



脑血管再生修复的细胞基础和分子调控机制

陈静影^{1,2}, 刘赤³, 罗凌飞^{2*}

1. 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 重庆 400714;
2. 西南大学发育生物学与再生医学研究中心, 重庆 400715;
3. 中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院肾内科, 重庆 400037

* 联系人, E-mail: lluo@swu.edu.cn

收稿日期: 2021-08-25; 接受日期: 2021-10-21; 网络版发表日期: 2022-03-14

国家自然科学基金(批准号: 31730060, 32000576, 31771609)资助

摘要 缺血性脑卒中是一种急性脑血管疾病, 会导致局部脑血管网和神经元大量死亡并产生脑水肿. 对于缺血性脑卒中的治疗主要包括超急性期的血管再通以及后期的促血管再生. 促血管再生目前主要通过联合应用血管内皮生长因子、神经血管靶向指引分子, 移植内皮前体细胞等方法, 以促进血管再生修复. 周细胞在脑血管再生修复过程中具有促进血管生成, 参与血脑屏障重建的作用. 血小板在脑血管损伤后会激活释放微颗粒, 促进神经血管再生. 最新发现的脑膜淋巴管在脑缺血后能侵入受损脑实质缓解脑水肿, 并作为“生长轨道”指引新生血管生长. 这些细胞功能提示, 周细胞、血小板和脑膜淋巴管可以作为潜在的促脑血管再生的新靶标. 除了以脑卒中为代表的急性脑血管病外, 以脑微出血为代表的慢性脑血管病的存在更广泛, 脑微出血是由脑部微小血管断裂所致. 近年来发现, 微血管断裂后, 以小胶质细胞为代表的巨噬细胞能通过物理黏附和机械力牵引介导断裂脑微血管重新连接修复. 本文旨在对现阶段脑血管再生修复过程中的细胞基础和分子调控机制进行阐述, 并对未来的机制研究和治疗策略进行展望.

关键词 脑血管再生修复, 指引分子, 内皮前体细胞, 周细胞, 血小板, 脑膜淋巴管, 小胶质细胞

脑卒中是一种损害中枢神经系统(central nervous system, CNS)的常见急性血管疾病, 具有很高的致残致死率^[1]. 根据世界卫生组织报告, 现在每年大约有1500万人罹患脑卒中, 其中有接近500万人因此死亡, 还有500万人因此残疾. 脑卒中可以分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中, 其中缺血性脑卒中占比约80%, 是指由脑供血不足导致的特定脑组织坏死的总称, 严重时会产生大面积脑梗死, 大多数脑卒中幸存者都会留下后遗症并需要长期的康复治疗^[2]. 缺血性脑卒中按

照疾病发展可以分为超急性期(0~24小时)、急性期(1~7天)、亚急性期(7天~6个月)以及慢性期(6个月以上), 其中前6个月为脑卒中患者治疗恢复的黄金时间, 超过6个月以后的慢性期治疗, 恢复效果微乎其微, 早发现早治疗能显著提高病患的生存生活质量. 除产生急性症状的缺血性脑卒中外, 脑微梗死(小于5 mm病灶)在衰老和老年痴呆疾病中扮演着“阴险”的角色, 这种微梗死需要经过多年累积才会表现出可检测的症状^[3].

引用格式: 陈静影, 刘赤, 罗凌飞. 脑血管再生修复的细胞基础和分子调控机制. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 618–632

Chen J Y, Liu C, Luo L F. The cellular and molecular mechanisms of cerebrovascular regeneration and repair (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 618–632, doi: 10.1360/SSV-2021-0231

随着年龄的增长, 人类脑部微血管易断裂而产生“脑微出血”, 微出血是高龄人群脑血管常发症. 这种脑微血管损伤会引发神经退行性疾病、认知和记忆能力下降等, 也是出血性脑卒中的主要诱发因素之一. 断裂脑微血管快速及时地修复, 对于维护脑部健康、防止神经退行性疾病和急性脑血管病具有重要意义. 针对缺血性脑卒中和脑微出血, 本文将阐述脑血管再生修复的细胞基础和分子调控机制, 并对未来的潜在治疗新靶标提出展望.

1 脑血管再通

由于大脑组织灌注的限制, 缺血性脑卒中影响神经元和血管健康并造成广泛的影响. 对于局灶性脑缺血, 脑梗从缺血核心逐渐扩散到周围边界, 产生炎症反应, 形成脑水肿, 血脑屏障受损以及神经元持续性死亡. 尽管许多针对脑卒中的研究治疗采用神经保护疗法, 但是收效甚微^[4]. 在缺血性脑卒中发生后的超急性期, 快速恢复血流是主要目标. 通过静脉注射重组组织纤溶酶原激活物rtPA进行溶栓治疗或急性血管内治疗(血栓切除术)虽然对缺血性脑卒中有显著益处^[5](图1), 但是rtPA的治疗时间窗很窄, 仅在急性脑缺血发生后的4.5~6小时内(某些特定情况下长达24小时)有效, 因此从安全方面考虑, 它的使用仅限于10%~15%的适用于溶栓治疗的超急性缺血性脑卒中患者^[6].

血管再通之前是否具有侧支循环在急性缺血性脑卒中的预后评估中扮演着重要角色. 侧支循环是当供血动脉严重狭窄或闭塞时, 血流可通过其他血管到达缺血区, 使缺血组织得到不同程度的灌注代偿, 能增加卒中后缺血半暗带血供^[7]. 侧支循环建立的好坏与临床预后有密切的关系, 影响侧支循环建立好坏的因素有自身原发性侧支循环的结构完整性, 血管发生狭窄或闭塞时的速度, 血管自身的反应性以及体内的一些分泌因子的表达差异等^[8]. 尽管不同个体建立侧支循环的差异很大^[9], 但是通过促血管生成和动脉发生以改善侧支循环的方法仍然是现阶段预防治疗急性缺血性脑卒中的积极策略.

2 促血管再生

在超过溶栓治疗的有效时间窗之后, 功能性血管

的重新形成与局灶性脑缺血患者的功能恢复和生存期延长有关, 如何促使受损脑区血管再生是该阶段的主要目标. 脑血管的再生和脑血管的发育过程是类似的, 了解脑血管的发育有助于人们认知脑血管的再生过程. 在脑血管发育过程中, 位于神经管附近的来自中胚层的成血管内皮前体细胞通过迁移分化形成初始血管网, 然后在周围促血管生成因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的作用下, 原来静止状态下的血管内皮细胞活化、迁移、出芽长出新的血管分支网络. 在脑微血管网形成之后, 壁细胞如周细胞和血管平滑肌细胞会在周围信号分子如血小板源的生长因子B(platelet derived growth factor subunit B, PDGFB)和转变生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF $\beta 1$)的作用下招募到血管周围以稳定血管壁形成^[10]. 相较于血管发育, 脑血管再生是一个相对缓慢的过程, 自发性的血管生成通常发生在脑缺血后4~7天的缺氧核心周围区域, 内皮细胞活化, 迁移, 增殖, 形成新的基底膜, 并通过瓦解内皮和基底膜间的连接形成新的管腔结构, 同时, 内皮细胞以及间充质干细胞激活小胶质细胞表达更多的促血管生成因子以及炎症因子来促进新血管形成. 最后在激活的Ang/Tie2信号分子作用下, 招募周围的周细胞、平滑肌细胞稳定新血管形成, 促进脑血管成熟^[11].

脑缺血后的血管再生对神经元重塑和功能恢复至关重要^[12]. 脑血管与神经在发育过程中相互伴随, 二者受到相同信号分子的调控, 了解神经血管发育过程中的相互关系有利于认识缺血性脑卒中后的神经再生修复. 常见的四种影响神经血管发育的信号分子包括Netrins, Ephrins, Semaphorins和Slits以及它们各自的受体蛋白, 这些信号分子通过吸引和排斥的作用来调控神经血管的发育形成^[13]. 在最初神经轴突形成过程中, Slits, Semaphorins和Ephrins主要发挥排斥作用, 而在某些特定的环境下会发挥吸引作用, Netrins是被广泛认知的主要发挥吸引和排斥的信号分子. 在脑缺血发生后, 虽然大脑能进行自发性的血管生成, 但是受损的中枢神经系统中存在大量的影响神经血管再生的排斥分子, 导致血管生成非常有限^[14], 因此如何调控神经血管再生的吸引和排斥信号是研究脑血管再生的难点, 比较脑血管发育与再生修复的异同有利于寻找用于缺血性脑卒中后血管再生的潜在治疗策略. 结合现有研究, 促血管再生策略可以通过联合应用血管

