现出抗氧化应答<sup>[91]</sup>。2010年,Gleissner通过CXCL4(血小板因子4)诱导出一种M4型巨噬细胞,该亚群具有M1型促炎特性,但缺乏吞噬能力<sup>[92]</sup>。2012年,Boyle进一步研究发现,血红素(heme)可驱动Mhem巨噬细胞极化,其特点是高表达抗动脉粥样硬化酶HO-1(血红素加氧酶1),并具有抗炎和抗氧化作用<sup>[93]</sup>。

近年来,科学家利用单细胞RNA测序(scRNA-seq)等技术,探索了神经系统疾病中不同巨噬细胞亚群:2017年,Keren-Shaul在阿尔茨海默病小鼠模型(gd-ad)中,利用单细胞RNA测序技术,鉴定出神经退行性疾病相关小胶质细胞(DAM, disease-associated microglia)<sup>[94]</sup>。DAM细胞可能是阿尔茨海默病相关吞噬细胞,在小鼠和人类中均保守。DAM的激活需要TREM2依赖性和非依赖性的两个阶段,且需要抑制小胶质细胞抑制性信号通路<sup>[94]</sup>。2022年,Kim在缺血-再灌注(I/R)损伤模型中,鉴定出一种新型小胶质细胞亚群,命名为SAM(stroke-associated microglia,缺血性卒中相关小胶质细胞)<sup>[95]</sup>。研究人员利用单

细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 分析 tMCAO (短暂性大脑中动脉阻塞) 手术模型中的对侧 (CL) 和病变侧 (IL) 半球, 发现 SAM 亚群具有 *prdx1* 依赖的抗氧化效应, 并与 DAM 细胞表现出类似的基因标志物特征。SAM 细胞特异性激活于缺血性卒中 I/R 损伤, 且 *Prdx1* 表达对于 SAM 激活及抗氧化功能增强至关重要<sup>[95]</sup> (表 3)。

表 3 巨噬细胞功能表型概念的发展历程

Tab. 3 The concept development of macrophage functional phenotypes

Functional phenotype	Year	Comments	Cytokines	References
M1/M2	2000	M1: Produce high levels of pro-inflammatory cytokines, generate reactive oxygen species (ROS) and nitrogen intermediates; Promote Th1-type immune responses. M2: Produce anti-inflammatory cytokines; Exhibit tissue repair and remodeling functions	M1: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- $\gamma$ M2: IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13, IL-1Ra	[26]
Mreg	2001	Secrete TGF- $\beta$ to help induce Tregs and produce IL-10 to help induce tolerance and regulate other cell type.	IL-10, TGF- $\beta$	[87]
M2a	2002	Activated by IL-4 and IL-13; Promote tissue repair and wound healing; Induce alternative activation of fibroblasts and collagen deposition.	IL-4, IL-13	[27]
M2b	2002	Activated by immune complexes and Toll-like receptor (TLR) ligands; Regulate immune responses and dampen inflammation.	IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-6; IL-10	[27]

表 3（续表） 巨噬细胞功能表型概念的发展历程

Tab. 3 (Continued) The concept development of macrophage functional phenotypes

Functional phenotype	Year	Comments	Cytokines	References
M2c	2002	Activated by IL-10 and glucocorticoids. Involved in immunosuppression and tissue remodeling during the resolution phase of inflammation.	IL-10, TGF- $\beta$	[27]
M2d	2021	Activated by adenosine and TLR ligands. Promote angiogenesis and immunosuppression in the tumor microenvironment.	IL-10, IL-6	[88]
Mhem	2012	Specialized macrophages involved in handling hemoglobin and heme during intravascular hemolysis. Play a role in heme processing and iron recycling.	Associated with hemoglobin and heme handling during intravascular hemolysis.	[93]
MHb	2004	Macrophages with the ability to phagocytose and remove damaged or aging red blood cells. Play a role in clearing senescent red blood cells from circulation.	Associated with phagocytosis of senescent red blood cells.	[89]

