

靶向平足蛋白调控小胶质细胞极化减轻 脑出血后神经炎症机制研究

刘诗谣, 赵益明

(苏州大学附属第一医院 国家卫生计生委止血与血栓实验室, 江苏省血液研究所, 江苏 苏州 215006)

摘要:通过生物信息学方法探讨了平足蛋白(podoplanin, PDPN)在实验性脑出血中的表达及其功能机制,以期
为脑出血的治疗提供新的靶点和理论依据.首先,基于 GSE216607 数据集筛选出与脑出血相关的差异表达基因,并
结合机器学习算法确定了 3 个核心基因:PDPN、Cdk2 和 Cxcl16.对这些基因进行了功能富集分析,评估其潜在的
生物学通路.重点研究 PDPN,构建脑出血动物模型,采用免疫印迹、qPCR、免疫组化及免疫荧光等方法验证 PDPN
在脑出血后小胶质细胞中的高表达,并探讨其信号通路.结果显示,PDPN 在脑出血后小胶质细胞中表达显著上调,
且使用 PDPN 抑制性单克隆抗体 SZ168 治疗后显著改善了小鼠的短期神经功能损伤和肿胀情况,通过 NF- κ B 通路
的调控抑制小胶质细胞向促炎表型转化,并促进其向抑炎表型转化,减少炎症因子的释放.综上,PDPN 通过调节小
胶质细胞极化功能,参与了脑出血后的神经炎症反应,其作为潜在靶点为脑出血治疗提供了新的思路.

关键词:脑出血;炎症反应;平足蛋白;小胶质细胞;生物信息学

中图分类号:Q189;R543.5

文献标志码:A

文章编号:1000-2367(2026)05-0134-08

脑卒中是全球第二大死亡原因,临床表现为突发性神经功能缺损.在高收入国家,脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)占脑卒中的 10%~15%,致死率和致残率高^[1-2].随着人口老龄化,脑出血的发生率不断上升,早期诊断与有效治疗的需求日益迫切,研究其机制和新治疗靶点对于改善患者预后至关重要.脑出血后的病情发展主要受原发性脑损伤和继发性脑损伤的影响.继发性脑损伤(secondary brain injury, SBI)是由红细胞碎片及其降解产物引发的一系列病理过程,包括炎症反应、线粒体功能障碍、氧化应激和神经内分泌失调^[1].神经炎症是脑出血后继发性脑损伤的重要因素,其机制涉及小胶质细胞的激活和中性粒细胞的浸润,进而释放促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、髓过氧化物酶(MPO)等^[2].然而,在过去 20 年中,ICH 的高死亡率和发病率并未显著降低,因此寻找有效的靶点以减轻水肿和神经功能损伤成为脑出血研究的重要方向.

近年来,针对脑出血后神经功能损伤的治疗策略取得了一定进展.基于继发性损伤机制的研究,多项临床试验聚焦于炎症调控和神经保护方向.在炎症治疗方面,多项动物研究证实,小鼠 ICH 后至少 6 h 可观察到 Caspase-1 水平的增加,通过抑制 Caspase-1, IL-1 β 表达和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性降低,从而减轻血脑屏障(BBB)损伤,改善神经功能,减轻脑水肿^[3].在神经保护方面,使用鸢尾素处理能够通过干预 α V β 5/

收稿日期:2025-02-17; **修回日期:**2025-04-12.

基金项目:国家自然科学基金(81873431).

作者简介:刘诗谣(2000—),女,贵州兴义人,苏州大学附属第一医院硕士研究生,研究方向为平足蛋白与脑出血神经炎症相关研究, E-mail: liushiyao0122@163.com.

通信作者:赵益明(1965—)男,江苏苏州人,苏州大学附属第一医院研究员,研究方向内科血液学的血栓与止血方向, E-mail: zhaoyimingbox@163.com.

引用本文:刘诗谣,赵益明.靶向平足蛋白调控小胶质细胞极化减轻脑出血后神经炎症机制研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2026,54(5):134-141.(Liu Shiyao, Zhao Yiming. Target significance and inflammatory response mechanisms of podoplanin in the treatment of cerebral haemorrhage[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2026, 54(5): 134-141. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2025.02.17.0003.)

AMPK 信号通路^[4],使 ICH 后血肿周围区域中性粒细胞浸润减少、神经元凋亡受到抑制,从而改善 ICH 预后.值得注意的是,尽管上述干预措施部分缓解了继发性损伤,但针对神经炎症核心调控节点的精准治疗仍存在靶点选择性不足、血脑屏障穿透率低等瓶颈.这提示开发基于新型分子标记的特异性调控方案具有重要临床价值.