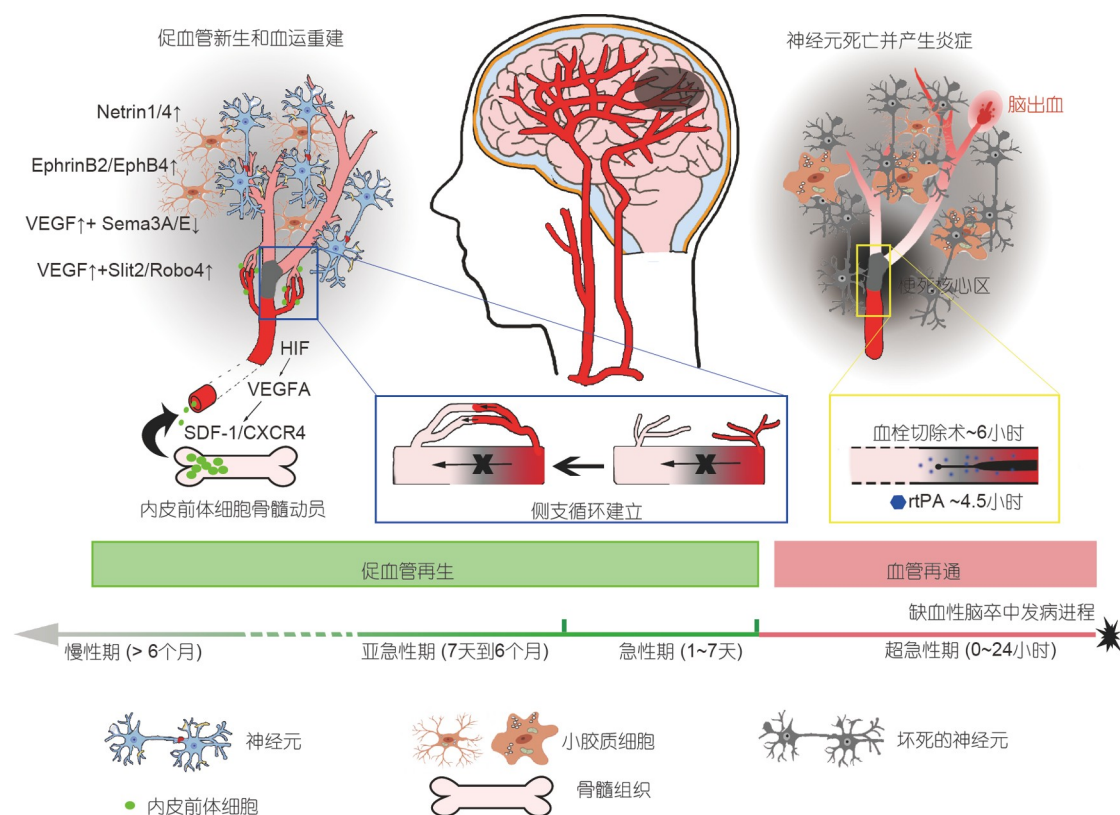


图1 脑卒中后促进脑血管再生修复的治疗策略. 局灶性脑缺血发生后, 局部脑血管网大量死亡, 脑梗从缺血核心逐渐扩散到周围边界, 产生炎症反应, 形成脑水肿, 血脑屏障受损以及神经元持续性死亡. 在脑缺血后4.5~6小时, 快速溶栓能使血管再通, 超过此时间窗之后, 促使受损脑区血管再生成为主要目标, 通过联合应用血管内皮生长因子、神经血管靶向指引分子, 动员骨髓中的内皮前体细胞到达损伤区域以促进血管新生、侧支循环建立和血运重建

Figure 1 Therapeutic strategy to promote brain vascular repair and regeneration following stroke. After focal cerebral ischemia, brain vascular death occurs, and the infarction gradually grows from the ischemic core and results in a peripheral ischemic border zone, inducing inflammation, brain edema, blood-brain barrier leakage, and neuronal death. Conventional recanalization therapies are effective only when conducted during the early 4.5–6 h after acute ischemic events. At later time points, promoting brain vascular regeneration becomes the major goal. Combining application of vascular endothelial growth factors and neuronal-vascular guidance molecules, recruitment of endothelial precursor cells from the bone marrow into the injured area can promote angiogenesis, collateral circulation and revascularization in the ischemic CNS

内皮生长因子、神经血管靶向指引分子, 以及移植内皮前体细胞到受损区域以达到促进血管再生修复的目的(图1).

2.1 联合应用血管内皮生长因子、神经血管靶向指引分子促功能性血管再生

脑缺血后, 低氧水平能提高脑梗周围低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)的稳定性和活力, 并激活未受损组织和软膜中的血管生成, 使新生血管从缺血半影区的低氧微环境进入脑梗核心区域^[15], 这其中涉及到很多促血管生长因子和炎症因子的上调. 例如, 在小鼠中脑动脉梗阻手术(middle cerebral artery

occlusion, MCAO)后的24小时, 经典的血管内皮生长因子VEGF在梗死区上方的软膜和低氧脑梗周围组织中激活, 而受体(VEGFR1和VEGFR2)在术后的48小时上调, 接着在术后的48~72小时, 脑梗周围区域以及软膜表层有大量的内皮细胞增殖^[16], VEGF的这种表达的时空动态性说明它是一种非常重要的促血管再生因子. 在脑卒中发生后, 向受损组织中添加VEGF虽然能促进血管修复和再生改善, 但是VEGF的单独治疗也会引起血管渗漏和脑水肿等不良事件发生^[17], 这种出血性转化提示血管的不够成熟是VEGF治疗缺血性脑卒中具有潜在风险的重要原因. 另外, VEGFR2介导的PI3K-Akt信号通路也能引起血脑屏障的通透性增加,

因此直接利用VEGF作为治疗手段需要慎重。

此外, 大脑中迁移的细胞和生长的轴突会释放大量的排斥因子形成CNS中的抑制微环境, 这种抑制效应不仅影响轴突的再生也会影响血管的修复^[14]。因此, 一种有希望的治疗策略是在脑梗死区周围抑制排斥因子, 促进血管出芽和生长, 并保护血脑屏障, 扩大缺血后的功能性血管新生。大多数神经血管指引分子存在于成熟的神经系统, 部分会在CNS受损之后出现上调, 阐明这些信号指引分子不仅可以更好地理解脑血管再生的分子机制还能衍生出新的治疗策略。

Netrins是一种进化上很保守的蛋白分子^[18]。在发育过程中, Netrin具有抑制血管生成的作用, 它的受体UNC5B在毛细血管的出芽过程中特异性表达在动脉内皮的顶端细胞中。敲除小鼠体内的Unc5b会产生过多的血管分支并造成丝状伪足肆意生长^[19]; 在Netrin1的作用下, 促进UNC5B将会阻止新生血管出芽和丝状伪足伸展。然而在中枢神经系统再生过程中, Netrin-1和受体UNC5B发挥了不同的功能, 它们在血管发育完成后下调, 在缺氧或者许多CNS相关的疾病中重新表达^[20]。过表达Netrin-1/4可以促进成年小鼠和人的脑血管新生和增殖。外源性添加Netrin-1/4除了能强化血管新生并促进长达4周的功能恢复外^[21], 还能通过UNC5B受体上调紧密连接蛋白以促进血脑屏障修复^[22-24]。脑卒中后的功能改善还归因于Netrin-1对于神经元或星形胶质细胞的积极作用^[24]。因此, Netrin-1/4的激活不仅不会带来脑水肿和出血性转化的风险, 还可以作为潜在的促血管再生的治疗靶点。

EphrinB2和EphB4受体是两种跨膜蛋白, 具有正向和反向信号转导功能, 在神经血管发育以及脑血管再生修复过程中至关重要^[25,26]。在血管分化过程中, EphrinB2和EphB4分别特异性地在动脉和静脉内皮中表达而被认为是调控动静脉分化形成的关键分子^[27]。在小鼠视网膜发育过程中, Ephrin-B2-EphB4通过调节VEGF信号途径激活VEGFR2, 促进血管出芽和内皮细胞增殖。在成年CNS中, Ephrin和Eph受体在脑缺血后上调并在多种细胞类群中激活。在MCAO手术后, 上调Ephrin-B2能激活胞内的酪氨酸激酶, 使血管内皮细胞上的VEGF受体内化^[28], 促进新生血管生成^[29]; 过表达EphB4受体及EphB4多肽能反向激活Ephrin-B2, 增强血管生成, 招募周细胞并稳定脑血管; 阻断EphrinB2-EphB4信号通路会降低病理性血管新生并导致脑水肿

