

• 专题研究:卒中 •

中性粒细胞:卒中再灌注治疗的绊脚石

陈 微,吴海银,朱东亚*

南京医科大学药学院临床药理学系,江苏 南京 211166

[摘要] 卒中是一种由多种病因引起的缺血或出血导致的急性神经损伤,具有发病率高、病死率高、致残率高的特点。溶栓和血管内取栓术等再灌注治疗是美国食品和药品监督管理局批准的治疗急性缺血性卒中的唯一方法,但出血转化(hemorrhagic transformation, HT)、溶栓药抵抗和再灌注无复流等不良事件显著限制了再灌注治疗的临床获益。虽然导致再灌注治疗后HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流的因素复杂,但中性粒细胞在其中发挥的作用至关重要。基于近年来的最新研究进展,文章重点介绍中性粒细胞在急性缺血性卒中病理生理过程中的主要作用,中性粒细胞导致再灌注治疗后HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流的具体机制,以及靶向中性粒细胞,防止或减轻再灌注后HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流的策略,旨在为缺血性脑卒中的临床治疗和药物研发提供新思路。

[关键词] 中性粒细胞;再灌注治疗;出血转化;溶栓药抵抗;再灌注无复流

[中图分类号] R743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)05-593-12

doi: 10.7655/NYDXBNSN241207

Neutrophils: a stumbling block in stroke reperfusion therapy

CHEN Wei, WU Haiyin, ZHU Dongya*

Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] Stroke is an acute neurologic injury caused by ischemia or hemorrhage that stems from a wide range of pathologies, with high rates of morbidity, mortality, and disability. Thrombolysis and endovascular thrombectomy are the only Food and Drug Administration in United States of America approved methods for the treatment of acute ischemic stroke (AIS), but clinical benefits of the reperfusion therapy are significantly limited by hemorrhagic transformations (HT), the resistance to thrombolytic drugs, and reperfusion no-reflow. Although the factors leading to these problems are complex, neutrophils play the most critical role in them. Based on the latest research progress in recent years, this review focuses on the role of neutrophils in mediating the pathophysiological events of AIS, the specific mechanisms by which neutrophils cause HT, thrombolytic drug resistance, and no-reflow after reperfusion therapy, as well as strategies targeting neutrophils to prevent or alleviate these complications following reperfusion therapy, offering new insights for the clinical therapy and drug development of ischemic stroke.

[Key words] neutrophil; reperfusion therapy; hemorrhagic transformation; thrombolytic resistance; reperfusion no-reflow

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(05): 593-604]

卒中又名中风,分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两种类型,具有发病率高、病死率高、致残率高的特点^[1]。目前美国食品和药品监督管理局批准的治疗急性缺血性卒中(acute ischemic stroke, AIS)的方法,均旨在实现缺血区域再灌注,又称“再灌注治

[基金项目] 国家自然科学基金(82090042)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dyzhu@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0001-8398-6765)

疗”,包括溶栓和血管内取栓术,其中静脉溶栓是AIS再灌注治疗的主要手段^[2]。迄今,组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)仍是唯一被批准用于治疗AIS的溶栓药物^[3]。tPA是一种丝氨酸蛋白水解酶,其溶栓机制是激活内源性纤溶酶原转变为纤溶酶。重组tPA(recombinant tPA, rtPA)阿替普酶(alteplase,商品名Activase)是生物合成的人源tPA,自1995年tPA首次被确认为AIS

的有效治疗方法以来,一直是临床使用的主要溶栓药物。rtPA不仅在血浆中的半衰期短,溶栓治疗的时间窗窄,还容易造成出血转化(hemorrhagic transformation, HT)和溶栓药抵抗,这些都是限制其广泛应用的重要原因。HT是卒中本身的一种病理生理表现,但rtPA溶栓大大增加了其发生率和严重程度。接受rtPA溶栓治疗的患者症状性脑出血发生率为6.4%,而安慰剂对照组仅0.6%,症状性脑出血的病死率可高达60%^[4]。为了延长半衰期,通过基因修饰又设计出了替奈普酶(tenecteplase, TNK)。最近Meta分析研究发现,与阿替普酶相比, TNK治疗组在24 h内出现早期神经功能改善的患者比例略高,无残疾患者比例和功能独立程度更高。然而TNK组颅内出血的发生率高于阿替普酶组,两组的全因死亡率相似^[5]。

对于大血管闭塞引起的卒中患者,通过血管内取栓(endovascular thrombectomy, EVT)的血管内治疗的适应证已扩展到较大的核心梗死和基底动脉闭塞,治疗时间窗已增加到卒中发作后24 h^[6]。然而, HT也是AIS患者EVT后常见且严重的并发症^[7]。在EVT领域,成功再通后的临床无效再灌注是缺血卒中EVT再灌注治疗的另一个挑战。越来越多的临床研究估计了再灌注治疗后卒中患者再灌注无复流现象的发生率,根据其评估方法或研究人群不同,其发生率为3.3%~63%^[8]。

不仅多种因素参与再灌注治疗后的HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流,大量证据还表明中性粒细胞起到至关重要的作用。文章将讨论中性粒细胞如何介导再灌注治疗后的HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流。

1 中性粒细胞与卒中的病理生理机制

中性粒细胞是白细胞的一种,来源于骨髓中的髓样干细胞,通过血液分布到身体的各个部位,参与机体的免疫防御^[9]。不同的骨髓可能产生功能不同的中性粒细胞,与血液中的中性粒细胞相比,来自颅骨骨髓的脑膜中性粒细胞表现出不同的转录谱,并在卒中时直接渗透到中枢神经系统(central nervous system, CNS)^[10]。中性粒细胞是卒中发作后第1个被招募的循环免疫细胞。卒中发作后,中性粒细胞通过其表面整合素巨噬细胞-1抗原(macrophage-1 antigen, MAC-1)与活化的内皮细胞P-选择素和E-选择素相互作用,在内皮表面减速和滚动。这种滚动现象可以在卒中2 h内在软脑膜中看到。

然后,中性粒细胞通过与黏附分子,特别是细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)的相互作用附着在内皮细胞上。接着它们可以渗出,浸润脑实质,并随着趋化因子和细胞因子的浓度梯度向病变处迁移^[4, 11]。中性粒细胞从以下几个路径影响卒中的病理生理过程。

1.1 中性粒细胞与氧化/硝化应激

AIS后,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的过度产生诱导损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)分子的释放,然后DAMP分子与ROS和RNS一起通过激活小胶质细胞、破坏血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)和募集外周免疫细胞引发炎症反应,导致脑梗死的继发性进展^[12]。

ROS由两个亚类组成:高反应性自由基和非自由基物质。自由基包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟基(HO^{\cdot})、过氧烷基(ROO^{\cdot})和烷氧基(RO^{\cdot}),而过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧(1O_2)、次氯酸根阴离子($HOCl$)和臭氧代表非自由基物质^[13-14]。RNS是指一氧化氮(nitric oxide, NO)与包括 $O_2^{\cdot-}$ 在内的化合物相互作用,衍生出一系列包括亚硝酸阴离子($ONOO^-$)和过氧亚硝酸($HOONO$)等具有高度氧化活性的自由基和硝基类化合物^[14-15]。