表 3（续表） 巨噬细胞功能表型概念的发展历程

Tab. 3 (Continued) The concept development of macrophage functional phenotypes

Functional phenotype	Year	Comments	Cytokines	References
HA-mac	2009	Macrophages that accumulate hyaluronan in tissues. Involved in tissue repair and remodeling, particularly in the context of fibrosis and wound healing.	Associated with hyaluronan accumulation in tissues.	[90]
Mox	2010	Macrophages with enhanced oxidative metabolism. Show increased mitochondrial biogenesis and function. Play a role in immune responses and metabolic regulation.	Associated with increased oxidative metabolism.	[91]
M4 (Tumor-associated macrophages (TAMs))	2010	Tumor-associated macrophages with the ability to repopulate the tumor after therapy-induced depletion. Contribute to tumor regrowth and recurrence.	Associated with repopulating tumors after therapy-induced depletion.	[92]
DAM	2017	Accumulate in diseased tissues, such as in the context of cancer, inflammatory diseases, and metabolic disorders.	Vary depending on the disease context.	[94]

表 3 (续表) 巨噬细胞功能表型概念的发展历程

Tab. 3 (Continued) The concept development of macrophage functional phenotypes

Functional phenotype	Year	Comments	Cytokines	References
SAM	2022	Macrophages that form a network in sentinel lymph nodes. Play a role in the initiation and modulation of adaptive immune responses.	Associated with sentinel lymph nodes.	[95]

### 5.3 M1 和 M2 分类的争议

尽管 M1/M2 巨噬细胞极化模型为理解巨噬细胞的功能与调控提供了有力工具,但近年来,该分类方法因过于简化而受到批评。这主要是因为巨噬细胞的活化是一个复杂且动态的过程,受多种因素的影响,包括刺激类型和强度、微环境以及与其他细胞的相互作用<sup>[6,96]</sup>。巨噬细胞的活化状态实际上是一个连续谱,而将其简单划分为 M1 和 M2 亚群,可能无法全面反映其多样化的表型和功能。此外,用于定义 M1 和 M2 巨噬细胞的标志物并不总是特异性的,某些标志物可在不同亚群之间交叉表达。例如:CD86 和 iNOS 传统上被认为是 M1 型标志物,但在某些 M2 型巨噬细胞中也有表达<sup>[97]</sup>。同样,CD206 和 Arg1 常被认为是 M2 型标志物,但在某些 M1 型巨噬细胞中也有检测到<sup>[98,99]</sup>。

此外,近年来的研究发现了一些无法归入 M1/M2 模型的巨噬细胞亚群。例如:Mhem 巨噬细胞主要负责血红蛋白(Hb)和血红素(heme)的清除,其表型和功能与传统 M1/M2 巨噬细胞明显不同<sup>[11]</sup>。Mox 巨噬细胞参与氧化磷脂(oxidized phospholipids)清除,其特征性标志物和功能亦与 M1/M2 巨噬细胞不同<sup>[100]</sup>。这些研究结果表明,巨噬细胞的功能和表型远超 M1/M2 分类模型。综上所述,M1/M2 极化模型在理解巨噬细胞活化及功能方面提供了重要框架,但必须认识到,巨噬细胞的活化是一个复杂且动态的连续过程。随着研究的深入,新的巨噬细胞亚群不断被发现,其独特的功能和标志物进一步强调了超越传统 M1/M2 分类框架,探索巨噬细胞多样性的必要性。

## 6 总结与结论

总的来说,单核细胞和巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分,在多种生理和病理过程中发挥关键作用。它们表现出显著的可塑性,能够根据微环境的变化调整功能性表型。在缺血性卒中发生后,单核细胞和巨噬细胞既参与初始的炎症反应,也介导后续的组织修复。单核细胞进入缺血脑组织后,分化为巨噬细胞,这一过程可影响组织损伤的程度以及功能恢复的效果。深入理解单核细胞和巨噬细胞在缺血性卒中病理过程中的异质性和动态变化,对于开发靶向治疗策略和干预措施至关重要。