加重^[30]。

Semaphorins家族对于神经轴突的引导和血管的形态建成具有重要作用。锚定型Semaphorins通过跨膜受体Plexin影响细胞的能动性; 分泌型Semaphorin3亚家族成员(Semaphorin3E除外)通过与Neuropilin(Nrps)跨膜共受体发生相互作用^[31]。在血管发育过程中, Nrps通过结合小鼠中的VEGFA165调节血管生成, 能与多种VEGFR受体结合形成复合物加强VEGFA-VEGFR信号途径^[32]。Sema3E通过Plexin D1促进信号转导, 特异性敲降小鼠内皮细胞中的plexin D1将会抑制血管的形态建成和血管再生^[33]。此外, Sema3E-plexin D1还能通过负调控DLL4-Notch信号通路促进小鼠视网膜血管中的顶端细胞形成^[34]。然而, 在脑缺血和视网膜缺血模型中, Sema3A除了具有正向促进神经和血管再生的作用之外, 还有增加血管通透性的副作用^[35]。在短暂性脑缺血和缺血性视网膜病变中, 沉默或敲除Sema3A基因和Sema3E的受体基因PlexinD1能降低血管通透性, 防止血管漏血, 减轻脑损伤, 增强功能性血管新生^[36,37]。脑卒中发生后的7天是损伤扩大的阶段, 此时应用脂质氧化酶抑制剂阻止Sema3A下游信号通路, 能逆转局部应用Sema3A/E产生的破坏效应^[38]。因此, 在脑缺血发生后期, 通过灵活设计策略靶向抑制Sema3/Nrp/Plexin信号通路能有效防止出血性转化发生。

Slit分泌蛋白与ROBO受体结合后主要通过负调控VEGF信号通路抑制血管内皮尖端细胞出芽^[39]。在发育过程中, 通过对小鼠的ROBO4和斑马鱼中的robo4进行研究, 发现这种受体蛋白在进化上是保守的, 它们都具有维持血管稳定性, 抑制血管生成的特性^[40]。在脑血管再生过程中, Slit2-Robo4的激活能抵消VEGF信号通路的促血管生成作用; 抑制Slit2-Robo4虽然能促进血管增生但是也会增加血管的通透性, 破坏血脑屏障, 使脑损伤加重^[41]。此外, Slit2也能与Robo1和Robo2受体结合发挥正向促血管生成作用, Slit2过表达不仅能增加大脑的血管密度也能促进血管的通透性增加^[42]。由于Robo4对维持血管屏障的完整性具有重要作用, 因此, 在与VEGF的联合治疗中, 可以通过在脑血管再生后期设计策略靶向激活受体Robo4以促进新生血管的稳定防止出血性转化发生。

到目前为止, 对于脑缺血后的血管修复治疗大部分仍然停留在只添加VEGF的方案上, 这种方案的弊

端很大,例如,会引起血脑屏障受损,形成脑水肿,新生血管出血等后果,且会带来大量安全隐患。而联合神经血管靶向指引分子进行治疗能避免这些副作用^[14]。在缺血性脑卒中发生早期,上调Netrin-1/4和EphrinB2-EphB4能正向促进血管生成,并防止脑水肿和出血性转化发生;而在脑缺血发生后,可以联合VEGF的正向促进血管生成作用,靶向抑制Sema3A/E或靶向激活受体Robo4以保证功能性血管再生并防止血脑屏障受损。这种联合干预治疗方法不再局限于脑卒中发生后决定血管再通的4.5~6小时这一短暂时间窗,是未来决定脑缺血后促进血管修复的重要潜在治疗靶标。

2.2 移植内皮前体细胞促进血管再生修复

哺乳动物脑卒中发生后,骨髓来源的内皮前体细胞(endothelial progenitor cell, EPC)被认为是一种主要的成血管细胞,像早期发育过程的血管发生一样,对血管恢复和维持内皮的完整性具有重要作用。EPCs是一群不成熟的内皮细胞,具有普遍的干性和增殖特性,一般在外周血中循环。当血管受到损伤后,这类前体细胞将会从骨髓里动员出来到达受损区域进行分化产生新生血管内皮细胞^[43]。EPCs也是一群异质性很强的细胞,在不同的成熟阶段,其内部的基因表达差异明显,这个特征使得EPC的标志蛋白具有多样性。为了响应急性脑缺氧,缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor α , HIF- α)、VEGF和红细胞生成素从骨髓中激活和动员EPC进入外周血^[44],接着在外周血中,基底细胞来源因子SDF-1介导趋化因子受体CXCR4阳性的内皮前体细胞迁移到达受损内皮组织进行分化^[45]。

脑梗后EPC在细胞因子的浓度梯度诱导下迁移到达受损区域,除了通过旁分泌细胞因子和生长因子促进受损血管内皮细胞自我修复、增殖和稳定外,还能直接使已有的残留血管上重新长出新血管^[43]。此外,缺氧后由骨髓动员来的EPC还能直接整合进入血管壁成为新生血管的一部分^[46]。因此,EPC移植是目前治疗血管损伤的重要策略。将来自骨髓、外周血和脐带的EPC分别移植到缺血的后肢中,均能明显观察到血管新生的现象:毛细血管密度增加,血流灌注指数也明显改善。同时缺血肢体的坏死率和截肢率也明显下降^[47]。但是在正常情况下,外周血中的EPCs含量较低,不能满足临床所需,所以研究者们常常需要在EPCs中额外添加一些促血管生成因子,如VEGF,通

过腺病毒转染的方法使得转染后的EPCs中分泌出更多的VEGF以增加内皮细胞的增殖活性和促血管新生的能力^[48]。

尽管现在EPC对于新生血管的作用已被大量报道,但其应用于临床仍然存在很多问题^[49]。第一,在EPCs的分离中没有固定的一种或者一群标记物能准确标记EPCs。由于其来源的多样性,EPCs在不同的来源中标记物可能会发生变化,因此造成EPCs分离的不准确。第二,EPCs在不同环境中分化成为成熟内皮细胞的安全性、基因转染的有效性和基因靶向治疗的成功率还有待考究。第三,体内EPCs数目少且易分化的特点影响移植的效率,虽然利用体外扩增技术能大量获得EPCs,但是EPCs在体外容易分化的特性为成功进行体内移植增加了难度。第四,虽然添加VEGF等促进血管生成因子能加强EPCs的动员分化,但是如何控制EPCs移植后不引起肿瘤也是个问题。

3 周细胞在脑血管再生修复中的作用

在中枢神经系统中,周细胞作为微循环血管壁细胞的主要成分,和星形胶质细胞/内皮细胞共同构成血脑屏障,血脑屏障能阻碍有害物质从血液扩散到脑组织。中枢神经系统中的周细胞主要来自于神经脊。大量证据表明脑血管损伤后,周细胞在调节脑循环的过程中除了具有维持血脑屏障完整性之外,还能调节血管生成,促使血运重建^[50]。

在脑血管发育和损伤修复过程中,周细胞在PDGFB-PDGFR β 信号通路的作用下被招募到新生血管壁周围,通过覆盖在内皮细胞表面以减少血管渗漏,增强血管的稳定性。为了响应缺血,周细胞中的bFGF表达上调,通过自分泌或旁分泌作用激活周细胞中的PDGFR β ^[51],突变PDGFB或PDGFR β 均会导致周细胞招募减少、血脑屏障受损和脑出血。斑马鱼和小鼠的Notch3突变体中也发现了类似的周细胞变少和动静脉异常发生的现象^[52]。这些发现说明,周细胞对于维持血脑屏障的完整性至关重要,周细胞减少将会导致异常的脑出血发生。此外,周细胞的分化异常也能引起血脑屏障受损和脑内出血,FOXF2特异性表达在周细胞和血管平滑肌细胞,是一种脑卒中高风险调控基因,在小鼠的胚胎期和成年期抑制FOXF2将会造成周细胞或平滑肌细胞无法分化,从而引起血脑屏障破坏和

脑出血^[53]。尽管没有直接证据表明周细胞的异常能导致缺血性脑卒中发生,但是周细胞可能通过影响血管完整性来间接促进缺血的发病机制,例如,*Notch3*基因突变会引起周细胞无法存活,并形成遗传性脑中风疾病CADASIL^[52]。周细胞还可以通过调节活性氧(reactive oxygen species, ROS)来影响血脑屏障的完整性,周细胞中分泌的NOX4能催化ROS产生,NOX4在小鼠MCAO模型中的脑梗周围组织上调,周细胞中过表达NOX4将会导致MMP-9上调,进而引起血脑屏障受损^[54]。因此,在脑血管再生修复过程中,周细胞对于血脑屏障的重建恢复至关重要。

多项研究表明,在缺血性脑卒中发生后,周细胞能通过调节血管生成促进脑血管再生修复^[55-57]。许多重要的促血管生成因子,如VEGF和Ang/Tie2在周细胞中被发现^[51,58]。在小鼠的心肌梗塞模型中,将周细胞前体细胞移植到受损的心肌组织中,能促进血管生成、存活,并防止组织纤维化发生^[59]。将骨髓来源的周细胞移植到小鼠的缺血性脑组织中,能分化形成小胶质细胞和周细胞,这种骨髓来源的周细胞表达高水平的VEGF和TGF- β ^[60],暗示其在诱导缺血性血管生成和维持血管稳定性方面发挥重要功能。另外,周细胞来源的ADAMTS-1还能通过调节内皮细胞对血流剪切力的响应来对抗动脉粥样硬化的发展^[61]。由于VEGFA在血管再生过程中容易产生出血性转化的风险,最近研究发现,VEGFB可以替代VEGFA作为一种生存因子来维持血管存活,VEGFB能促进内皮细胞与周细胞的相互作用,刺激周细胞释放修复性血管生成因子,并与周细胞中的VEGFR1受体结合介导损伤区域脑血管稳定形成^[62]。