中性粒细胞能大量产生ROS和RNS,是其具有的独特性^[16]。中性粒细胞内ROS产生的主要机制涉及不同类型NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)复合物的激活^[17],其中,NOX2是该复合物的主要催化亚基,在膜中组装并通过还原氧气产生 $O_2^{\cdot-}$ ^[18]。而后 $O_2^{\cdot-}$ 歧化产生的 H_2O_2 ,进一步刺激中性粒细胞脱颗粒,释放髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)。MPO通过与 H_2O_2 相互作用催化 Cl^- 的氧化,形成 $HOCl$ 、 HO^{\cdot} 、氯胺和低硫氰酸盐等次级氧化剂^[13]。人类中性粒细胞表达丰富的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)^[19],而来自iNOS催化产生的NO与 $O_2^{\cdot-}$ 反应生成毒性强大的 $ONOO^-$ 。虽然中性粒细胞产生的ROS和RNS是强大的抗菌产物,对吞噬的病原体清除至关重要,但由于卒中后髓系动员产生的中性粒细胞大量进入脑血管和脑实质,过量产生的ROS和RNS进一步恶化缺血/再灌注损伤^[20-22]。

1.2 中性粒细胞与炎症因子

中性粒细胞颗粒在骨髓成熟过程中形成。嗜

天青颗粒或初级颗粒富含MPO, 次级颗粒含有乳铁蛋白, 三级颗粒含有明胶酶和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9以及其他蛋白质^[23]。颗粒内容物释放到环境中是由多种刺激因子调节和触发的, 这个过程具有选择性, 因为特定的受体-配体耦联会触发特定类型颗粒的释放^[9]。

中性粒细胞从骨髓中动员依赖于其膜上表达的趋化因子受体(chemokine receptor, CXCR)2和CXCR4。激动CXCR2导致其从骨髓入血, 而激动CXCR4则使其保留在骨髓中^[24]。作为先天免疫的第一反应者, 组织损伤后中性粒细胞沿着趋化因子配体(chemokine ligand, CXCL)和DAMP分子的浓度梯度到达损伤部位, 沿着血管黏附和滚动, 然后牢固地黏附在内皮细胞上并进入组织。进入组织是通过三级颗粒释放MMP-9完成的。一旦进入组织, 受损组织释放的CXCL, 如CXCL-1、CXCL-2、CXCL-3、CXCL-5、CXCL-6和白三烯B4(leukotriene B4, LTB4)等, 触发不同的细胞功能, 导致脱颗粒、ROS/RNS的产生、中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)形成和细胞因子的释放^[25-26]。

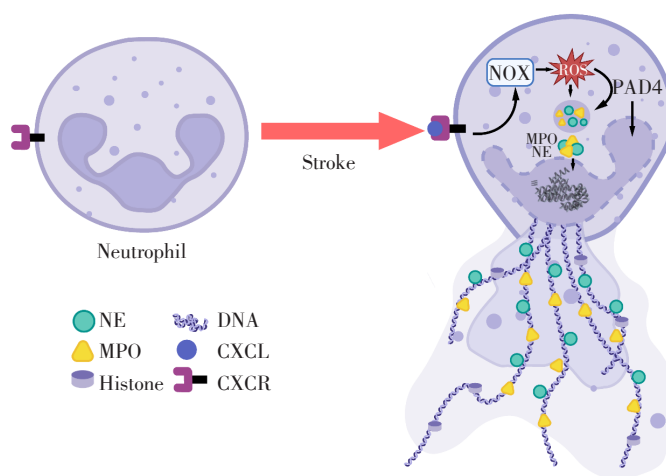
人类中性粒细胞产生的细胞因子种类繁多; 包括抗炎因子, 如白细胞介素(interleukin, IL)-1受体拮抗剂、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1和TGF- β 2等, 促炎细胞因子, 如IL类(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8)、肿瘤坏死因子(tumor ne-

crisis factor, TNF)- α 、趋化因子类(CXCL-1、CXCL-2、CXCL-8、CXCL-12)和免疫调节细胞因子(IL-22、IL-23)等^[23]。促炎细胞因子的不受控制释放会加剧炎症并导致免疫病理损伤, 在脑缺血/再灌注损伤中扮演重要角色。

1.3 NET

NET是由DNA、核蛋白和最初包含在颗粒或中性粒细胞胞质中的蛋白质组成的结构, 其形成机制涉及激活NOX产生ROS、染色质去致密、蛋白质组装和膜通透性改变^[9, 27]。中性粒细胞在受到外部因素刺激后, 激活NOX释放ROS。NOX和ROS的激活导致肽基精氨酸脱氨酶4(protein-arginine deiminase type 4, PAD4)的分泌, 而后PAD4作用于嗜天青颗粒并诱导中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和MPO等蛋白质的释放。分泌的PAD4进入细胞核导致组蛋白瓜氨酸化。MPO和NE入细胞核促进染色质去致密和核膜破坏。中性粒细胞质膜破裂后, 去致密的染色质与颗粒蛋白结合, 并在细胞外释放形成网状DNA结构, 即NET^[28](图1)。

NET形成事件以及随之而来的DNA和相关酶及核蛋白的释放触发了不可逆地损害宿主组织的炎症反应。NET通过多种机制参与卒中的病理过程。活化的血小板促进NET的形成, NET也诱导血小板活化, 导致血栓形成^[29]。此外, NET的DNA骨



After stroke, CXCR on neutrophils are stimulated by ligands, leading to the release of ROS through activating NOX. NOX and ROS together lead to the secretion of PAD4, which then acts on cytoplasmic azurophilic granules and induces the release of proteins such as NE and MPO. Then PAD4 causes histone citrullination after entering the nucleus, while MPO and NE cause chromatin decondensation and nuclear membrane disruption after entering the nucleus. The decondensed chromatin combines with the granular proteins and is released outside the cell to form a network-like DNA structure, known as NET. NOX: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; ROS: reactive oxygen species; PAD4: protein-arginine deiminase type 4; NE: neutrophil elastase; MPO: myeloperoxidase; CXCL: chemokine ligand; CXCR: chemokine receptor.

图1 卒中诱发NET形成的机制

Figure 1 Mechanism of the stroke-induced NET formation

架为血栓提供了支架,促进了凝血级联反应^[30]。MPO和DNA是监测NET的特定、客观的定量生物标志物^[30]。在缺血性卒中患者的脑组织中发现了大量形成NET的中性粒细胞,血浆NET生物标志物升高与卒中预后恶化相关^[31]。NET在脑组织的积累加剧了BBB损坏,阻碍了血管新生,诱导了明显的神经功能缺损,促进缺血性卒中后rtPA诱导的HT和溶栓抵抗^[32-33]。此外,在卒中恢复期,NET释放还阻碍脑血管重塑^[34]。

1.4 中性粒细胞与BBB破坏

中性粒细胞在稳态条件下可穿过微血管并渗出到大多数组织中。在感染或机体损伤期间大量中性粒细胞被招募到受损组织中,其透过微血管的能力也显著增强。一旦中性粒细胞离开血流,它们就会遇到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。ECM是蛋白质和糖胺聚糖构成的复杂网络,形成围绕和支撑细胞的支架^[35]。ECM位于上皮或内皮层的底部,将细胞与周围的基质分离,作为物质转移的屏障^[9]。脑内的星形胶质细胞和血管内皮细胞是构成BBB的神经血管单元的主要组成部分,这些细胞表达整合素黏附受体,将细胞锚定在ECM上,从而保持BBB的完整性,调节外周血和CNS之间的分子和细胞运输^[36]。大脑的ECM由3部分组成:神经ECM,它是大脑的结缔组织,为神经元和胶质细胞提供活性支架;基底膜(basement membrane, BM),它构成BBB的内部;管腔ECM,它与外周血接触,也是BBB的血管内成分^[37]。