## 参考文献

- [1] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-35.
- [2] Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity [J]. *Journal of innate immunity*, 2014, 6(6): 716-26.
- [3] Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe [J]. *Frontiers in immunology*, 2015, 6:602.
- [4] Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis [J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 439-49.
- [5] Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease [J]. *Nature reviews immunology*, 2009, 9(4): 259-70.
- [6] Link VM, Duttke SH, Chun HB, Holtman IR, Westin E, Hoeksema MA, Abe Y, Skola D, Romanoski CE, Tao J. Analysis of genetically diverse macrophages reveals local and domain-wide mechanisms that control transcription factor binding and function [J]. *Cell*, 2018, 173(7): 1796-809. e17.
- [7] Hu K, Jin Y, Chronos Z, Han X, Liu H, Lin L. Macrophage functions and regulation: roles in diseases and implications in therapeutics [J]. *Journal of immunology research*, 2018, 2018:7590350.
- [8] Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages [J]. *Frontiers in immunology*, 2015, 6:212.
- [9] Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases [J]. *Biomarker research*, 2014, 2(1-9).
- [10] Bleuzé M, Gottschalk M, Segura M. Neutrophils in *Streptococcus suis* infection: from host defense to pathology [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2392.
- [11] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 21-35.
- [12] Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2003, 4(11): 897-901.
- [13] Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the

- ugly [J]. Trends in cell biology, 2005, 15(11): 599-607.
- [14] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair [J]. The Journal of clinical investigation, 2005, 115(1): 56-65.
- [15] Khalil N, Berezney O, Sporn M, Greenberg A. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation [J]. Journal of Experimental Medicine, 1989, 170(3): 727-37.
- [16] Fukasawa M, Campeau JD, Yanagihara DL, Rodgers KE. Regulation of proliferation of peritoneal tissue repair cells by peritoneal macrophages [J]. Journal of Surgical Research, 1990, 49(1): 81-7.
- [17] Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms [J]. Journal of cell biology, 1989, 109(1): 429-40.
- [18] Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$  [J]. Nature, 1988, 334(6179): 260-2.
- [19] Bail O. Das problem der bakteriellen infektion[M]. W. Klinkhardt, 1911.
- [20] Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell [J]. Immunity, 2007, 26(6): 726-40.
- [21] Sierra A, de Castro F, del Río - Horteaga J, Rafael Iglesias - Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The “Big - Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río - Horteaga 1919 series of papers on microglia [J]. Glia, 2016, 64(11): 1801-40.
- [22] Mackaness G. Cellular resistance to infection [J]. Journal of Experimental Medicine, 1962, 116(3): 381-406.
- [23] Albina JE, Mills C, Henry Jr W, Caldwell M. Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds [J]. Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950), 1990, 144(10): 3877-80.
- [24] Chakkalath HR, Titus RG. Leishmania major-parasitized macrophages augment Th2-type T cell activation [J]. Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950), 1994, 153(10): 4378-87.
- [25] Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis [J]. International journal of molecular sciences, 2017, 19(1): 92.

- [26] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm [J]. *The Journal of immunology*, 2000, 164(12): 6166-73.
- [27] Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties [J]. *Immunity*, 2003, 19(1): 71-82.
- [28] Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko A-C, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor [J]. *Nature immunology*, 2013, 14(8): 821-30.
- [29] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology [J]. *Circulation research*, 2004, 95(4): 343-53.
- [30] Uderhardt S, Martins AJ, Tsang JS, Lämmermann T, Germain RN. Resident macrophages cloak tissue microlesions to prevent neutrophil-driven inflammatory damage [J]. *Cell*, 2019, 177(3): 541-55. e17.
- [31] Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(6): 392-404.
- [32] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, De Bruijn MF, Geissmann F. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors [J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 547-51.
- [33] Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration; proceedings of the Seminars in immunopathology, F, 2013 [C]. Springer.
- [34] Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2017, 214(7): 1913-23.
- [35] Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 79-91.
- [36] Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation [J]. *Front Immunol*, 2014, 5:514.
- [37] Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils [J]. *Nature immunology*, 2011, 12(11):

1035-44.

[38] Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [J]. *Science*, 2010, 327(5966): 656-61.

[39] Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes [J]. *Cytokine*, 2003, 21(5): 242-7.

[40] Shapouri - Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233(9): 6425-40.

[41] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood [J]. *Blood*, 2010, 116(16): e74-80.

[42] Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2 [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(3): 311-7.

[43] Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1327-40.

[44] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. *Nature medicine*, 2011, 17(7): 796-808.

[45] Jian Z, Liu R, Zhu X, Smerin D, Zhong Y, Gu L, Fang W, Xiong X. The involvement and therapy target of immune cells after ischemic stroke [J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10:2167.