以周细胞为靶标治疗缺血性脑卒中可以促进脑血管再生修复,重建血脑屏障。通过调控PDGF/PDGFR β , TGF β , FOXF2, Notch, VEGF等信号通路能有效促进周细胞在脑血管再生中的功能^[63]。有研究发现RGS5是周细胞的标记物,在小鼠脑梗之后敲除RGS5会增加周细胞在内皮细胞的覆盖度,减缓血脑屏障受损,防止血管渗漏,并对梗死区周围的神经有保护作用^[64];而降低ROS和MMP9能有效防止周细胞介导的血脑屏障受损^[65]。但是以周细胞作为靶标治疗缺血性脑卒中也存在一些问题。首先,截至目前,周细胞的特异性标志物还不清楚,所有现有标记物除了标记周细胞之外还标记其他细胞,因此对于是否是周细胞在体内发挥功能

还有待进一步研究。其次,周细胞具有异质性,不同亚群的周细胞在脑血管再生过程中发挥的功能可能不同。因此,鉴定周细胞和周细胞亚群的特异性标志物是未来研究的主要方向^[66]。

4 血小板在脑血管再生修复中的作用

近来研究发现,脑血管再生过程中会激活血小板,血小板中储存了丰富的营养因子,包括VEGF, FGF2, PDGF和BDGF以及膜受体,包括VEGFR1和VEGFR2。激活的血小板会释放出小的亚细胞碎片(大小0.1~1 μm),这种碎片叫做血小板微颗粒(platelet microparticle, PMP),它能促进脑缺血后的血管生成和神经发生^[67]。PMP富含生长营养因子,除了具有促凝血和抗炎作用外,还能促进体外体内血管生成,改善大鼠心肌梗死表型,促进血运重建^[68]。此外,PMP孵育神经干细胞之后能促进其增殖和存活,提高神经干细胞分化为胶质细胞和神经元的潜能。激活的血小板及其产生的PMP可以作为促进神经干细胞和内皮前体细胞生长生存的迷你多重储存系统^[69]。

由于在组织损伤后血小板作为第一响应因子被迅速激活,因此血小板中的PMP可以作为缺血性脑卒中的潜在血液标志物帮助缺血性脑卒中患者获得快速诊断,同时,PMP还能作为急性溶血栓治疗后血运重建的生物标记物判断患者的预后情况^[70,71]。此外,血小板还通过分泌特异性的趋化因子参与脑血管再生修复。激活的血小板会分泌CXCL12,招募骨髓中的内皮前体细胞到达损伤区域,血小板源的CXCL12也能促进内皮前体细胞上的CXCR4与血小板黏附在一起,然后分化形成内皮细胞促进血管再生^[69,72]。但是在动脉粥样硬化和急性脑卒中发病过程中,血小板过度激活产生的高水平PMP会导致血栓形成增多,加剧心肌梗死和脑梗死的风险,此时需要通过药物干预防止血小板聚集增多和分泌释放PMP,以减少血小板在疾病发展过程中带来的副作用^[73]。

5 淋巴管生成引导脑血管再生的新策略

淋巴管是淋巴系统的一部分,是人的重要免疫监督器官,能吸收脂质,维持体液平衡^[74]。长期以来,中枢神经系统一直被认为不存在淋巴管,直到2015年

脑膜淋巴管的发现打破了此教条^[75,76]。大脑由三层膜结构的脑膜——硬脑膜、蛛网膜和软脑膜包裹,位于最外层的硬脑膜上含有静脉窦,具有将大脑中的血液从颅骨内排出去的作用。脑膜淋巴管沿着硬脑膜上的静脉窦旁生长,大脑来源的可溶性代谢废物通过脑脊液CSF运输到脑膜淋巴管,再顺着淋巴管排出到颈深部淋巴结,颈部淋巴结将大脑与外周的免疫系统直接连接起来^[76-80](图2A)。这种有趣的物理连接能介导代谢废物从大脑中移除并能控制大脑的免疫力,最近研究发现,脑脊液最初是通过脑膜淋巴管而不是通过脑膜静脉窦排出去的^[81,82]。许多神经性疾病涉及错误折叠蛋白的积累以及免疫功能的障碍,淋巴管能管理支配脑组织中废物的处理工作,发挥免疫监督功能。例如,在阿尔茨海默症疾病模型中添加VEGFC能促进脑膜淋巴管管径变大,使 β -淀粉样蛋白和tau蛋白从脑实质中排出到颈深部淋巴结,以改善学习记忆及空间认知的能力^[83]。脑膜淋巴管还能通过改变阿尔茨海默症中的小胶质细胞和血管内皮细胞来影响 β 淀粉样蛋白抗体对阿尔茨海默症的治疗效果^[84]。此外,在帕金森综合征中,脑膜淋巴管能清理 α -突触核蛋白缓解帕金森疾病中的多巴胺神经元损伤^[85];在脑瘤模型中,添加VEGFC能增强脑膜淋巴管的功能促进抗肿瘤的免疫T细胞活性^[86,87]。

脑膜淋巴管除了能影响中枢神经系统性疾病外,还能反过来受到神经系统中细胞和分子的调控。在小鼠的急性蛛网膜下腔出血模型中,颈深部淋巴结的脑脊液引流减少,异常的大分子和免疫细胞累积在大脑以及脑膜组织中,蛛网膜下出血会损害和阻碍脑膜淋巴管功能,导致相关并发症加剧恶化^[88]。在神经退行性疾病发展中,阿尔茨海默症中 β 淀粉样蛋白的沉积也能影响脑膜淋巴管的发育和功能^[84]。

脑膜淋巴管除了在上述的神经系统疾病中发挥重要功能外,在脑卒中疾病中也发挥了关键作用。在斑马鱼的缺血性脑卒中模型中,脑膜淋巴管对脑血管再生具有重要指导功能。斑马鱼的脑膜淋巴管内皮细胞不同于哺乳动物的脑膜淋巴管,其在正常生理情况下不呈管状结构,但能通过细胞内吞的方式吸收排出大分子和脑脊液中的废物,并通过分泌血管内皮生长因子VEGFA调控脑膜血管的生成^[89-91]。在光化学诱导的脑血栓和特异性药物诱导的脑血管损伤模型中发现,斑马鱼脑膜上的淋巴管内皮细胞能快速响应脑血管损伤

侵入受损脑实质,残留的血管内皮细胞会分泌VEGFC促进脑膜淋巴管内皮细胞活化,VEGFC是一种能促进脑膜淋巴管发育和扩张的重要调控因子。一方面在VEGFC的作用下,这些长入脑实质的脑膜淋巴管内皮细胞形成淋巴管腔排出缓解脑损伤之后产生的脑水肿,另一方面,这些脑膜淋巴管作为新生血管的“生长轨道”和支架指引新生血管生长迁移,二者通过物理连接相互作用。淋巴管对于脑血管的生长指引是不可或缺的。在缺乏淋巴管的突变体中,脑血管损伤之后会引起严重的脑水肿,且血管无法生长进入受损脑区,突变体会因为严重的脑损伤而最终死亡;当用激光特异性损伤作为“生长轨道”的淋巴管时,沿着轨道迁移的血管会因为失去支撑而退缩回去,没有淋巴管就无法完成脑血管再生重建。最后,脑血管再生完成恢复血运后,这些长入受损脑实质的淋巴管将通过发生自我凋亡而消失,从而使大脑实质恢复到最初无淋巴管的状态(图2B)。在此过程中,脑膜淋巴管一方面响应受损脑血管分泌的VEGFC进行淋巴管生成,另一方面通过物理作用支撑脑血管沿着其表面迁移生长恢复重建血管网络^[92]。

在小鼠的光化学诱导的脑血栓模型中,同样看到了脑膜淋巴管生成增多的现象,脑血管发生闭塞后,受损的大脑皮层会分泌促淋巴管生成因子,如VEGFC, Ephrin, 血管生成素等到达相邻的脑膜缺氧组织,诱导脑膜淋巴管沿着矢状窦的血管生长进入脑卒中区域^[93,94]。这种脑卒中后的淋巴管生成依赖于脑卒中发生的区域以及脑缺血的严重程度,较大的脑皮质血管损伤能刺激更多的淋巴管生成,光化学诱导的脑梗死区面积与新生淋巴管的数量呈正相关,脑膜淋巴管生成可能有助于减轻脑皮质损伤产生的脑水肿^[93]。在短暂性中脑动脉闭塞模型(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)中,结扎脑膜淋巴管将导致脑水肿加重和脑梗面积增大^[95]。虽然在淋巴管发育不全的突变体中,光化学诱导脑血栓并没有促使脑梗面积增大和产生脑卒中不良预后的表型,但是在tMCAO模型中,淋巴管发育不全将会增加脑梗死面积并加剧脑水肿^[93]。这些结果说明,脑膜淋巴管在脑缺血后的血管修复过程中发挥了重要作用。如果以心梗模型作类比,心肌缺血后产生的梗塞会诱导刺激淋巴管生成以减轻水肿改善心脏功能^[74],那么缺血性脑卒中后产生的促淋巴管生成也将有类似的修复大脑损伤功能。因此,