在骨髓成熟过程中,中性粒细胞在其颗粒中储存了一系列蛋白酶,这些蛋白酶会降解ECM蛋白,其中,丝氨酸蛋白酶,包括弹性蛋白酶、蛋白酶3和组织蛋白酶G,是初级颗粒的重要组成部分,可以分解弹性蛋白、纤维连接蛋白、层黏连蛋白和IV型胶原^[9]。降解基质的MMP主要存在于第2和第3颗粒中,可以降解所有类型的基质蛋白,包括所有类型的胶原蛋白^[38]。

CNS免疫性炎症时中性粒细胞浸润释放多种细胞因子,如MMP,从而降解ECM中的多种蛋白^[39],破坏BBB。损伤的BBB允许中性粒细胞外渗到脑实质,从而增加有害炎症介质的释放。在卒中时,纤维蛋白和纤维蛋白原也可通过破裂的BBB从血液中渗出,导致大脑的继发性损伤^[37]。因此,卒中后中性粒细胞积聚及促炎介质和蛋白酶释放,加剧微血管紧密连接解体、内皮功能障碍和ECM降解,导致不可逆的BBB破坏^[40]。

急性CNS损伤和几种神经系统疾病中,已经观察到脑内ECM重塑^[41]。ECM重塑通常以时间依赖的方式发生,急性损伤后不久ECM快速降解,随后ECM分子开始合成和沉积。若新合成的ECM分子沉积在脑实质,则参与胶质瘢痕的形成;若沉积在血管,则导致血管炎症^[42]。反过来,ECM可调节中性粒细胞的行为和募集:在炎症情况下,中性粒细胞释放MMP-8和MMP-9,将胶原蛋白分解成具有趋化活性的生物活性ECM片段。ECM基底膜中的层黏连蛋白可以发出信号,上调中性粒细胞上CD31和整合素 $\alpha 6 \beta 1$ 的表达,从而促进跨膜转运和浸润到炎症组织中^[9]。

2 中性粒细胞与再灌注治疗

2.1 中性粒细胞与溶栓导致的HT

HT是指缺血再灌注后导致的梗死区域自发性脑出血和药物溶栓等导致的继发性出血,出血部位既可以在梗死灶内也可以在梗死灶远隔部位。流行病学调查结果显示,溶栓治疗后继发性HT发生率为5%~7%^[43]。症状性HT可导致梗死扩大和病死率增加,AIS患者与溶栓相关的严重实质性出血80%发生在治疗后12h内,往往导致早期死亡或恶化治疗预后,是AIS患者使用tPA静脉溶栓的主要局限性^[44]。静脉溶栓导致HT发生的病理机制是一个复杂的多因素动态过程,目前认为主要有缺血/再灌注损伤、BBB破坏、神经免疫炎症、ROS和RNS及tPA自身的神经毒性等,中性粒细胞在其中起关键作用。

中性粒细胞增多与AIS患者rtPA溶栓后症状性脑出血、死亡和功能损害的风险呈正相关。越来越多的证据表明,中性粒细胞计数和中性粒细胞/淋巴细胞比值(neutrophil/lymphocyte ratio, NLR)升高是rtPA治疗后HT、早期神经结局和病死率的可靠预测因素^[45]。这说明rtPA溶栓会导致中性粒细胞动员,但rtPA动员中性粒细胞的机制还不够清晰。tPA作为一种丝氨酸蛋白酶,在凝血/纤溶和ECM调节的稳态中起着关键作用。而作为一种细胞因子,tPA通过与其膜受体结合并触发细胞内信号转导^[46]。tPA结合多种受体,包括膜联蛋白A2、低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP-1)和N-甲基-D-天冬氨酸受体等,从而产生不同的下游生物效应^[46-47]。rtPA和TNF- α 在体外诱导中性粒细胞表达LRP-1。受体相关蛋白(receptor-associated protein, RAP)对LRP-1的抑制阻

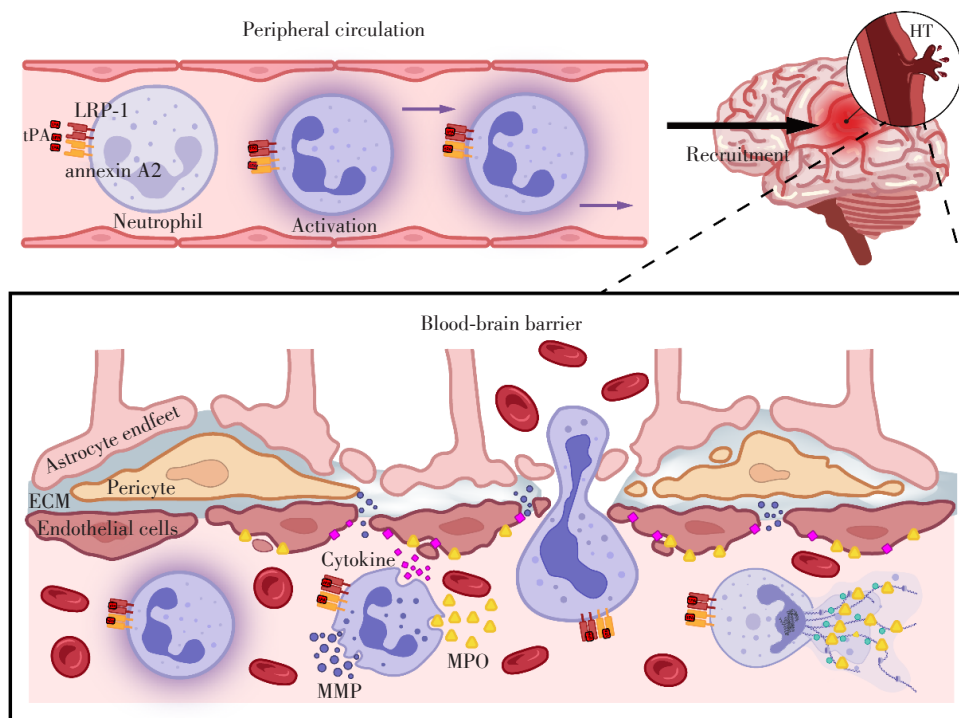
止了rtPA介导的F-肌动蛋白聚合、迁移。在黏附条件下,LRP-1还介导中性粒细胞对rtPA的脱颗粒反应^[48],表明LRP-1可能是tPA动员中性粒细胞的关键受体。新近报道发现,tPA对中性粒细胞的直接作用是由膜联蛋白A2介导的,其是开启中性粒细胞对tPA快速反应的分子开关^[47]。因此,tPA作为细胞因子与中性粒细胞上LRP-1、膜联蛋白A2等受体结合可能是中性粒细胞动员的主要机制(图2)。

虽然中性粒细胞毒性产物的脱颗粒是抵抗细菌感染的有效防御机制,但在急性和慢性疾病中又是一种有害反应。事实上,中性粒细胞蛋白酶的过度和长期释放本身可能会损伤组织并使疾病恶化。不同的中性粒细胞产物,特别是MMP(如MMP-9和MMP-8)、NE和MPO,储存在不同的中性粒细胞颗粒中,易于按需释放^[49-50]。一旦被释放和激活,这些酶就能够消化胶原蛋白和其他基质蛋白,从而促进炎症组织的结构和功能损伤。此外,中性粒细胞脱颗粒还释放细胞因子、趋化因子和黏附分子,可诱导血管收缩、氧化应激、血小板聚集和BBB破坏^[51]。MMP-9可直接损伤BM和脑血管的紧密连接,降解