[46] Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke [J]. *Journal of neuroinflammation*, 2019, 16(1): 1-24.

[47] Wicks EE, Ran KR, Kim JE, Xu R, Lee RP, Jackson CM. The translational potential of microglia and monocyte-derived macrophages in ischemic stroke [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13(1):122-1.

[48] Fang W, Zhai X, Han D, Xiong X, Wang T, Zeng X, He S, Liu R, Miyata M, Xu B. CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice [J]. *Theranostics*, 2018, 8(13): 3530.

[49] Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage

polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-70.

[50] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010, 116(16): e74-e80.

[51] Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets [J]. *PloS one*, 2017, 12(4): e0176460.

[52] Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, Van Rooijen N. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2007, 117(1): 185-94.

[53] Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets [J]. *Journal of cardiovascular translational research*, 2011, 4:211-9.

[54] Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions [J]. *Current opinion in hematology*, 2010, 17(1): 53-9.

[55] Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell R-R, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2011, 118(12): e50-e61.

[56] Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors [J]. *Science*, 2017, 356(6335): eaah4573.

[57] Hofer TP, Van de Loosdrecht AA, Stahl-Hennig C, Cassatella MA, Ziegler-Heitbrock L. 6-sulfo lacnac (slan) as a marker for non-classical monocytes [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2052.

[58] Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, Kourilsky P, Wong S-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2011, 118(5): e16-e31.

- [59] Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2 [J]. *Nature immunology*, 2006, 7(3): 311-7.
- [60] Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues [J]. *The Journal of experimental medicine*, 2001, 194(9): 1361-74.
- [61] Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response [J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 172(7): 4410-7.
- [62] Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior [J]. *Science*, 2007, 317(5838): 666-70.
- [63] Burke B, Ahmad R, Staples KJ, Snowden R, Kadioglu A, Frankenberger M, Hume DA, Ziegler-Heitbrock L. Increased TNF expression in CD43<sup>++</sup> murine blood monocytes [J]. *Immunology letters*, 2008, 118(2): 142-7.
- [64] Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010, 115(3): e10-e9.
- [65] Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species [J]. *Cellular immunology*, 2014, 289(1-2): 135-9.
- [66] Shirk EN, Kral BG, Gama L. Toll-like receptor 2<sup>bright</sup> cells identify circulating monocytes in human and non-human primates [J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(4): 364-71.
- [67] Rogers KA, Scinicariello F, Attanasio R. IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(6): 3848-56.
- [68] Bjornson-Hooper ZB, Fragiadakis GK, Spitzer MH, Chen H, Madhireddy D, Hu K, Lundsten K, McIlwain DR, Nolan GP. A comprehensive atlas of immunological differences between humans, mice, and non-human primates [J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13.

- [69] Carter D, Shieh T, Blosser R, Chadwick K, Margolick J, Hildreth J, Clements J, Zink M. CD56 identifies monocytes and not natural killer cells in rhesus macaques [J]. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 1999, 37(1): 41-50.
- [70] Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 176(7): 4155-62.
- [71] Ahuja V, Miller SE, Howell DN. Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43 [J]. *Cellular immunology*, 1995, 163(1): 59-69.
- [72] Fairbairn L, Kapetanovic R, Beraldi D, Sester DP, Tuggle CK, Archibald AL, Hume DA. Comparative analysis of monocyte subsets in the pig [J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 190(12): 6389-96.
- [73] Hussen J, Düvel A, Sandra O, Smith D, Sheldon IM, Zieger P, Schubert H-J. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71502.
- [74] Lee Y, Kiupel M, Soboll Hussey G. Characterization of respiratory dendritic cells from equine lung tissues [J]. *BMC veterinary research*, 2017, 13(1): 1-11.
- [75] Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update [J]. *Trends in immunology*, 2015, 36(3): 161-78.
- [76] Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 167(11): 6533-44.
- [77] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages [J]. *Nature immunology*, 2013, 14(10): 986-95.
- [78] Patel B, Gupta N, Ahsan F. Particle engineering to enhance or lessen particle uptake by alveolar macrophages and to influence the therapeutic outcome [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 89:163-74.
- [79] Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, Martin C, van Rooijen N, Ochando JC, Randolph GJ. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells [J]. *Hepatology*, 2015, 62(1): 279-91.