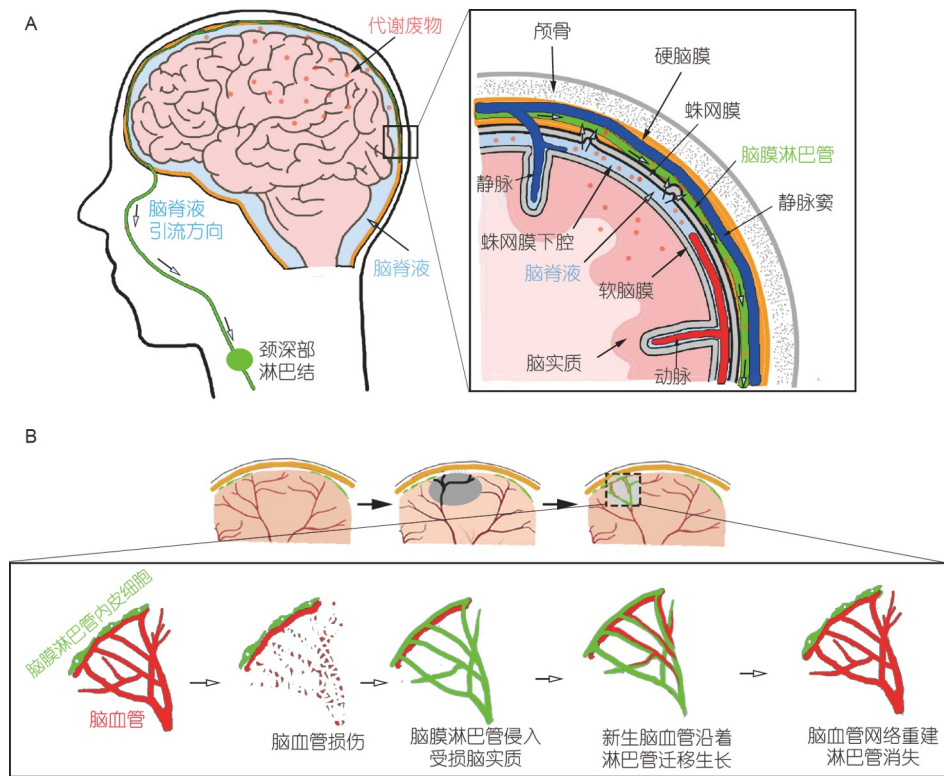


图 2 脑膜淋巴管在脑血管再生修复中的作用。A: 脑膜的结构以及脑膜淋巴管的主要功能——介导脑脊液中的代谢废物从脑膜淋巴管排出到颈深部淋巴结; B: 脑血管损伤后, 脑膜淋巴管内皮细胞快速响应脑缺血侵入受损脑区, 一方面能形成淋巴管排出缓解脑水肿, 另一方面作为“生长轨道”引导新生脑血管沿着其表面迁移生长重建血管网络, 脑血管完成再生后淋巴管消失, 使脑实质恢复到最初无淋巴管的状态

Figure 2 Functions of meningeal lymphatics in brain vascular repair and regeneration. A: The structure of meningeal lymphatic vessels and their main function—draining brain-derived soluble waste from meningeal lymphatic vessels into the deep cervical lymph nodes; B: in response to brain vascular injury, *in vivo* time-lapse imaging revealed that the meningeal lymphatic endothelial cells rapidly invade the injured brain parenchyma, forming lumenized lymphatic vessels. These invaded lymphatic vessels, on one hand, drain interstitial fluid to resolve cerebral edema, while on the other hand, they act as “growing tracks” to provide guidance and support for the growth of nascent blood vessels. The ingrown lymphatic vessels undergo apoptosis after brain vascular regeneration is complete

将脑膜淋巴管作为新的靶标来研究促进脑血管再生的策略具有重要的医学价值。

6 小胶质细胞在脑血管修复中的作用

小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞, 具有营养、保护和修复神经系统的作用, 也是大脑抵御各类损伤的重要防线, 与多种神经退行性疾病和神经炎症性疾病的发病机制紧密相关。小胶质细胞在生理条件下处于静息状态, 发挥“免疫监视与防御”的作用; 在神经系统损伤情况下, 小胶质细胞迅速激活, 发生极化, 进行细胞增殖、趋化、吞噬并分泌细胞因子和神经保护因子(图3A)。小胶质细胞按照分泌细胞因子

和细胞功能的不同可以分为两种极化表型, M1型和M2型。M1型小胶质细胞具有细胞毒性作用, 通过分泌IL-1 β , TNF, IL-12和IL-18等细胞因子促进炎症产生。M2型小胶质细胞通过分泌Arg-1以及IL-10等抑制炎症因子促进组织修复与再生^[96-99]。因此, 活化的小胶质细胞在血脑屏障和脑血管损伤修复过程中发挥双重功能。

小胶质细胞能分泌产生大量的细胞因子和趋化因子, 上调血管内皮细胞黏附分子并促进白细胞浸润产生炎症^[100]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种有效的促炎症刺激剂, 能通过TNF- α 和NADPH氧化酶机制诱导小胶质细胞激活, 促炎性小胶质细胞激活后一方面促使脑血管渗透性增加^[101,102], 另一方面诱导脑

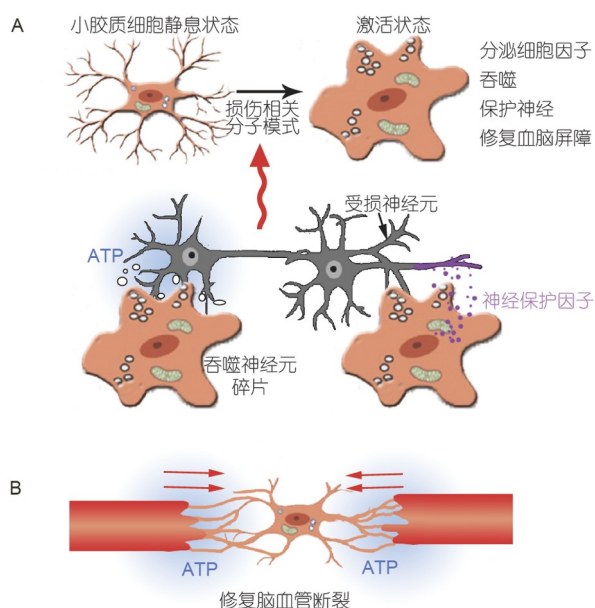


图3 小胶质细胞修复脑微血管断裂。A: 神经系统损伤后, 小胶质细胞从静息态变成激活状态, 发生极化, 进行细胞增殖, 吞噬神经元碎片, 分泌细胞因子和神经保护因子, 修复血脑屏障; B: 微血管断裂后, 断口会分泌ATP并招募小胶质细胞向两个断口伸出伪足, 通过物理黏附和机械力牵引的作用介导断裂的脑血管连接修复

Figure 3 Microglia mediate the repair of brain microvessels ruptures. A: Following neuronal damage, microglia change from resident state into activated state, become polarized, proliferate, phagocytize neuronal debris, secrete cytokines and neuroprotective factors, and repair the blood brain barrier; B: once rupture of brain blood vessel occurs, ATP is released from the rupture, microglia are attracted by extracellular ATP and form direct physical adhesions with endothelial ends, and repair the rupture through direct physical adhesion to the breaking points and generation of mechanical traction forces

血管内皮细胞中的P-gp功能障碍^[103], 导致脑内神经毒素蛋白积累。然而, 活化的小胶质细胞也有吞噬细胞碎片和抑制炎症反应的有益作用。在新生儿卒中模型中, 小胶质细胞缺失会造成血管密度和血管通透性增加, 并产生脑出血等不良影响, 这与抑制小胶质细胞中的TGF β 1信号有关^[84]。在慢性轻度缺氧诱导的脊髓血管短暂性血管渗漏模型中, 小胶质细胞的缺失会加重血管渗漏, 这与星形胶质细胞血管解偶联和紧密连接蛋白的丢失有关。进一步研究发现, Mac-1阳性的小胶质细胞在血管的修复过程中起主要作用^[104]。另外, 小胶质细胞还具有抗炎和神经保护的特性, 与卒中后恢复期的长期神经血管重塑和神经功能改善相关^[105]。小胶质细胞还可以通过分泌VEGF, IL-8和MMP-9促进血管生成^[106], 新生血管的生成将促进神经系统血供的恢复