平足蛋白 (podoplanin, PDPN) 是一种小分子跨膜黏蛋白样糖蛋白,是血小板 C 型凝集素样受体-2(CLEC-2)的内源性配体,其作为淋巴管内皮细胞特异性标志物的功能已被广泛报道^[5].PDPN 通过激活血小板 CLEC-2 受体,在淋巴管发育、血小板聚集及肿瘤淋巴转移中发挥关键作用^[6].近年研究表明,其在胶质瘤细胞、活化的小胶质细胞及血脑屏障相关细胞中表达上调,提示 PDPN 可能参与神经炎症与损伤修复的病理过程^[3,7].另有研究表明,PDPN 与 CLEC-2 的相互作用可诱导血小板聚集和血栓形成,并在炎症性疾病中发挥重要作用^[7-8].抗 PDPN 胞外区的单克隆抗体 SZ168 是通过 PDPN 的 PLAG 区域第 31-51 位氨基酸免疫 BALB/c 小鼠制备,经 Western blot、流式细胞术和 ELISA 验证,其对 PDPN 具有高亲和力和特异性^[9].在肺损伤模型中,SZ168 通过保护肺血管通透性、降低促炎细胞因子水平、减少炎性细胞浸润,有效缓解肺损伤^[8].在肿瘤模型中,SZ168 通过抑制 PDPN-CLEC-2 通路,抑制肿瘤生长和转移,并减少血小板活化和聚集^[10],从而减少小鼠肿瘤深静脉血栓发生率.在缺血性脑卒中小鼠模型中,PDPN 处理可显著降低小胶质细胞中 Caspase-1 和 Gasdermin-D(GSDMD)的水平,抑制 IL-18 和 IL-1 β 的分泌,减轻血脑屏障破坏和炎症^[7].近年来研究表明,NF- κ B 通路在脑出血后继发性神经炎症中占据核心调控地位,其激活可驱动小胶质细胞向促炎表型极化并释放 TNF- α 、IL-1 β 等炎症介质^[11].尽管生物信息学分析已广泛应用于疾病机制研究,但针对脑出血后神经炎症影响机制的探索仍较少,并且 PDPN-CLEC-2 轴在肿瘤及肺损伤中被证实与炎症信号通路交互^[3,8],但其是否通过 NF- κ B 通路调控脑出血后小胶质细胞极化尚未明确.

因此,本研究基于生物信息学分析,筛选出影响脑出血炎症反应的关键基因 *PDPN*、*Cdk2* 和 *Cxcl16*,并聚焦于 *PDPN*.通过构建脑出血动物模型,结合免疫印迹、实时荧光定量 PCR(qPCR)、免疫组化及免疫荧光等多种技术手段,深入分析了 PDPN 作为脑出血继发性脑损伤潜在治疗靶点的可行性,为改善脑出血预后提供了新的理论依据和研究方向.

1 材料和方法

1.1 基因数据来源与差异表达基因分析以及蛋白互作网络的构建

GSE216607 RNA-seq 转录组数据来源于美国国立生物技术信息中心(NCBI)的基因表达汇编(GEO)数据库.该数据集包含 6 个样本,分为 3 个脑出血(ICH)模型组和 3 个正常对照组(Control),均使用 GPL24247 平台生成,数据来源于 C57BL/6 小鼠.

使用 GEO query 工具(BioJupies)从 GEO 数据库中识别 ICH 组和 control 组样本之间的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs).分析中设定的截断值为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 且 $p < 0.05$.火山图通过 R 软件(version 4.2.1)绘制,Venn 图通过 BioLadder 生物信息在线分析可视化云平台(BioLadder)创建.

利用 STRING 工具(STRING functional protein association networks)构建了差异表达基因的蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI).通过 GGRAPH 对 PPI 网络进行可视化分析,以置信度评分 > 0.7 为判断标准.在 PPI 网络中,基因以节点表示,基因之间的相互作用以边表示.

1.2 功能富集分析与关键基因筛选

利用 DAVID 工具(DAVID functional annotation bioinformatics microarray analysis)对每个 GEO 数据集的注释、可视化和集成发现进行分析,以获得差异表达基因的基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因和基因组数据库(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路分析结果.在本次研究中,按 p 值($p < 0.05$)升序排列,筛选出排名前 5 的分析结果.

采用 R 包 glmnet 进行 LASSO 回归分析,以筛选与脑出血相关性较大的候选基因.LASSO 回归是一种常用于特征选择的统计方法,也可作为二分类器用于疾病预测(如脑出血)^[12].此外,本研究还利用随机森林

算法进行分类分析,进一步筛选与脑出血相关性较大的候选基因.最终,通过取 2 种方法筛选结果的交集,获得相关性较强的基因.

1.3 实验动物与脑出血模型构建

从苏州大学动物中心购买并饲养 64 只 C57BL/6 小鼠(雄性,体质量约 22~25 g).所有小鼠均置于室温(22±1)℃,光暗周期为 12 h:12 h,湿度(60±5)%,自由饮食.所有涉及动物的程序均符合国家卫生研究院《实验动物护理和使用指南》,并经苏州大学动物护理和使用指南委员会批准.