ECM,导致BBB破坏引起出血^[52],是tPA诱导HT的预测因子和治疗靶分子^[53-54]。中性粒细胞脱颗粒释放NE和MPO是NET形成的关键事件^[28]。NET与卒中后rtPA治疗引起的脑血管完整性丧失、BBB损伤和HT增加有关,通过用脱氧核糖核酸酶I清除NET或通过抑制PAD4而抑制NET产生,可以显著减轻rtPA导致的HT^[55]。MPO是ROS和RNS的重要介导因子^[13],在tPA诱导的HT中有重要作用^[56]。因此,中性粒细胞也可能通过NET和MPO介导的ROS/RNS机制参与tPA导致的HT(图2)。

2.2 中性粒细胞介导血栓切除术引起的HT

EVT一直是治疗颅内大血管闭塞(large vessel occlusion, LVO)引起的AIS的金标准。尽管有疗效,但EVT比保守治疗更有可能引起HT。最近研究表明,EVT后HT是最常见的并发症,临床试验中报告的发生率为14.3%~57.9%,尤其是具有占位性病变效应的颅内血肿,被认为与长期功能预后不良和病死率较高有关^[7]。临床队列研究表明,接受EVT的患者,中性粒细胞计数和NLR较高的患者HT风险增加^[57-59],其机制可能是中性粒细胞释放MMP-9导致



After tPA binds to receptors such as LRP-1 and annexin A2 on neutrophils, neutrophils are activated. The activated neutrophils are recruited from the blood along the gradient of CXCL and DAMP molecules to the site of brain lesions, where they release MMP-9, directly leading to the degradation of ECM. In addition, the release of various pro-inflammatory cytokines and MPO, as well as the formation of NET, collectively result in BBB disruption and hemorrhagic transformation. LRP-1: low-density lipoprotein receptor-related protein 1; CXCL: chemokine ligands; DAMP: damage-associated molecular pattern; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; ECM: extracellular matrix; MPO: myeloperoxidase.

图2 中性粒细胞在tPA导致出血转化中的作用

Figure 2 The role of neutrophils in tPA-induced hemorrhagic transformation

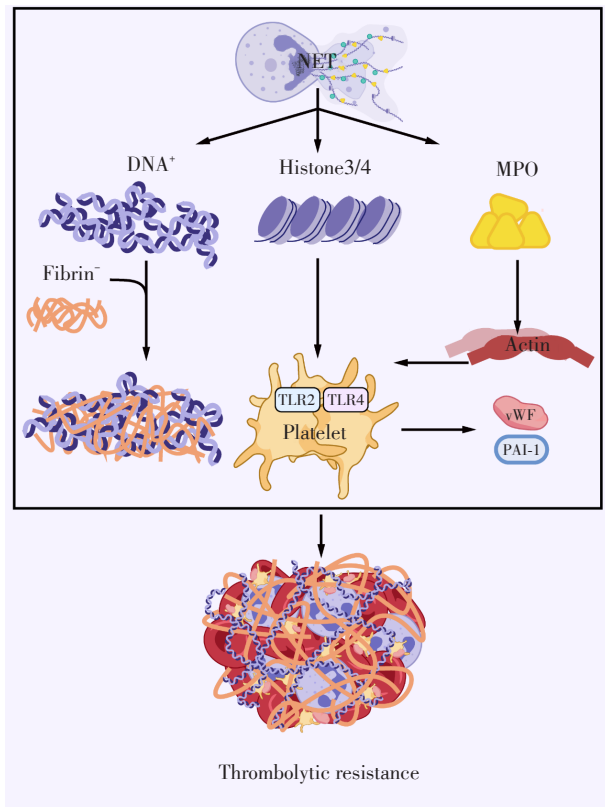
BBB破坏^[7]。最近来自实验动物和临床卒中患者的证据表明,在LVO期间,当侧支血流供血时,在LVO后30 min,血管内已经开始发生先天免疫反应,中性粒细胞聚集^[60],这和溶栓药导致的外周中性粒细胞动员可能有所不同。

2.3 中性粒细胞与溶栓药抵抗

NET被认为是溶栓抵抗的关键机制^[61-62]。早在2015年就有研究显示,NET中的DNA和组蛋白改变血浆凝块中的纤维蛋白结构,从而降低tPA溶栓的效果^[63]。NET在卒中患者的血栓中广泛分布,其巨分子网状结构为红细胞和血小板提供了支架,激活和聚集血小板,促进血栓形成。血栓中NET含量对溶栓抵抗至关重要^[64]。NET的强负电荷DNA骨架能够吸附带正电荷的纤维蛋白,导致血栓内DNA纤维蛋白缠结的组装^[30]。即使tPA溶栓后纤维蛋白被溶解,NET仍然为无纤维蛋白血栓提供支架,以捕获红细胞和血小板^[65]。NET衍生的蛋白酶和组蛋白通过组织因子对内皮细胞产生强烈的细胞毒性作用,而凝血因子如凝血酶原、纤维蛋白原和凝血因子X则沉积在血小板和NET的复合物中,以促进血栓形成^[66]。NET中的组蛋白3和组蛋白4通过作用Toll样受体(toll-like receptor, TLR)2和TLR4诱导血小板聚集来促进血栓形成^[30]。NET中的MPO虽然不直接激活血小板,但能通过重塑肌动蛋白细胞骨架增加血小板的机械强度。tPA介导的纤维蛋白溶解可被vW因子(von Willebrand, vWF)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)抵消。NET激活血小板和内皮细胞,刺激促凝表型并促进vWF和PAI-1的释放。vWF黏附在富含血小板的血栓上,以保护纤维蛋白原免受降解,并招募大量血小板积聚,使血栓坚固,而PAI-1通过不可逆地与tPA结合来抑制血栓溶解^[30, 67-68]。上述多种因素构成了NET介导溶栓药物抵抗的机制(图3)。

2.4 中性粒细胞与再灌注无复流

再灌注无复流现象是指当一个器官因供应它的大动脉闭塞而缺血时,恢复该动脉的通畅性并不能恢复供应该器官实质的微血管灌注,在心脏、大脑、皮肤和肾脏长时间动脉闭塞后可观察到这一现象^[69]。中性粒细胞已被确定为血管疾病无复流现象发生发展的关键因素,包括急性缺血性脑卒中^[70]。卒中再灌注无复流是一种常见现象,其定义为尽管通过溶栓或取栓去除了血栓,较大闭塞动脉成功再通,但微血管再灌注失败并发生组织损伤^[71]。据报



The strongly negatively charged DNA backbone within NET can adsorb positively charged fibrin, leading to the assembly of DNA-fibrin entanglements within the thrombus. Histone 3 and histone 4 within NET induce platelet aggregation by interacting with TLR2 and TLR4. MPO within NET increases platelet mechanical strength by reshaping the actin cytoskeleton. Moreover, NET can activate platelets and endothelial cells, stimulating a procoagulant phenotype and facilitating vWF and PAI-1 release, and thereby inhibiting thrombolysis. Together, NET mediates thrombolytic resistance. TLR: Toll-like receptor; vWF: von Willebrand factor; PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1.