和神经细胞的再生。

除了缺血性脑卒中之外的急性脑血管疾病, 还存在非常广泛的以脑微出血为主的慢性脑血管疾病, 这种疾病主要是由微血管断裂引起的, 随着年龄的增加, 出血点会越来越多, 微血管断裂修复对于维护脑神经功能, 预防出血性脑卒中非常重要。脑微出血后, 小胶质细胞除了通过分泌生物活性因子促进脑血管的修复与再生外, 还可以通过直接的物理作用修复脑血管损伤。在小鼠激光损伤血脑屏障的模型中, 小胶质细胞被发现血管损伤部位迅速聚集, 阻止血管的泄漏, 而抑制P2RY12受体将阻碍小胶质细胞的运动, 延长血管泄漏关闭的时间^[107], 说明小胶质细胞的直接黏附可以修补血脑屏障的损伤。另外, 在斑马鱼中, 利用激光去除单个脑血管内皮细胞制造脑血管断裂及微出血后, 小胶质细胞能被血管损伤迅速激活并迁移到脑血管损伤部位。同时脑血管断裂端口会向外界分泌ATP招募小胶质细胞向两个断裂的端口伸出伪足进行黏附。当小胶质细胞和血管断口的内皮细胞形成新的黏附连接后, 小胶质细胞会通过直接的机械力牵引血管的两个断口相互靠近, 最终形成新的连接, 小胶质细胞在血管损伤修复后即迁移离开。进一步研究发现, Rac1调控的微丝重塑在小胶质细胞修复脑血管断裂的过程中发挥重要的作用^[108](图3B)。这些现象说明, 小胶质细胞在修复血脑屏障受损以及促进微血管破裂修复过程中具有重要作用, 利用小胶质细胞的这种特点能用来预防脑出血早期的微血管破裂, 防止病情恶化。

7 脑血管与外周血管再生修复机制异同

与缺血性脑卒中的发病原因类似, 外周动脉疾病, 如下肢动脉疾病也是由动脉狭窄或堵塞导致的缺血性疾病, 病因多以动脉粥样硬化为主, 主要发病人群也集中在老年人。患有下肢动脉疾病的患者常常合并患有脑卒中和冠心病, 其发生心血管死亡的风险大大增加^[109], 了解外周血管再生修复机制有助于人们进一步深入研究脑血管再生修复机制。

与脑血管再生修复方式不同, 外周动脉再生修复的目的主要是促进血管再生, 血运重建, 而脑血管再生的主要目的是促进血运重建, 防止血脑屏障受损, 缓解脑水肿以及保护神经元, 促进功能恢复。由于不

需要重点考虑血脑屏障和神经功能等因素, 对于外周(如下肢)动脉疾病的治疗方法主要包括血管生成、动脉侧支循环建成以及移植干细胞促进成体血管发生三种方式^[110]. 通过比较外周血管再生治疗策略的优缺点可以对脑血管再生的治疗策略进行深入的认识. 第一, 下肢血管生成与脑血管生成类似, 下肢缺血后会诱导产生HIF-1 α , HIF-1 α 能激活促血管生成因子如VEGF, FGF和MMP等, 对下肢缺血动物应用VEGF, FGF, PDGF等能提高微血管密度和增加下肢血流量^[111]. 然而经过数年研究, 人们发现, 现阶段对于促血管生成因子在疾病发生发展中的剂量、传递方式和持续时间等认知仍然非常有限. 并且由于许多动物模型是通过对健康动物进行手术, 这种病理生物学过程与常年患有多种心血管疾病风险的老年患者不同, 因此血管生成策略虽然在前期动物模型中有效, 但是在大量的临床样本中却收效甚微, 这也提示人们动物模型的这种局限性也将对以后脑血管再生策略的发展带来限制^[112]. 第二, 动脉侧支循环建成是下肢动脉堵塞时, 侧支血管血流和血管剪切力增加, 从而引起侧支动脉内皮细胞增殖, 重塑形成血管的过程. 但是由于侧支动脉生成的异质性导致下肢缺血的严重程度各不相同, 这一点与脑血管侧支循环类似. 第三, 通过干细胞移植方法可以提高成年血管发生率, 下肢缺血后会分泌产生SDF-1, G-CSF, GM-CSF等趋化因子, 通过招募内皮前体细胞从骨髓动员到缺血组织可以分化形成新生血管^[47]. 研究表明, 通过移植自体骨髓来源的干细胞到缺血下肢虽然在伤口愈合率和保肢率上有所提高, 但它们移植后的生存周期很短, 使得促进下肢血管再生修复的效果不明显^[113]. 总之, 通过认识这些外周动脉再生修复的研究难点可以类推未来脑血管再生修复机制的研究方向以产生更好的治疗策略.

8 展望

脑血管疾病严重危害着人类的健康. 脑缺血后的前几个小时, 快速恢复血流是首要治疗策略, 对于适用于溶栓治疗的超急性期患者, 通过药物或者手术溶栓等方法都能有效减少病患的死亡率和致残率. 而在超急性脑卒中后期, 溶栓治疗已经无法完成血管再通, 强行溶栓治疗会造成更严重的后果, 引起缺血再灌注损伤. 此时, 促血管再生成为主要治疗策略, 该方法主

要通过联合应用血管内皮生长因子、神经血管靶向指引分子, 移植外周血中的内皮前体细胞到受损区域诱导血管密度增加. 但是这些治疗策略都并非完美, 每一种方法都有各自的缺点和难点. 例如, 添加血管内皮生长因子、神经血管靶向指引分子诱导血管功能性再生需要考虑很多的因素, 脑缺血后的不同时空微环境中, 这些分子信号途径的激活所带来的结果有可能是不同甚至是相反的, 需要通过每个个体的实际情况定制个性化的治疗策略; 移植EPC到受损脑区的方法还需要考虑EPC分离不准确、数目少、易分化、安全性不够高等问题.

周细胞作为血脑屏障的主要成分在脑血管再生过程中具有调节血管生成, 参与重建血脑屏障的重要作用, 但是由于周细胞有许多亚群细胞, 且每种亚群周细胞缺乏特异性标志物, 现阶段对于周细胞的真正功能还存在争议. 血小板在脑血管损伤后, 会激活细胞中的PMP, PMP中富含生长因子能促进神经血管再生修复. 此外, PMP还可以作为血液标志物对有缺血性脑卒中风险的患者进行预测和预后判断. 但值得注意的是, 在心血管疾病发生早期, 过多的PMP会导致血栓形成增多, 加剧梗死风险, 因此以PMP作为靶标治疗缺血性脑卒中需要考虑多重因素.

脊椎动物的脑膜淋巴管已经被证实在中枢神经性退行性疾病中扮演重要角色, 能将脑脊液中的代谢废物排出到颈深部淋巴结, 还能发挥免疫监督等功能. 在缺血性脑卒中疾病模型中, 不管是低等的斑马鱼还是高等的哺乳动物中都已明确脑膜淋巴管在脑缺血后的血管再生过程中具有重要作用. 首先, 脑膜淋巴管能在缺血发生后, 在受损脑皮质或残留脑血管分泌的促淋巴管生成因子作用下迁移长入受损脑区, 且淋巴管生成与脑缺血的严重程度呈正相关, 这些生长进入脑实质的淋巴管一方面能减轻脑皮质或脑损伤产生的脑水肿; 另一方面还能在血管损伤之后搭好“手脚架”引导新生脑血管生长进入受损脑区, 进而完成脑血管网的再生重建^[92,114]. 脑膜淋巴管在介导脑血管再生修复过程中具有非常重要且有意思的功能, 这些功能值得在更多更高级的实验动物中去尝试和探索. 脑膜淋巴管的新功能为实现梗死脑区的再血管化具有重要的潜在临床意义, 未来有望通过药物诱导的方式, 促进脑膜淋巴管进入受损脑组织帮助哺乳动物快速实现脑血管网再生, 为治疗缺血性脑卒中提供新的途径和思路.

小胶质细胞在中枢神经系统中具有重要的免疫监督功能, 它在神经系统损伤后发挥的促炎和抗炎功能提示它在血脑屏障和促脑血管生成过程中具有双重作用. 在脑血管微出血过程中, 小胶质细胞还具有防止血脑屏障受损和修复脑微血管断裂的功能, 小胶质细胞

的这种除免疫监督之外的特殊修复血管功能预示着其在预防出血性脑卒中发生过程中具有潜在的医学价值. 此外, 通过比较外周血管再生修复机制与脑血管再生修复机制的异同可以更好地帮助人们探索未来脑血管再生策略的研究方向.