通过立体定向引导,将胶原酶注射到小鼠右侧基底节区诱导 ICH^[2].手术过程如下:使用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,并用加温毯维持体温在(37.0±0.5)℃.小鼠俯卧于立体定位头架上,通过冠状切口暴露颅骨,直至前囟清晰可见.在颅骨上钻 1 mm 孔,在立体定向引导下(坐标:前囟前 0.5 mm,外侧 2.0 mm)将注射器插入右侧基底节区.随后,以 0.25 μL/min 的速度通过微量输液泵注入 0.5 μL 胶原酶(硬膜下 3.5 mm 处注射).注射完成后,针头停留 10 min 以防止渗漏,随后以 1 mm/min 的速度缓慢撤出.用灭菌医用骨蜡封闭颅骨孔,缝合头皮切口.小鼠在 37℃ 加热垫上恢复,同时密切观察神经功能缺损情况.假手术组按相同程序操作,但不注射胶原酶.

1.4 给药管理与神经行为功能测试

于 ICH 模型构建好 6 h 后将抗人 PDPN 胞外区的 mAb(SZ168)以 100 μg/只腹腔注射给药.在 ICH 后第 1、3、7 天,采用改良的 Garcia 测试评估神经行为功能,由 1 名盲法调查员进行.改良 Garcia 测试包括自发活动、轴性感觉、触须、肢体对称、侧转、前肢行走、攀爬 7 个项目.每项测试分为 0~3 分或 1~3 分,总分 3~21 分.评分越高表明神经功能越好.

1.5 免疫学实验与实时荧光定量 PCR

免疫学实验方法见附录表 S1 使用 Trizol 试剂盒提取小鼠脑组织的总 RNA,并选取完整性良好的 RNA 样品用于反转录为 cDNA,保存于-20℃ 备用.qPCR 分析采用罗氏 Light Cycler 96 Real-Time PCR 系统(Roche)和 Ultra SYBR Mixture 完成.引物序列见附录表 S2.

1.6 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8.0.2 软件进行图形绘制和统计学分析.所有数据以平均值±标准误(SEM)表示.根据数据是否满足正态性和方差齐性,两组间比较采用独立 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验;多组间比较采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验.所有统计检验均为双侧检验.

2 结果

2.1 ICH 和 Control 组脑组织基因差异性分析

ICH 组和对照组(Control)组脑组织的 *PDPN* 基因数据来源于 GSE216607 数据集,每组包含 3 个 ICH 样本和 3 个 SHAM 样本,样本取自小鼠 ICH 后第 3 天的脑组织,测序信息来自 *Mus musculus*,平台为 GPL24247.

PCA 结果显示,Control 组与 ICH 组的基因表达存在显著差异(附录图 S1(a)).基于|lg(FC)|≥1 和调整后的 *p*<0.05 的筛选标准,从 GSE216607 数据集中共筛选出 20 371 个基因,其中上调基因 2 305 个,下调基因 497 个(附录图 S1(b)).

利用 5 种算法(PageRank、Hub、Eigen、Degree、Betweenness)对基因重要性进行排序,并取前 400 个基因的交集,最终获得 215 个关键基因(附录图 S1(c)).随后,对这些基因进行蛋白质-蛋白质互作(PPI)分析,揭示了多种蛋白之间的相互作用(附录图 S1(d)).

2.2 筛选关键差异基因

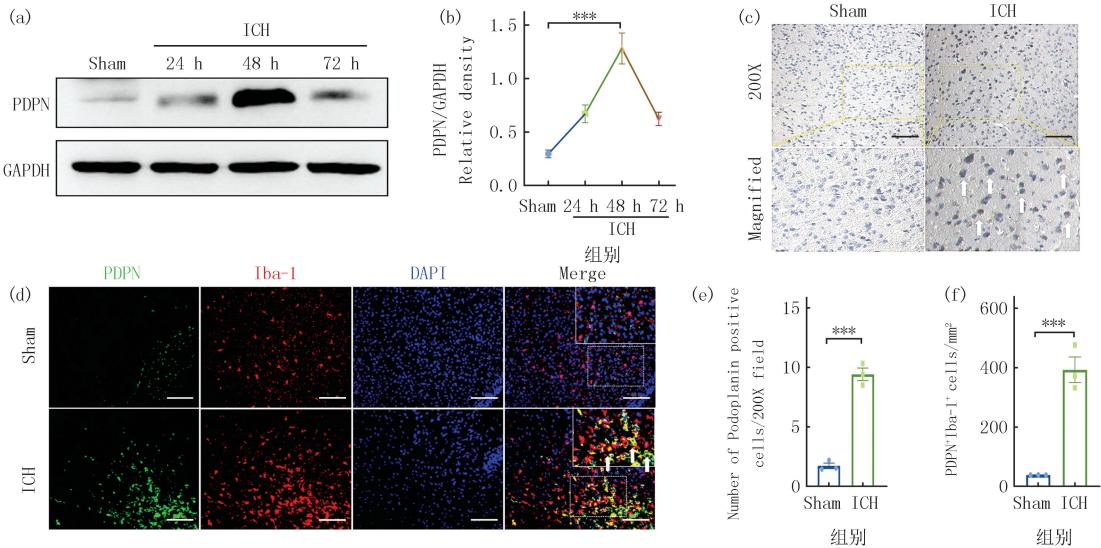
本研究采用 LASSO 回归和随机森林两种机器学习算法对差异基因进行进一步筛选.两种算法均表现出良好的稳定性和功能性,能够有效筛选和排序重要基因.通过 LASSO 算法筛选出排名前 6 的差异基因,随机森林算法筛选出排名前 17 的差异基因.最终,取两种算法筛选结果的交集,获得 3 个核心基因:*PDPN*、*Cdk2* 和 *Cxcl16*(附录图 S2).这些基因可能通过特定功能参与脑出血的发生和发展过程.