图3 中性粒细胞介导溶栓药抵抗的机制

Figure 3 Mechanisms of neutrophil-mediated thrombolytic resistance

道,高达25%的急性缺血性卒中患者发生再灌注无复流,这大大增加了临床结果不佳的风险。无复流与脑血管微循环的功能和结构改变有关,严重阻碍了大血管再灌注后的神经功能恢复。

累积的证据表明,无复流的病理学机制与血液成分沿内皮黏附、聚集和滚动,中性粒细胞在毛细血管停滞,星形胶质细胞终足和内皮细胞水肿及周细胞收缩有关^[72]。NLR是缺血再灌注治疗的独立危险预测因子^[73]。脱氧核糖核酸酶I(NET形成抑制剂)和rtPA的组合可以在体外降解NET诱导的血栓。动物模型研究显示,这种组合能有效改善冠状动脉缺血再灌注无复流,可能是治疗心肌缺血再灌注损伤和冠状动脉无复流有前景的选择^[74]。

中性粒细胞堵塞脑毛细血管被认为是卒中再灌注不足的主要原因^[72, 75-76]。研究发现, 使用凝血酶卒中模型, 在大脑中动脉中诱导富含纤维蛋白的凝块, 随后通过静脉注射 rtPA 溶解, 发现与 AIS 静脉溶栓的临床情况非常相似, 出现明显的再灌注无复流, 这是由于中性粒细胞黏附在远端毛细血管段, 导致梗死核心和半暗带中 20%~30% 的毛细血管微血管阻塞。令人惊讶的是, 使用 Ly6G 抗体耗竭循环中性粒细胞可以恢复微血管灌注, 而不会增加出血并发症的发生率; 且用 Ly6G 抗体治疗的小鼠梗死面积和功能缺陷较小。因此, 发现的中性粒细胞阻滞脑毛细血管导致再灌注失败的机制, 为 AIS 溶栓治疗提供了有前景的方法^[72]。此外, 在大脑中动脉短暂性闭塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 模型上, 血管管腔狭窄和中性粒细胞在脑微循环中的滞留都是缺血/再灌注后微血管阻塞的关键原因。循环中性粒细胞耗竭在很大程度上缓解了缺血/再灌注后的再灌注缺陷。中性粒细胞对微血管梗阻的主要作用不是通过微栓子堵塞, 而是与内皮细胞相互作用导致毛细血管管腔狭窄加剧^[76]。

3 靶向中性粒细胞策略

中性粒细胞是 AIS 后第 1 个进入大脑的外周免疫细胞, 是卒中相关神经免疫炎症的重要参与者。中性粒细胞在卒中发作时迅速从周围动员, 穿过 BBB 到达缺血的脑实质, 释放大量的蛋白酶、ROS、促炎因子和 NET 从而加重脑损伤, 介导再灌注治疗后的 HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流, 是再灌注治疗无效再通的关键。

恩莫单抗 (Enlimomab) 是一种针对 ICAM-1 的小鼠 IgG2a 单抗, 可抑制白细胞黏附到血管内皮, 从而减少白细胞外渗和炎症性组织损伤。UK-279276 是一种选择性结合 MAC-1 整合素 CD11b (CD11b/CD18) 的重组糖蛋白, 在大鼠脑缺血再灌注模型中能显著减少中性粒细胞浸润和梗死体积。然而, 在早期临床试验中, 这两种中性粒细胞抑制剂均未能改善缺血性卒中的终点结局^[77-78]。ICAM-1 的作用可能是两面的, 一方面促发炎症破坏 BBB, 另一方面又是促血管生成标志物, 参与内皮损伤的愈合修复过程^[79-80]。同样, 如果长期拮抗 MAC-1 可能导致白细胞黏附障碍, 对损伤修复不利^[81]。因此, 不宜完全抑制中性粒细胞的功能。之前间接靶向中性粒细胞的药物已有不少报道, 如他汀类药物 (statins)、贝特类药物 (fibrates)、沙坦类药物 (sartans)、噻唑烷二酮类药物

(thiazolidine-diones)、自由基清除剂、米诺环素等^[4], 但很难确认这些药物的作用是因为靶向中性粒细胞。

抑制 PAD4、NOX 和 ROS 的产生能抑制 NET 的形成, 破坏 DNA 骨架或抑制组蛋白和 MPO 可促进 NET 的降解^[82], 在中性粒细胞驱动的血栓性炎症中起着重要作用。一种负载 PAD4 抑制剂 GSK484 的 ROS 反应性中性粒细胞靶向递送系统, 可防止脑损伤部位 NET 的形成, 从而显著抑制神经炎症并改善神经功能缺损^[82-83]。CI 脘是被封装在自组装纳米脂质载体 (C-Lipo/CA) 中的 PAD4 抑制剂, 可以抑制缺血性脑组织中的 NET 释放, 并进一步抑制干扰素基因环鸟苷酸腺苷单磷酸合酶刺激物 (cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS STING) 通路, 显著减轻脑缺血再灌注损伤^[71]。中性粒细胞上表达的整合素 $\alpha 9 \beta 1$, 通过细胞纤连蛋白与内皮细胞黏附, 参与 PAD4 介导的 NET 释放过程, 恶化卒中结局^[84]。MPO 主要在中性粒细胞和小胶质细胞中表达。PAD4 诱导的 MPO 释放是 NET 形成的关键事件^[9, 27]。大量动物实验和临床数据表明, 抑制 MPO 对卒中预后积极影响, 可以作为卒中治疗和预测的靶点^[85]。无细胞 DNA (cell free DNA, cfDNA) 是 NET 的主要成分之一, 循环 cfDNA 增加可导致黑色素瘤缺乏因子 2 炎性体激活, 通过 DNase1 中和 cfDNA 引起的炎性小体, 可以降低实验性脑缺血后卒中复发率, 这能够解释为向动脉粥样硬化患者发生缺血性事件后的复发率高^[86]。

此外, 新近研究发现, M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase muscle 2, PKM2) 是全身炎症的调节剂, 缺血性卒中后中性粒细胞中的 PKM2 上调。PKM2 通过促进 STAT3 磷酸化调节外周中性粒细胞介导的缺血后炎症。抑制 PKM2 核转位, 能显著降低中性粒细胞过度活化, 改善 AIS 的短期和长期预后^[87]。中性粒细胞 $\beta 1$ 肾上腺素受体 ($\beta 1$ adrenergic receptor, $\beta 1AR$) 与炎症加剧期中性粒细胞的迁移有关。 $\beta 1AR$ 阻断剂美托洛尔抑制中性粒细胞迁移, 在缺血卒中大鼠模型上能减轻缺血损伤, 其保护作用呈中性粒细胞依赖性。在 AIS 患者中, 美托洛尔可减少循环中性粒细胞-血小板共聚集物^[88]。下游调控元件拮抗剂调节剂 (downstream regulatory element antagonist modulator, DREAM) 是一种转录阻遏物, DREAM 促进中性粒细胞募集到 TNF- α 诱导的炎症部位, 靶向 DREAM 是一种减少炎症性疾病中中性粒细胞过度募集的新策略^[58]。

4 小结与展望

中性粒细胞来源于骨髓中的髓样干细胞,参与机体的免疫防御。中性粒细胞在卒中发作时迅速从外周动员,是第1个被募集的循环免疫细胞。骨髓中的中性粒细胞表达趋化因子受体CXCR2和CXCR4,CXCL和DAMP分子可以识别这些受体,因此中性粒细胞沿着CXCL和DAMP分子的浓度梯度向病变处迁移,到达损伤部位。中性粒细胞通过其表面MAC-1与活化的内皮细胞相互作用,在内皮表面减速和滚动,然后通过黏附分子ICAM-1等相互作用附着在内皮上,并由此处渗出,浸润脑实质。