参考文献

- 1 Virani S S, Alonso A, Aparicio H J, et al. Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report From the American Heart Association. *Circulation*, 2021, 143: e254
- 2 Bernhardt J, Borschmann K N, Kwakkel G, et al. Setting the scene for the second stroke recovery and rehabilitation roundtable. *Int J Stroke*, 2019, 14: 450–456
- 3 Ferro D, Heinen R, de Brito Robalo B, et al. Cortical microinfarcts and white matter connectivity in memory clinic patients. *Front Neurol*, 2019, 10
- 4 Ploughman M, Austin M W, Glynn L, et al. The effects of poststroke aerobic exercise on neuroplasticity: a systematic review of animal and clinical studies. *Transl Stroke Res*, 2015, 6: 13–28
- 5 Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein R A. Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA*, 2015, 313: 1451–1462
- 6 Gurewich V. Thrombolysis: a critical first-line therapy with an unfulfilled potential. *Am J Med*, 2016, 129: 573–575
- 7 Bang O Y, Goyal M, Liebeskind D S. Collateral circulation in ischemic stroke: assessment tools and therapeutic strategies. *Stroke*, 2015, 46: 3302–3309
- 8 Guglielmi V, LeCouffe N E, Zinkstok S M, et al. Collateral circulation and outcome in atherosclerotic versus cardioembolic cerebral large vessel occlusion. *Stroke*, 2019, 50: 3360–3368
- 9 Piedade G S, Schirmer C M, Goren O, et al. Cerebral collateral circulation: a review in the context of ischemic stroke and mechanical thrombectomy. *World Neurosurg*, 2019, 122: 33–42
- 10 Yao Y, Shaligram S S, Su H. Brain vascular biology. *Handb Clin Neurol*, 2021, 176: 49–69
- 11 Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 16–19
- 12 Rust R, Gantner C, Schwab M E. Pro- and antiangiogenic therapies: current status and clinical implications. *FASEB J*, 2019, 33: 34–48
- 13 Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodóvar C. Neurovascular communication during CNS development. *Dev Cell*, 2018, 45: 10–32
- 14 Rust R, Grönnert L, Weber R Z, et al. Refueling the ischemic CNS: guidance molecules for vascular repair. *Trends Neurosci*, 2019, 42: 644–656
- 15 Sarkar S, Chakraborty D, Bhowmik A, et al. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities. *Front Biosci*, 2019, 24: 435–450
- 16 Marti H J H, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*, 2000, 156: 965–976
- 17 Geiseler S J, Morland C. The janus face of VEGF in stroke. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1362
- 18 Boyer N P, Gupton S L. Revisiting netrin-1: one who guides (axons). *Front Cell Neurosci*, 2018, 12
- 19 Lu X, Le Noble F, Yuan L, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*, 2004, 432: 179–186
- 20 Larrivée B, Freitas C, Trombe M, et al. Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, 2007, 21: 2433–2447
- 21 Lu H, Wang Y, He X, et al. Netrin-1 hyperexpression in mouse brain promotes angiogenesis and long-term neurological recovery after transient focal ischemia. *Stroke*, 2012, 43: 838–843
- 22 Yu J, Li C, Ding Q, et al. Netrin-1 ameliorates blood-brain barrier impairment secondary to ischemic stroke via the activation of PI3K pathway. *Front Neurosci*, 2017, 11
- 23 Podjaski C, Alvarez J I, Bourbonniere L, et al. Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation. *Brain*, 2015, 138: 1598–

1612

- 24 He X, Liu Y, Lin X, et al. Netrin-1 attenuates brain injury after middle cerebral artery occlusion via downregulation of astrocyte activation in mice. *J Neuroinflammation*, 2018, 15: 268
- 25 Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 240–256
- 26 Malik V A, Di Benedetto B. The blood-brain barrier and the EphR/Ephrin system: perspectives on a link between neurovascular and neuropsychiatric disorders. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11
- 27 Herbert S P, Huisken J, Kim T N, et al. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*, 2009, 326: 294–298
- 28 Tae N, Lee S, Kim O, et al. Syntenin promotes VEGF-induced VEGFR2 endocytosis and angiogenesis by increasing ephrin-B2 function in endothelial cells. *Oncotarget*, 2017, 8: 38886–38901
- 29 Coucha M, Barrett A C, Elgebaly M, et al. Inhibition of Ephrin-B2 in brain pericytes decreases cerebral pathological neovascularization in diabetic rats. *PLoS ONE*, 2019, 14: e0210523
- 30 Ghorri A, Freimann F B, Nieminen-Kelhä M, et al. EphrinB2 activation enhances vascular repair mechanisms and reduces brain swelling after mild cerebral ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37: 867–878
- 31 Epstein J A, Aghajanian H, Singh M K. Semaphorin signaling in cardiovascular development. *Cell Metab*, 2015, 21: 163–173
- 32 Valdembrì D, Regano D, Maione F, et al. Class 3 semaphorins in cardiovascular development. *Cell Adh Migr*, 2016, 10: 641–651
- 33 Yu R, Kim N S, Li Y, et al. Vascular Sema3E-Plexin-D1 signaling reactivation promotes post-stroke recovery through VEGF downregulation in mice. *Transl Stroke Res*, 2021, doi: 10.1007/s12975-021-00914-4
- 34 Zhou Y F, Chen A Q, Wu J H, et al. Sema3E/PlexinD1 signaling inhibits postischemic angiogenesis by regulating endothelial DLL4 and filopodia formation in a rat model of ischemic stroke. *FASEB J*, 2019, 33: 4947–4961
- 35 Hou S T, Nilchi L, Li X, et al. Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage. *Sci Rep*, 2015, 5: 7890
- 36 Joyal J S, Sitaras N, Binet F, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood*, 2011, 117: 6024–6035
- 37 Cerani A, Tetreault N, Menard C, et al. Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab*, 2013, 18: 505–518
- 38 Pekcec A, Yigitkanli K, Jung J E, et al. Following experimental stroke, the recovering brain is vulnerable to lipoxygenase-dependent semaphorin signaling. *FASEB J*, 2013, 27: 437–445
- 39 Adams R H, Eichmann A. Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2010, 2: a001875
- 40 Jones C A, London N R, Chen H, et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat Med*, 2008, 14: 448–453
- 41 Zhang F, Prahst C, Mathivet T, et al. The Robo4 cytoplasmic domain is dispensable for vascular permeability and neovascularization. *Nat Commun*, 2016, 7: 13517
- 42 Han H, Geng J. Over-expression of Slit2 induces vessel formation and changes blood vessel permeability in mouse brain. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32: 1327–1336
- 43 Esquivia G, Grayston A, Rosell A. Revascularization and endothelial progenitor cells in stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315: C664–C674
- 44 Liman T G, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 33: 492–499
- 45 Hill W D, Hess D C, Martin-Studdard A, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63: 84–96
- 46 Ma F, Moranchó A, Montaner J, et al. Endothelial progenitor cells and revascularization following stroke. *Brain Res*, 2015, 1623: 150–159
- 47 Frangiogiannis N G. Cell therapy for peripheral artery disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 39: 27–34
- 48 Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*, 2007, 11: 18–25
- 49 Stoltz J F, de Isla N, Li Y P, et al. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21st century. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 1–19
- 50 Cai W, Liu H, Zhao J, et al. Pericytes in brain injury and repair after ischemic stroke. *Transl Stroke Res*, 2017, 8: 107–121
- 51 Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, et al. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic

- stroke. *Brain Res*, 2016, 1630: 98–108
- 52 Kofler N M, Cuervo H, Uh M K, et al. Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL and results in arteriovenous malformations. *Sci Rep*, 2015, 5: 16449
- 53 Reyahi A, Nik A M, Ghiami M, et al. Foxf2 is required for brain pericyte differentiation and development and maintenance of the blood-brain barrier. *Dev Cell*, 2015, 34: 19–32
- 54 Nishimura A, Ago T, Kuroda J, et al. Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36: 1143–1154
- 55 Geranmayeh M H, Rahbarghazi R, Farhoudi M. Targeting pericytes for neurovascular regeneration. *Cell Commun Signal*, 2019, 17: 26
- 56 Su X, Huang L, Qu Y, et al. Pericytes in cerebrovascular diseases: an emerging therapeutic target. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13
- 57 Caporarello N, D'Angeli F, Cambria M T, et al. Pericytes in microvessels: from “mural” function to brain and retina regeneration. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6351
- 58 Teichert M, Milde L, Holm A, et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun*, 2017, 8: 16106
- 59 Katare R, Riu F, Mitchell K, et al. Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132. *Circ Res*, 2011, 109: 894–906
- 60 Kokovay E, Li L, Cunningham L A. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 545–555
- 61 Schrimpf C, Koppen T, Duffield J S, et al. TIMP3 is regulated by pericytes upon shear stress detection leading to a modified endothelial cell response. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2017, 54: 524–533
- 62 Jean LeBlanc N, Guruswamy R, ElAli A. Vascular endothelial growth factor isoform-b stimulates neurovascular repair after ischemic stroke by promoting the function of pericytes via vascular endothelial growth factor receptor-1. *Mol Neurobiol*, 2017, 55: 3611–3626
- 63 Uemura M T, Maki T, Ihara M, et al. Brain microvascular pericytes in vascular cognitive impairment and dementia. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12
- 64 Özen I, Roth M, Barbariga M, et al. Loss of regulator of G-protein signaling 5 leads to neurovascular protection in stroke. *Stroke*, 2018, 49: 2182–2190
- 65 Underly R G, Levy M, Hartmann D A, et al. Pericytes as inducers of rapid, matrix metalloproteinase-9-dependent capillary damage during ischemia. *J Neurosci*, 2017, 37: 129–140
- 66 Gautam J, Yao Y. Roles of pericytes in stroke pathogenesis. *Cell Transplant*, 2018, 27: 1798–1808
- 67 Hayon Y, Dashevsky O, Shai E, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Curr Neurovasc Res*, 2012, 9: 185–192
- 68 Becker R C, Sexton T, Smyth S S. Translational implications of platelets as vascular first responders. *Circ Res*, 2018, 122: 506–522
- 69 Mancuso M E, Santagostino E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *Br J Haematol*, 2017, 178: 209–219
- 70 Bivard A, Lincz L F, Maquire J, et al. Platelet microparticles: a biomarker for recanalization in rtPA-treated ischemic stroke patients. *Ann Clin Transl Neurol*, 2017, 4: 175–179
- 71 El-Gamal H, Parray A S, Mir F A, et al. Circulating microparticles as biomarkers of stroke: A focus on the value of endothelial- and platelet-derived microparticles. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 16739–16754
- 72 Rosińska J, Łukasik M, Kozubski W. The Impact of vascular disease treatment on platelet-derived microvesicles. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2017, 31: 627–644
- 73 Ed Nignpense B, Chinkwo K A, Blanchard C L, et al. Polyphenols: modulators of platelet function and platelet microparticle generation? *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 146
- 74 Oliver G, Kipnis J, Randolph G J, et al. The lymphatic vasculature in the 21st century: novel functional roles in homeostasis and disease. *Cell*, 2020, 182: 270–296
- 75 Aspelund A, Antila S, Proulx S T, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*, 2015, 212: 991–999
- 76 Louveau A, Smirnov I, Keyes T J, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 2015, 523: 337–341
- 77 Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal immunity and its function in maintenance of the central nervous system in health and