2.3 关键差异基因功能富集分析

接下来,为明确差异基因的功能,我们利用 DAVID 生物信息学工具进行了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析(附录图 S3(a-b)).GO 分析结果显示,差异基因主要富集于白细胞介导的免疫反应、髓系白细胞活化、细胞因子的正向调节以及免疫效应过程的调控等生物学过程.KEGG 通路分析结果与之相似,提示差异基因功能主要富集于补体激活和凝血途径.这些结果表明,免疫相关过程可能在脑出血(ICH)中发挥重要作用.为明确差异基因在脑出血中的作用,我们基于文献证据选择以下标志物进行相关性分析:1)CD86(巨噬细胞标志物):其上调与促炎因子释放直接相关,已广泛用于脑出血模型炎症评估^[3];2)Tmem119(小胶质细胞特异性标志物):可区分原位小胶质细胞与外周浸润巨噬细胞^[13];3)CD177(中性粒细胞标志物):特异性标记成熟中性粒细胞,其表达水平可量化炎症浸润程度^[14].结果显示,小胶质细胞标志物 Tmem119 和中性粒细胞标志物 CD177 与 3 个核心差异基因(*PDPN*、*Cdk2*、*Cxcl16*)均呈正相关,且小胶质细胞的 M1 型促炎标志物 CD86 也与这些差异基因呈现高度正相关(附录图 S3(c)).这进一步提示,这些差异基因可能通过与小胶质细胞和中性粒细胞的相互作用,参与脑出血的炎症进展过程.

2.4 平足蛋白在 ICH 和细胞上随时间进程的表达上调

鉴于本研究组长期致力于 *PDPN* 基因功能和机制的研究,*PDPN* 基因被进一步深入研究和分析,并构建了体外脑出血模型.为了观察 *PDPN* 的表达情况,在模型构建后提取了脑部血肿部位组织,并通过 Western blot 分析、免疫组化以及免疫荧光染色进行检测.图 1(a-b)展示了在 24、48 和 72 h ICH 构建后取脑组织提蛋白 Western blot 检测蛋白的表达情况.明显地,*PDPN* 在 ICH 后较假手术组(Sham 组)显著升高,并在 48 h 达到顶峰,但在 72 h 降低,结果说明了 *PDPN* 蛋白在脑出血后的时间依赖性表达变化,揭示了其在 ICH 后早期的显著上调,提示其在脑出血早期可能发挥重要作用.为此,后续实验均取 48 h 脑组织进行检测.如图 1(c),免疫组化结果中与 Sham 组相比 ICH 后 *PDPN* 依然表达为升高.同时,免疫荧光双标染色显示,*PDPN* 在 ICH 后主要表达在血肿周围组织的小胶质细胞/巨噬细胞(*Iba-1*⁺)中,且较 Sham 组表达上调(图 1(d)),这些结果均表明 *PDPN* 可能通过调节小胶质细胞/巨噬细胞的活性参与脑出血后的炎症反应.



注: (a-b) ICH后Sham组与ICH组24 h、48 h、72 h同侧大脑半球中PDPN表达定量分析的代表性Western blot条带.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, 全文同; (c) 分别取材Sham组和Vehicle组小鼠ICH后同侧大脑半球上血肿周围区域, 对该区域进行免疫组化染色. 棕色区域表示为PDPN阳性, 蓝色区域表示为PDPN阴性, 刻度尺为200 μm ; (d) 如上述所示, PDPN(绿色)与小胶质细胞(*Iba-1*⁺, 红色)在Sham组和ICH组血肿区域共定位的免疫荧光染色图像. 细胞核DAPI(蓝色), 刻度尺为200 μm ; (e) Sham组、ICH组PDPN单阳性细胞荧光定量统计结果; (f) Sham组、ICH组PDPN⁺*Iba-1*⁺双阳性小胶质细胞荧光定量统计结果.