中性粒细胞能大量产生ROS和RNS,是其独特性,主要机制涉及NOX复合物激活和MPO从颗粒中释放。NOX和ROS的激活导致PAD4的分泌,而后PAD4作用于嗜天青颗粒并诱导NE和MPO等释放。MPO和NE入核促进染色质去致密和核膜破坏。去致密的染色质与颗粒蛋白结合,并在细胞外释放形成网状DNA结构,形成NET。NET形成以及随之而来的DNA、相关酶和核蛋白的释放触发了不可逆地损害宿主组织的炎症反应。中性粒细胞在其颗粒中储存了一系列蛋白酶,包括MMP,这些蛋白酶会降解ECM蛋白。中性粒细胞积聚,ROS和RNS大量产生,促炎介质和蛋白酶释放,加剧微血管紧密连接解体,内皮功能障碍和细胞外基质降解,导致不可逆的BBB破坏。来自颅骨骨髓的脑膜中性粒细胞表现出与外周骨髓来源中性粒细胞不同的转录谱,并在卒中时直接渗透到CNS^[89],其在再灌注治疗后发生的HT、溶栓药抵抗、再灌注无复流中可能有独特意义,尤其值得重视。

HT是溶栓或EVT后最常见的并发症,尤其在具有占位效应的颅内血肿中,被认为与长期功能预后不良和病死率较高有关。中性粒细胞计数和NLR升高是再灌注治疗后HT的可靠预测因素,说明中性粒细胞在HT中的重要作用。tPA作为一种细胞因子,与表达在中性粒细胞上的膜联蛋白A2和LRP-1等受体结合,可能是tPA动员中性粒细胞的主要机制。被动员激活的中性粒细胞释放其颗粒内含物MMP、NE和MPO等。此外,中性粒细胞脱颗粒还释放细胞因子、趋化因子和黏附分子。这些释放产物都参与了tPA导致的HT。在LVO期间,当血管由侧支血流供血时,LVO后迅速发生血管内先天免疫反应,中性粒细胞大量聚集。因此,EVT导致的HT与溶栓导致的HT发生机制可能有所不同。

前者主要在外周动员中性粒细胞,而后者主要由缺血局部的中性粒细胞介导。

NET被认为是溶栓抵抗的关键机制。NET的巨分子网状结构为红细胞和血小板提供了支架,激活和聚集血小板,促进血栓形成。NET的强负电荷DNA骨架能够吸附带正电荷的纤维蛋白,导致血栓内DNA纤维蛋白缠结的形成。NET激活血小板和内皮细胞,刺激促凝表型并促进vWF的释放。vWF黏附在富含血小板的血栓上,以保护纤维蛋白原免受降解,并招募大量血小板积聚,使血栓坚固。NET形成时中性粒细胞释放的MPO虽然不会直接激活血小板,但可通过重塑肌动蛋白细胞骨架来增加血小板的机械强度。上述因素共同导致溶栓抵抗。

据报道,高达25%的AIS患者发生再灌注无复流,这大大增加了临床结果不佳的风险。与再灌注治疗后的HT相似,NLR也是缺血再灌注无复流的独立危险预测因子。再灌注无复流既可以发生在EVT后也可以发生在溶栓治疗后,中性粒细胞堵塞脑毛细血管被认为是卒中再灌注无复流的主要原因。中性粒细胞阻碍微血管的机制可能不是微栓子堵塞,而是中性粒细胞与内皮细胞的相互作用导致微血管管腔狭窄。

鉴于中性粒细胞对再灌注治疗的负面影响,靶向中性粒细胞治疗AIS很早就得到重视。早期针对中性粒细胞对内皮细胞黏附的治疗,如恩莫单抗和MAC-1拮抗剂UK-279276等,在临床试验中未能获得阳性结果,可能因为中性粒细胞黏附的作用是多面的,除介导缺血损伤外,可能还参与损伤修复过程。间接靶向中性粒细胞的药物,如他汀类、贝特类、沙坦类、噻唑烷二酮类、自由基清除剂和米诺环素等,但这些药物未被证明直接靶向作用于中性粒细胞。通过抑制PAD4、NOX和ROS来抑制NET形成,以及通过破坏DNA骨架、抑制组蛋白和MPO等促进NET降解,近来已成为研究热点。此外,PKM2、 β 1AR、DREAM和黑色素瘤缺乏因子2等中性粒细胞靶点也受到重视。

MMP-9虽然在中性粒细胞介导的BBB破坏和HT有重要作用,但MMP-9抑制剂用于卒中治疗可能并不可取。在卒中的亚急性期,随着神经炎症消退和组织降解减少,神经可塑性和血管生成过程加剧。MMP-9是神经可塑性的一个重要因素,因此MMP-9对卒中亚急性期的结构和功能恢复很重要^[90-91]。MPO是参与NET形成、ROS和RNS产生、免疫炎症反应的重要酶。虽然在小胶质细胞、巨噬

细胞等细胞中也有MPO,但其主要存在于中性粒细胞,占中性粒细胞干重的5%^[92]。MPO抑制剂AZD4831已用于慢性心衰的临床试验治疗^[93],其在卒中治疗中能否改善再灌注治疗后的HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流值得探讨。

近来研究表明,中性粒细胞可分为N1和N2表型,并在缺血性卒中的发展和预后中发挥不同的作用。N1中性粒细胞在卒中急性期占主导地位,通过NET及释放致炎因子介导缺血/再灌注损伤。N2中性粒细胞的比例在卒中后期逐渐增加,通过释放抗炎因子和其他神经保护介质发挥有益作用。然而,N1和N2表型具有高度可塑性,在某些条件下可以相互转化^[10]。中性粒细胞亚群在功能上的显著差异和高度可塑性可能成为有前景的研究方向。N1和N2的表型差异提醒中性粒细胞的作用是双刃剑,精准靶向N1型可能会取得更佳效果。总之,靶向中性粒细胞,尤其是选择性靶向N1型中性粒细胞,为解决卒中再灌注治疗引起的HT、溶栓药抵抗和再灌注无复流带来了希望。

利益冲突声明:

作者单位与期刊出版部都隶属南京医科大学,但无利益冲突。

Conflict of Interests:

The author's affiliation and the publishing department of this journal are affiliated with Nanjing Medical University, but there is no conflict of interest in this work.

作者贡献声明:

陈微和吴海银进行了文献检索,陈微制作图片,朱东亚和陈微撰写和修改论文,吴海银参与论文撰写。

Author's Contributions:

CHEN Wei and WU Haiyin conducted the literature searching. CHEN Wei created figures. ZHU Dongya and CHEN Wei wrote and revised the manuscript. WU Haiyin participated in the writing of the manuscript.

[参考文献]