- disease. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 597–620
- 78 Papadopoulos Z, Herz J, Kipnis J. Meningeal lymphatics: from anatomy to central nervous system immune surveillance. *J Immunol*, 2020, 204: 286–293
 - 79 Louveau A, Plog B A, Antila S, et al. Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest*, 2017, 127: 3210–3219
 - 80 Louveau A, Herz J, Alme M N, et al. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 1380–1391
 - 81 Ahn J H, Cho H, Kim J H, et al. Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature*, 2019, 572: 62–66
 - 82 Ma Q, Decker Y, Müller A, et al. Clearance of cerebrospinal fluid from the sacral spine through lymphatic vessels. *J Exp Med*, 2019, 216: 2492–2502
 - 83 Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, et al. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature*, 2018, 560: 185–191
 - 84 Da Mesquita S, Papadopoulos Z, Dykstra T, et al. Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-A β immunotherapy. *Nature*, 2021, 593: 255–260
 - 85 Zou W, Pu T, Feng W, et al. Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson’s disease-like pathology in mice overexpressing mutated α -synuclein. *Transl Neurodegener*, 2019, 8: 7
 - 86 Hu X, Deng Q, Ma L, et al. Meningeal lymphatic vessels regulate brain tumor drainage and immunity. *Cell Res*, 2020, 30: 229–243
 - 87 Song E, Mao T, Dong H, et al. VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature*, 2020, 577: 689–694
 - 88 Pu T, Zou W, Feng W, et al. Persistent malfunction of glymphatic and meningeal lymphatic drainage in a mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol*, 2019, 28: 104–118
 - 89 Bower N I, Koltowska K, Pichol-Thievend C, et al. Mural lymphatic endothelial cells regulate meningeal angiogenesis in the zebrafish. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 774–783
 - 90 van Lessen M, Shibata-Germanos S, van Impel A, et al. Intracellular uptake of macromolecules by brain lymphatic endothelial cells during zebrafish embryonic development. *eLife*, 2017, 6
 - 91 Venero Galanternik M, Castranova D, Gore A V, et al. A novel perivascular cell population in the zebrafish brain. *eLife*, 2017, 6: e24369
 - 92 Chen J, He J, Ni R, et al. Cerebrovascular injuries induce lymphatic invasion into brain parenchyma to guide vascular regeneration in zebrafish. *Dev Cell*, 2019, 49: 697–710.e5
 - 93 Yanev P, Poinssatte K, Hominick D, et al. Impaired meningeal lymphatic vessel development worsens stroke outcome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40: 263–275
 - 94 Gu W G, Brännström T, Jiang W, et al. Vascular endothelial growth factor-A and -C protein up-regulation and early angiogenesis in a rat photothrombotic ring stroke model with spontaneous reperfusion. *Acta Neuropathol*, 2001, 102: 216–226
 - 95 Si J, Chen L, Xia Z. Effects of cervical-lymphatic blockade on brain edema and infarction volume in cerebral ischemic rats. *Chin J Physiol*, 2006, 49: 258–265
 - 96 Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 2015, 131: 65–86
 - 97 Hu X, Leak R K, Shi Y, et al. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11: 56–64
 - 98 Jiang X, Pu H, Hu X, et al. A post-stroke therapeutic regimen with omega-3 polyunsaturated fatty acids that promotes white matter integrity and beneficial microglial responses after cerebral ischemia. *Transl Stroke Res*, 2016, 7: 548–561
 - 99 Xiong X Y, Liu L, Yang Q W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*, 2016, 142: 23–44
 - 100 da Fonseca A C C, Matias D, Garcia C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 362
 - 101 Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, et al. Tumor necrosis factor- α mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112: 251–254
 - 102 Sumi N, Nishioku T, Takata F, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30: 247–253

- 103 Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett*, 2012, 524: 45–48
- 104 Fernández-López D, Faustino J, Klibanov A L, et al. Microglial cells prevent hemorrhage in neonatal focal arterial stroke. *J Neurosci*, 2016, 36: 2881–2893
- 105 Halder S K, Milner R. A critical role for microglia in maintaining vascular integrity in the hypoxic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 26029–26037
- 106 Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock J D, et al. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, 2015, 127–128: 1–22
- 107 Lou N, Takano T, Pei Y, et al. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 1074–1079
- 108 Liu C, Wu C, Yang Q, et al. Macrophages mediate the repair of brain vascular rupture through direct physical adhesion and mechanical traction. *Immunity*, 2016, 44: 1162–1176
- 109 Farber A, Eberhardt R T. The current state of critical limb ischemia. *JAMA Surg*, 2016, 151: 1070–1077
- 110 Cooke J P, Meng S. Vascular regeneration in peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40: 1627–1634
- 111 Cooke J P, Losordo D W. Modulating the vascular response to limb ischemia. *Circ Res*, 2015, 116: 1561–1578
- 112 Iyer S R, Annex B H. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery Disease. *JACC Basic Transl Sci*, 2017, 2: 503–512
- 113 Qadura M, Terenzi D C, Verma S, et al. Concise review: cell therapy for critical limb ischemia: an integrated review of preclinical and clinical studies. *Stem Cells*, 2018, 36: 161–171
- 114 Chen J, Li X, Ni R, et al. Acute brain vascular regeneration occurs via lymphatic transdifferentiation. *Dev Cell*, 2021, 56: 3115–3127.e6

The cellular and molecular mechanisms of cerebrovascular regeneration and repair

CHEN JingYing^{1,2}, LIU Chi³ & LUO LingFei²

1 Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, China;

2 Institute of Developmental Biology and Regenerative Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3 Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China

Stroke is a severe acute cerebrovascular disease that can cause a number of neuronal deaths and brain edema. The treatment of ischemic stroke mainly includes hyperacute vascular recanalization and later pro-angiogenesis therapy. At present, the promotion of angiogenesis is mainly through the combined application of vascular growth factors and guidance molecules, and the transplantation of endothelial progenitor cells to promote vascular regeneration and repair. Pericytes can promote angiogenesis and rebuild brain-blood-barrier. Activated platelets shed microparticles, which contain a variety of growth factors central to angiogenesis and neurogenesis during brain vascular regeneration. The newly discovered meningeal lymphatic vessels can invade the injured parenchyma to resolve edema and act as “growing tracks” to guide the growth of nascent blood vessels. These functions of pericytes, platelets, and the meningeal lymphatics suggest their potential as novel pro-angiogenic targets for ischemic stroke. In addition to ischemic stroke, microbleeds resulting from ruptures in microvessels are also a very extensive chronic cerebrovascular disease. After cerebral microbleeds, microglia can mediate the repair of brain vascular rupture through direct physical adhesion and mechanical traction. Here, we review the cellular and molecular mechanisms in cerebral vascular regeneration and repair. In addition, we provide our perspectives for future mechanistic studies and treatment strategies for neurovascular diseases.

cerebrovascular regeneration, guidance molecules, endothelial progenitor cells, pericytes, platelets, meningeal lymphatic vessels, microglia

doi: [10.1360/SSV-2021-0231](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0231)