图1 ICH后小胶质细胞上PDPN的表达情况

Fig.1 Expression of PDPN on microglia after ICH

2.5 SZ168 治疗可减轻 ICH 后神经行为缺陷和血肿大小

为了探究 PDPN 与脑出血疾病的相关性,使用特异性单克隆抗体 SZ168 来抑制 PDPN 功能.C57BL/6

小鼠构建 ICH 模型,在 ICH 发生后 6 h,腹腔注射抗 PDPN 单克隆抗体 SZ168(每只 100 μ g).分别于术后第 1、3 和 7 天取脑组织观察小鼠脑出血情况.结果显示,SZ168 治疗组的小鼠脑血肿部位相较于对照组(mIgG 处理组)有明显减小的趋势,表明 SZ168 治疗能够减轻小鼠 ICH 后的脑部血肿大小(图 2(a));通过观察造模后第 1、3、7 天的 小鼠神经功能,可以看出 Vehicle 组相比起 SZ168 治疗组在 ICH 后第 1、3、7 天神 经功能缺损较高,SZ168 的治疗能够有效减 轻神经功能的受损程度(图 2c);通过转棒 实验检测小鼠 ICH 后第 3 天运动功能受损 程度,结果显示,SZ168 组小鼠在转棒上的 保持时间有较为明显升高的趋势(图 2b), 这提示 SZ168 抗体的治疗能够有效缓解 小鼠 ICH 后运动功能的受损.

2.6 SZ168 治疗减少 ICH 后炎症细胞因子的表达

基于前期实验观察到 SZ168 对小鼠 ICH 后脑出血的治疗作用,以及文献中关 于 PDPN 上调通过参与炎症通路调控疾病 炎症反应及预后的证据,我们进一步探讨 了 SZ168 治疗对 ICH 中小胶质细胞极化 及相关炎症因子变化的影响.

Western blot 分析显示 ICH 后 PDPN 表达显著升高,同时伴有小胶质细胞 M1 型标志物 iNOS 表达上 调,M2 型标志物 Arg-1 下调的现象,然而,SZ168 处理后,这一变化趋势被逆转(图 3(a-b)).qPCR 结果显 示,ICH 后 M1 型标志物(CD86、iNOS)上调,M2 型标志物(CD206、Arg-1)表达下调(图 3(c-f)).通过 ELISA 实验检测炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 的蛋白表达水平进行检测,结果表明,ICH 组的炎症 因子表达显著升高,而 SZ168 处理显著降低了这些炎症因子的表达水平(图 3(g-i)).这提示了 SZ168 通过调 节小胶质细胞的极化状态,从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转变,进而减轻 ICH 后的炎症因子释放,改善神 经功能损伤.这一发现为 PDPN 作为 ICH 治疗靶点提供了新的机制支持.

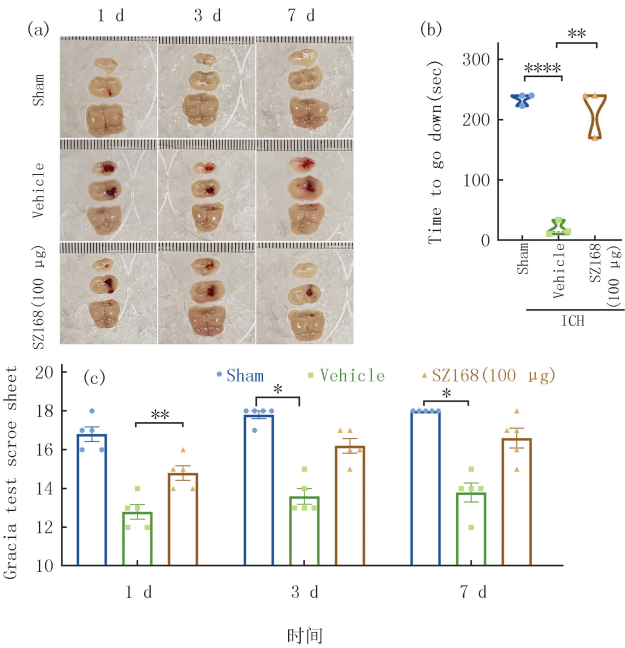
2.7 SZ168 干预抑制 NF- κ B 通路蛋白表达

通过 Western blot 分析发现,脑出血后 NF- κ B 通路关键蛋白磷酸化水平显著改变.与 Sham 组相比, ICH 模型组中 p-I κ B α /I κ B α 及 p-P65/P65 比值均显著升高(图 4),表明 NF- κ B 通路在血肿周围炎症反应中 被激活.而 SZ168 干预后,上述磷酸化水平较 ICH 组降低,提示 SZ168 通过抑制 I κ B α 磷酸化阻断 NF- κ B 核 转位.