- [1] MARTIN S S, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. 2024 heart disease and stroke statistics: a report of US and global data from the American heart association[J]. *Circulation*, 2024, 149(8): 347-913
- [2] XIONG Y Y, WAKHLOO A K, FISHER M. Advances in acute ischemic stroke therapy [J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1230-1251
- [3] TSVIGOULIS G, KATSANOS A H, SANDSET E C, et al. Thrombolysis for acute ischaemic stroke: current status and future perspectives[J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(5): 418-429
- [4] OUK T, POTEY C, MAESTRINI I, et al. Neutrophils in tPA-induced hemorrhagic transformations: Main culprit, accomplice or innocent bystander? [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 194: 73-83
- [5] SINGH A, SINGH M P, GAIKWAD N R, et al. Tenecteplase versus alteplase in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Neurosci*, 2024, 31(2): 132-142
- [6] HILKENS N A, CASOLLA B, LEUNG T W, et al. Stroke [J]. *Lancet*, 2024, 403(10446): 2820-2836
- [7] DUAN Q, LI W L, ZHANG Y, et al. Nomogram established on account of Lasso-logistic regression for predicting hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke after endovascular thrombectomy [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2024, 243: 108389
- [8] JIA M L, JIN F Y, LI S J, et al. No-reflow after stroke reperfusion therapy: an emerging phenomenon to be explored [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2): e14631
- [9] AROGA-CREVILLÉN A, VICANOLO T, OVADIA S, et al. Neutrophils in physiology and pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19: 227-259
- [10] HERISSON F, FRODERMANN V, COURTIÉS G, et al. Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(9): 1209-1217
- [11] LI S J, CAO S S, HUANG P S, et al. Post-operative neutrophil-to-lymphocyte ratio and outcome after thrombectomy in acute ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 990209
- [12] XU X M, CHEN M Y, ZHU D Y. Reperfusion and cytoprotective agents are a mutually beneficial pair in ischaemic stroke therapy: an overview of pathophysiology, pharmacological targets and candidate drugs focusing on excitotoxicity and free radical [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2024, 9(4): 351-359
- [13] MANOHARAN R R, PRASAD A, POSPÍŠIL P, et al. ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1359600
- [14] SIES H, MAILLOUX R J, JAKOB U. Fundamentals of redox regulation in biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(9): 701-719
- [15] CHIDAMBARAM S B, ANAND N, VARMA S R, et al. Superoxide dismutase and neurological disorders [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2024, 16: 373-394
- [16] PÉREZ-FIGUEROA E, ÁLVAREZ-CARRASCO P, ORTEGA E, et al. Neutrophils: many ways to die [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631821
- [17] PANDAY A, SAHOO M K, OSORIO D, et al. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-

- associated pathologies [J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(1): 5–23
- [18] WINTERBOURN C C, KETTLE A J, HAMPTON M B. Reactive oxygen species and neutrophil function[J]. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 765–792
- [19] SADAF S, SINGH A K, AWASTHI D, et al. Augmentation of iNOS expression in myeloid progenitor cells expedites neutrophil differentiation [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(2): 397–412
- [20] CHEN S, CHEN H S, DU Q H, et al. Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: potential application of natural compounds[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 433
- [21] MOHAMUD Y A, HAGEMANN N, LUDEWIG P, et al. Roles of polymorphonuclear neutrophils in ischemic brain injury and post-ischemic brain remodeling[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 825572
- [22] GARCIA-BONILLA L, SHAHANOOR Z, SCIORTINO R, et al. Analysis of brain and blood single-cell transcriptomics in acute and subacute phases after experimental stroke[J]. *Nat Immunol*, 2024, 25(2): 357–370
- [23] CASSATELLA M A, ÖSTBERG N K, TAMASSIA N, et al. Biological roles of neutrophil-derived granule proteins and cytokines[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(7): 648–664
- [24] EASH K J, GREENBAUM A M, GOPALAN P K, et al. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2423–2431
- [25] HERWALD H, EGESTEN A. On PAMPs and DAMPs[J]. *J Innate Immun*, 2016, 8(5): 427–428
- [26] BALOG B M, SONTI A, ZIGMOND R E. Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems[J]. *Prog Neurobiol*, 2023, 228: 102488
- [27] PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(2): 134–147
- [28] LI S, YING S N, WANG Y Q, et al. Neutrophil extracellular traps and neutrophilic dermatosis: an update review[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 18
- [29] JIMÉNEZ-ALCÁZAR M, KIM N, FUCHS T A. Circulating extracellular DNA: Cause or consequence of thrombosis?[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2017, 43(6): 553–561
- [30] ZHAO Z Y, PAN Z R, ZHANG S, et al. Neutrophil extracellular traps: a novel target for the treatment of stroke[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 241: 108328
- [31] DENORME F, PORTIER I, RUSTAD J L, et al. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e154225
- [32] LIAPTSI E, MERKOURIS E, POLATIDOU E, et al. Targeting neutrophil extracellular traps for stroke prognosis: a promising path[J]. *Neurol Int*, 2023, 15(4): 1212–1226
- [33] FANG H J, BO Y F, HAO Z F, et al. A promising frontier: targeting NETs for stroke treatment breakthroughs [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 238
- [34] KANG L J, YU H L, YANG X, et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2488
- [35] NABA A. Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(11): 865–885
- [36] HERNANDEZ S J, LIM R G, ONUR T, et al. An altered extracellular matrix-integrin interface contributes to Huntington's disease-associated CNS dysfunction in glial and vascular cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2023, 32(9): 1483–1496
- [37] TABET A, APRA C, STRANAHAN A M, et al. Changes in brain neuroimmunology following injury and disease[J]. *Front Integr Neurosci*, 2022, 16: 894500
- [38] PIPERIGKOU Z, KYRIAKOPOULOU K, KOUTSAKIS C, et al. Key matrix remodeling enzymes: functions and targeting in cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1441
- [39] MISHRA R R, NIELSEN B E, TRUDRUNG M A, et al. The effect of tissue inhibitor of metalloproteinases on scar formation after spinal cord injury [J]. *Cells*, 2024, 13(18): 1547
- [40] GUO Y Z, DONG L D, GONG A, et al. Damage to the blood-brain barrier and activation of neuroinflammation by focal cerebral ischemia under hyperglycemic condition[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(1): 142
- [41] BEDDOWS C A, SHI F Y, HORTON A L, et al. Pathogenic hypothalamic extracellular matrix promotes metabolic disease[J]. *Nature*, 2024, 633(8031): 914–922
- [42] SUMMERS L, KANGWANTAS K, RODRIGUEZ-GRANDE B, et al. Activation of brain endothelial cells by interleukin-1 is regulated by the extracellular matrix after acute brain injury [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 57: 93–103
- [43] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics - 2020 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139–e596
- [44] LIU Q, SHI K B, WANG Y J, et al. Neurovascular inflammation and complications of thrombolysis therapy in stroke[J]. *Stroke*, 2023, 54(10): 2688–2697
- [45] XIE J L, PANG C Y, YU H, et al. Leukocyte indicators and variations predict worse outcomes after intravenous thrombolysis in patients with acute ischemic stroke[J]. *J*