- [80] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. *Annual review of immunology*, 2017, 35:441-68.
- [81] Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells [J]. *Nature*, 1992, 360(6401): 258-61.
- [82] Wu Y, Hirschi KK. Tissue-resident macrophage development and function [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 8:617879.
- [83] Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology [J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2015, 72:4111-26.
- [84] Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity [J]. *The Journal of experimental medicine*, 1983, 158(3): 670-89.
- [85] Kumar V. Macrophages: the potent immunoregulatory innate immune cells [M]. *Macrophage activation-Biology and disease*. IntechOpen. 2019.
- [86] Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation [J]. *The Journal of experimental medicine*, 1992, 176(1): 287-92.
- [87] Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc $\gamma$  receptors [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(11): 6861-8.
- [88] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization [J]. *Trends in immunology*, 2004, 25(12): 677-86.
- [89] Philippidis P, Mason J, Evans B, Nadra I, Taylor K, Haskard D, Landis R. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery [J]. *Circulation research*, 2004, 94(1): 119-26.
- [90] Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, Haskard DO. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype [J]. *The American journal of pathology*, 2009, 174(3): 1097-108.
- [91] Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to

- atherogenic phospholipids via Nrf2 [J]. *Circulation research*, 2010, 107(6): 737-46.
- [92] Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages [J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184(9): 4810-8.
- [93] Boyle JJ, Johns M, Kampfner T, Nguyen AT, Game L, Schaer DJ, Mason JC, Haskard DO. Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection [J]. *Circulation research*, 2012, 110(1): 20-33.
- [94] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276-90. e17.
- [95] Kim S, Lee W, Jo H, Sonn S-K, Jeong S-J, Seo S, Suh J, Jin J, Kweon HY, Kim TK. The antioxidant enzyme Peroxiredoxin-1 controls stroke-associated microglia against acute ischemic stroke [J]. *Redox Biology*, 2022, 54:102347.
- [96] Hu K, Jin Y, Chroneos Z, Han X, Liu H, Lin L. Macrophage functions and regulation: roles in diseases and implications in therapeutics [M]. Hindawi. 2018.
- [97] Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado JdD, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages [J]. *PloS one*, 2015, 10(12): e0145342.
- [98] Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages [J]. *Journal of leukocyte biology*, 2002, 71(4): 597-602.
- [99] El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo M-S. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens [J]. *Nature immunology*, 2008, 9(12): 1399-406.
- [100] Rodin AE. Contributions of William Osler to our knowledge of respiratory disease [J]. *Chest*, 1978, 74(1): 85-7.

## 学位论文数据集

关键词*	密级*	中图分类号*	UDC	论文资助
程序性死亡配体 1; 缺血性卒中; 单核细胞; 单核来源巨噬细胞; 神经保护	<input checked="" type="checkbox"/> 公开 <input type="checkbox"/> 不公开	R743.3	616.831	国家自然科学基金
学位授予单位名称*	学位授予单位代码*	学位类别*	学位级别*	
贵州医科大学	10660	专业学位	博士	
论文题名*				论文语种*
PD-L1 介导的免疫调控在缺血性卒中后的作用及机制				中文
并列题名*	The Role and Mechanisms of PD-L1-Mediated Immune Regulation after Ischemic Stroke			
作者姓名*	杭航	学号*	2021020020074	
培养单位名称*	培养单位代码*	培养单位地址	邮编	
贵州医科大学	10660	贵州省贵安新区安康大道 6 号	550002	
学科专业*	研究方向*	学制*	学位授予年*	
急诊医学	急性缺血性脑卒中	3 年	2025 年	
论文提交日期*				
导师姓名*	伍国锋	职称*	主任医师	
评阅人	答辩委员会主席*	答辩委员会成员		
	沈祥春	杨清武、徐祖才、任思颖、王丽琨		
电子版论文提交格式 文本 (√) 图像 ( ) 视频 ( ) 音频 ( ) 多媒体 ( ) 其它 ( )				
推荐格式: application/msword; application/pdf				
电子版论文出版 (发布) 者	电子版论文出版 (发布) 地	权限声明		
论文总页数*	177			
共 33 项, 其中带*为必填数据, 为 22 项。				