结合前期结果,NF- κ B 通路的抑制与小胶质细胞 M1 型标志物 CD86 的下调及 M2 型标志物 Arg-1 的 上调密切相关,进一步证实 SZ168 通过靶向 PDPN/NF- κ B 轴调控小胶质极化表型.这一发现与 NF- κ B 在神 经炎症中的核心调控作用一致^[15],首次揭示了 PDPN 在脑出血中通过该通路驱动神经炎症的机制,为临床 干预提供了潜在分子靶点.

3 讨论

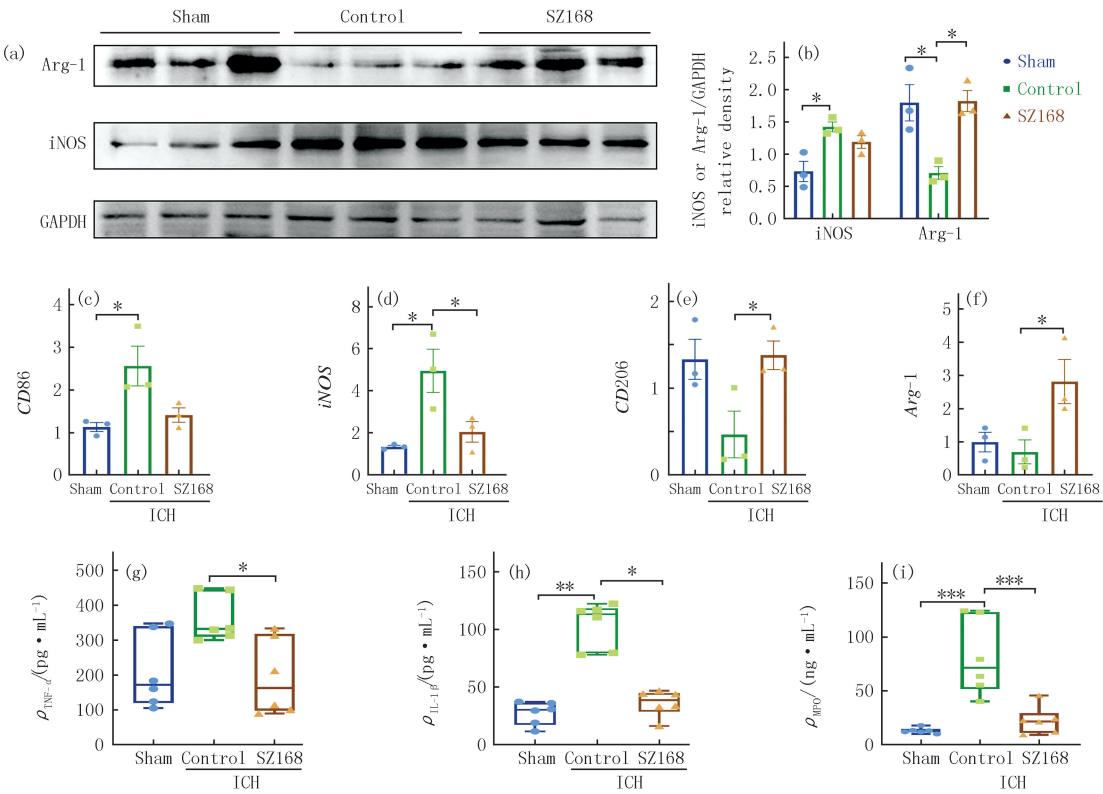
脑出血是局灶性卒中最常见的亚型,具有高致死率和致残率,深入研究其发病机制对于识别新的治疗靶



注: (a) 分别观察ICH后第1、3和7天的 小鼠血肿大小; (b) ICH第3天后的小 鼠转棒实验; (c) ICH第1、3、7天后 的小鼠神经功能评分测试.

图2 小鼠ICH后脑血肿观察和神经功能检测
Fig.2 Cerebral haematoma observation and neurological function test after ICH in mice

点至关重要.本研究通过挖掘 GEO 数据库,筛选出与脑出血相关的基因,并通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,核心差异基因的功能和通路与免疫反应密切相关.进一步利用 LASSO 算法和随机森林算法筛选出 3 个核心基因(*PDPN*、*Cdk2*、*Cxcl16*),并通过 Pearson 相关性分析发现这些基因与小胶质细胞/巨噬细胞(*Tmem119*、*CD86*)和中性粒细胞(*CD177*)标志物呈正相关.这些结果提示,核心基因可能通过参与炎症细胞的促炎反应影响 ICH 的进程.已有研究表明,神经炎症是 ICH 后继发性脑损伤的重要机制,所以抑制神经炎症可以减轻 ICH 后继发性脑损伤和改善神经功能^[16].中枢神经系统的神经炎症反应是个较为复杂的过程,是由不同组别的神经胶质细胞相互协同作用产生影响,并且其中小胶质细胞起着较为重要的激活作用,其能够激活炎症反应初始步骤,从而促进中性粒细胞浸润,放大炎症反应,导致细胞外基质、细胞膜完整性以及 BBB 的破坏^[17].