- Cereb Blood Flow Metab, 2023, 43(3): 393-403
- [46] LIN L, HU K B. Tissue plasminogen activator and inflammation: from phenotype to signaling mechanisms[J]. Am J Clin Exp Immunol, 2014, 3(1): 30-36
- [47] SHI K B, ZOU M, JIA D M, et al. tPA mobilizes immune cells that exacerbate hemorrhagic transformation in stroke[J]. Circ Res, 2021, 128(1): 62-75
- [48] LIBERALE L, BERTELOTTO M, MINETTI S, et al. Recombinant tissue plasminogen activator(r-tPA) induces *in vitro* human neutrophil migration via low density lipoprotein receptor-related protein 1(LRP-1)[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7014
- [49] CUADRADO E, ORTEGA L, HERNÁNDEZ - GUILLAMON M, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release[J]. J Leukoc Biol, 2008, 84(1): 207-214
- [50] CARBONE F, VUILLEUMIER N, BERTELOTTO M, et al. Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation *in vitro* via defined pathways[J]. Vascul Pharmacol, 2015, 64: 16-27
- [51] SHI J, PENG H, YOU S, et al. Increase in neutrophils after recombinant tissue plasminogen activator thrombolysis predicts poor functional outcome of ischaemic stroke: a longitudinal study[J]. Eur J Neurol, 2018, 25(4): 687-692
- [52] TURNER R J, SHARP F R. Implications of MMP9 for blood brain barrier disruption and hemorrhagic transformation following ischemic stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2016, 10: 56
- [53] YAO Y, LIU F, GU Z W, et al. Emerging diagnostic markers and therapeutic targets in post-stroke hemorrhagic transformation and brain edema[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1286351
- [54] HUANG J A, WU Y H, CHEN P L, et al. MMP-9 upregulation may predict hemorrhagic transformation after endovascular thrombectomy [J]. Front Neurol, 2024, 15: 1400270
- [55] WANG R R, ZHU Y B, LIU Z W, et al. Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke[J]. Blood, 2021, 138(1): 91-103
- [56] CHEN H S, CHEN X, LUO Y H, et al. Potential molecular targets of peroxynitrite in mediating blood-brain barrier damage and haemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke with delayed tissue plasminogen activator treatment[J]. Free Radic Res, 2018, 52(11/12): 1220-1239
- [57] SEMERANO A, LAREDO C, ZHAO Y S, et al. Leukocytes, collateral circulation, and reperfusion in ischemic stroke patients treated with mechanical thrombectomy[J]. Stroke, 2019, 50(12): 3456-3464
- [58] LI J, KUMARI T, BARAZIA A, et al. Neutrophil DREAM promotes neutrophil recruitment in vascular inflammation[J]. J Exp Med, 2022, 219(1): e20211083
- [59] CIACCIARELLI A, TESSITORE A, FIUME G, et al. Factors associated with hemorrhagic transformation after endovascular treatment despite early recanalization[J]. J Neurol Sci, 2023, 453: 120778
- [60] STOLL G, SCHUHMAN M K, NIESWANDT B, et al. An intravascular perspective on hyper-acute neutrophil, T-cell and platelet responses: similarities between human and experimental stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2022, 42(9): 1561-1567
- [61] LIN L, BA Z J, TIAN H, et al. Ultrasound-responsive therapeutic platform for the timely monitoring and efficient thrombolysis in thrombi of tPA resistance[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 6610
- [62] MENGOZZI L, BARISON I, MALÝ M, et al. Neutrophil extracellular traps and thrombolysis resistance: new insights for targeting therapies [J]. Stroke, 2024, 55(4): 963-971
- [63] VARJÚ I, LONGSTAFF C, SZABÓ L, et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment [J]. Thromb Haemost, 2015, 113(6): 1289-1298
- [64] DUCROUX C, DI MEGLIO L, LOYAU S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2018, 49(3): 754-757
- [65] LARIDAN E, DENORME F, DESENDER L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi [J]. Ann Neurol, 2017, 82(2): 223-232
- [66] ZHOU P, LI T, JIN J Q, et al. Interactions between neutrophil extracellular traps and activated platelets enhance procoagulant activity in acute stroke patients with ICA occlusion[J]. EBioMedicine, 2020, 53: 102671
- [67] ZHANG S Q, CAO Y Z, DU J W, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to tissue plasminogen activator resistance in acute ischemic stroke [J]. FASEB J, 2021, 35(9): e21835
- [68] DESILLES J P, DI MEGLIO L, DELVOYE F, et al. Composition and organization of acute ischemic stroke thrombus: a wealth of information for future thrombolytic strategies[J]. Front Neurol, 2022, 13: 870331
- [69] KLONER R A, KING K S, HARRINGTON M G. No-reflow phenomenon in the heart and brain[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(3): 550-562
- [70] GULLOTTA G S, DE FEO D, FRIEBEL E, et al. Age-induced alterations of granulopoiesis generate atypical neutrophils that aggravate stroke pathology[J]. Nat Immunol,

- 2023, 24(6):925-940
- [71] EL AMKI M, GLÜCK C, BINDER N, et al. Neutrophils obstructing brain capillaries are a major cause of no-reflow in ischemic stroke [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(2): 108260
- [72] SUN F Y, ZHOU J, CHEN X Y, et al. No-reflow after recanalization in ischemic stroke: from pathomechanisms to therapeutic strategies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(6):857-880
- [73] NAMAZI M, MAHMOUDI E, SAFI M, et al. The No-reflow phenomenon: Is it predictable by demographic factors and routine laboratory data? [J]. *Acta Biomed*, 2021, 92(5):e2021297
- [74] GE L, ZHOU X, JI W J, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(5):H500-H509
- [75] ERDENER Ş E, TANG J B, KILIÇ K, et al. Dynamic capillary stalls in reperfused ischemic penumbra contribute to injury: a hyperacute role for neutrophils in persistent traffic jams [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(2): 236-252
- [76] LI Y S, XU J Y, YU T T, et al. A labeling strategy for the three-dimensional recognition and analysis of microvascular obstruction in ischemic stroke [J]. *Theranostics*, 2023, 13(1):403-416
- [77] INVESTIGATORS E A S T. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the enlimomab acute stroke trial [J]. *Neurology*, 2001, 57(8):1428-1434
- [78] KRAMS M, LEES K R, HACKE W, et al. Acute stroke therapy by inhibition of neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279, 276 in acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2003, 34(11):2543-2548
- [79] CHAI G R, LIU S, YANG H W, et al. Quercetin protects against diabetic retinopathy in rats by inducing heme oxygenase-1 expression [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(7): 1344-1350
- [80] NÉMETH Z, DEMETER F, DOBÓ J, et al. Complement MASP-1 modifies endothelial wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7):4048
- [81] SEKHERI M, OTHMAN A, FILEP J G. $\beta 2$ integrin regulation of neutrophil functional plasticity and fate in the resolution of inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 660760
- [82] ANSARI J, VITAL S A, YADAV S, et al. Regulating neutrophil PAD4/NOX-dependent cerebrovascular thromboinflammation [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(3): 852-864
- [83] MU Q C, YAO K, SYEDA M Z, et al. Neutrophil targeting platform reduces neutrophil extracellular traps for improved traumatic brain injury and stroke theranostics [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(21):e2308719
- [84] BARBHUYAN T, PATEL R B, BUDNIK I, et al. Genetic ablation of myeloid integrin $\alpha 9$ attenuates early atherosclerosis [J]. *J Leukoc Biol*, 2024, 116(5):1208-1214
- [85] WANG Y C, LU Y B, HUANG X L, et al. Myeloperoxidase: A new target for the treatment of stroke? [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8):1711-1716
- [86] CAO J Y, ROTH S, ZHANG S J, et al. DNA-sensing inflammasomes cause recurrent atherosclerotic stroke [J]. *Nature*, 2024, 633(8029):433-441
- [87] DHANESHA N, PATEL R B, DODDAPATTAR P, et al. PKM2 promotes neutrophil activation and cerebral thromboinflammation: therapeutic implications for ischemic stroke [J]. *Blood*, 2022, 139(8):1234-1245
- [88] CLEMENTE-MORAGÓN A, OLIVER E, CALLE D, et al. Neutrophil β_1 adrenoceptor blockade blunts stroke-associated neuroinflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(4):459-478
- [89] XIE M Z, HAO Y L, FENG L S, et al. Neutrophil heterogeneity and its roles in the inflammatory network after ischemic stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(3): 621-650
- [90] ABDELNASEER M M, ELFAUOMY N M, ESMAIL E H, et al. Matrix metalloproteinase-9 and recovery of acute ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(4):733-740
- [91] WŁODARCZYK L, CICHON N, KARBOWNIK M S, et al. Exploring the role of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio in subacute stroke recovery: a prospective observational study [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11):5745
- [92] SIRAKI A G. The many roles of myeloperoxidase: from inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery [J]. *Redox Biol*, 2021, 46:102109
- [93] NELANDER K, LAGERSTROM-FERMER M, AMILON C, et al. Early clinical experience with AZD4831, a novel myeloperoxidase inhibitor, developed for patients with heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, 14(3):812-819

[收稿日期] 2024-11-13

(本文编辑:陈汐敏)