注: (a-b) 小鼠 ICH 48 h 后取同侧大脑半球血肿组织, Sham 组、Control 组以及 SZ168 组中小胶质细胞极化标志物 Arg-1 和 iNOS 表达定量分析的代表性 Western blot 条带. (c-f) 与上述一致, 取血肿组织检测 mRNA 水平. (g-i) ELISA 试剂盒检测脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 蛋白.

图3 ICH后血肿组织小胶质细胞极化分子及抑制炎症细胞检测

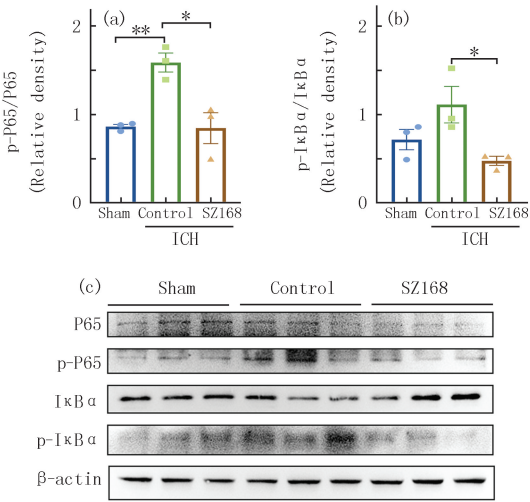
Fig.3 Detection of microglia polarization molecules and inhibitory inflammatory cells in hematoma tissue after ICH

研究进一步聚焦 *PDPN* 基因,发现 ICH 发生时小胶质细胞中 *PDPN* 表达上调,并通过促进小胶质细胞向促炎的 M1 型极化,抑制向抗炎的 M2 型极化,促进炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 释放,从而加剧炎症反应.*PDPN* 是一种跨膜黏蛋白,其与淋巴管内皮和淋巴管生成有关,且在多种人类肿瘤和炎症性疾病中,*PDPN* 的表达更为广泛^[18],根据研究显示,*PDPN* 与小鼠创伤性脑损伤后小胶质细胞活化相关^[19],在原代小胶质细胞中,创伤相关刺激可诱导 *PDPN* 的表达,在体外血红蛋白处理下,敲低 *PDPN* 会减少 M1 样小胶质细胞的比例,增加 M2 样小胶质细胞的比例^[3].并且研究发现 *PDPN* 通过激活 NF- κ B 通路加剧脑出血后神经炎症,这一机制为小胶质极化调控提供了新视角.SZ168 抑制 *PDPN* 后显著降低 I κ B α 和 P65 的磷酸化水平,阻断了 NF- κ B 核转位及下游促炎因子转录,从而抑制 M1 型极化并促进 M2 型转化,然而,MAPK 等其他通路是否协同参与仍需进一步验证.

此外,也有研究发现,使用 *PDPN* 特异性单克隆抗体 SZ168 中和 *PDPN*,能够通过保护肺血管通透性,降低促炎细胞因子水平,改善肺组织病理改变,减少炎性细胞浸润,进而有效缓解肺损伤^[8],在本研究中,使

用 PDPN 特异性单克隆抗体 SZ168 抑制 PDPN 功能后,观察到 ICH 小鼠的血肿和神经功能损伤显著减轻.这一结果与既往研究一致,表明 PDPN 在 ICH 后的炎症反应中发挥关键作用.据报道,在神经恶性胶质瘤和黑色素瘤中 PDPN 能够增加肿瘤细胞的迁移能力,增强内皮细胞的成管活性,说明 PDPN 的表达是肿瘤进展的重要步骤,PDPN 在类风湿性关节炎、脓毒症和伤口愈合过程中的作用中也有相关报道^[20].CLEC-2-PDPN 通路能够促进感染部位 PDPN 阳性免疫细胞的浸润和巨噬细胞的募集.

综上所述,研究发现 ICH 后促炎 M1 型小胶质细胞的增加与 PDPN 表达上调一致,而 SZ168 治疗能够下调炎症因子的释放,减轻神经功能损伤和血肿大小.这些结果提示 PDPN 的表达与 ICH 患者的预后密切相关,PDPN 可能成为 ICH 早期管理的潜在治疗靶点.尽管本研究揭示了 PDPN 在 ICH 中的重要作用,但仍存在局限性,PDPN 在小胶质细胞炎症中的具体分子机制尚未完全阐明,需要进一步的体内外实验验证,并且观察时间点限于急性期,未评估慢性期神经再生及远期预后影响,后续需延长观察周期以全面评估干预措施的长期效应.



注:小鼠ICH 48 h后取同侧大脑半球血肿组织,Sham组、Vehicle组以及SZ168组中P65、p-P65、IκBα及p-IκBα蛋白表达定量分析(a-b)的代表性Western blot条带(c).

图4 ICH后血肿组织中NF-κB通路蛋白表达检测

Fig.4 NF-κB pathway protein expression detection in hematoma tissues after ICH

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2025.02.17.0003).

参 考 文 献

[1] Wu X, Luo J N, Liu H X, et al. Recombinant adiponectin peptide ameliorates brain injury following intracerebral hemorrhage by suppressing astrocyte-derived inflammation via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission[J]. Translational Stroke Research, 2020, 11(5):924-939.

[2] Deng X Y, Ren J W, Chen K Z, et al. Mas receptor activation facilitates innate hematoma resolution and neurological recovery after hemorrhagic stroke in mice[J]. Journal of Neuroinflammation, 2024, 21:106.

[3] Fei M X, Wang H D, Zhou M L, et al. Podoplanin influences the inflammatory phenotypes and mobility of microglia in traumatic brain injury[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 523(2):361-367.

[4] Wang Y, Tian M, Tan J Y, et al. Irisin ameliorates neuroinflammation and neuronal apoptosis through integrin αVβ5/AMPK signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022, 19:82.

[5] Sasano T, Gonzalez-Delgado R, Muñoz N M, et al. Podoplanin promotes tumor growth, platelet aggregation, and venous thrombosis in murine models of ovarian cancer[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2022, 20(1):104-114.

[6] Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, et al. Podoplanin in inflammation and cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3):707.

[7] Qian S, Qian L, Yang Y, et al. Podoplanin neutralization reduces thrombo-inflammation in experimental ischemic stroke by inhibiting interferon/caspase-1/GSDMD in microglia[J]. Annals of Translational Medicine, 2022, 10(18):979.

[8] Heng J F, Wu D Y, Zhao Y M, et al. SZ168 treats LPS-induced acute lung injury by inhibiting the activation of NF-κB and MAPKs pathways[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2023, 307:103965.

[9] 赵塞,董圆,石林,等.结直肠癌患者血浆可溶性平足蛋白的检测及临床意义[J].中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(5):579-584.

[9] Zhao S, Dong Y, Shi L, et al. Detection and clinical significance of plasma soluble podoplanin in patients with colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2024, 31(5):579-584.

[10] Xu M Q, Wang X, Pan Y F, et al. Blocking podoplanin suppresses growth and pulmonary metastasis of human malignant melanoma[J].

BMC Cancer,2019,19:599.

[11] Wang Y,Sadik D,Huang B,et al.Regulatory T cells alleviate myelin loss and cognitive dysfunction by regulating neuroinflammation and microglial pyroptosis via TLR4/MyD88/NF-κB pathway in LPC-induced demyelination[J].Journal of Neuroinflammation,2023,20:41.

[12] Chen D L,Cai J H,Wang C C N.Identification of key prognostic genes of triple negative breast cancer by LASSO-based machine learning and bioinformatics analysis[J].Genes,2022,13(5):902.

[13] Tschoe C,Bushnell C D,Duncan P W,et al.Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets[J].Journal of Stroke,2020,22(1):29-46.

[14] Cui J,Wang H B,Liu S Y,et al.New insights into roles of IL-7R gene as a therapeutic target following intracerebral hemorrhage[J].Journal of Inflammation Research,2024,17:399-415.

[15] Zhou Q,Zhang Y,Lu L,et al.Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF-κB pathway and mitophagy disorder[J].Food and Chemical Toxicology,2022,168:113369.

[16] Xu P F,Hong Y,Xie Y,et al.TREM-1 exacerbates neuroinflammatory injury via NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in experimental subarachnoid hemorrhage[J].Translational Stroke Research,2021,12(4):643-659.

[17] Ren H L,Han R R,Chen X M,et al.Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation;an update[J].Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,2020,40(9):1752-1768.

[18] Tatsumi K.The pathogenesis of cancer-associated thrombosis[J].International Journal of Hematology,2024,119(5):495-504.

[19] Thangameeran S I M,Tsai S T,Liew H K,et al.Examining transcriptomic alterations in rat models of intracerebral hemorrhage and severe intracerebral hemorrhage[J].Biomolecules,2024,14(6):678.

[20] Zhang P C,Wang X N,Yang X D,et al.Molecular control of PDPNhi macrophage subset induction by ADAP as a host defense in sepsis [J].JCI Insight,2025,10(6):e186456.

Target significance and inflammatory response mechanisms of podoplanin in the treatment of cerebral haemorrhage

Liu Shiyao, Zhao Yiming

(NHC Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis; Jiangsu Institute of Hematology,
The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract: In this study, we investigated the role of podoplanin (PDPN) in cerebral hemorrhage using bioinformatics and experimental approaches. Differentially expressed genes related to cerebral hemorrhage were identified from the GSE216607 dataset, and three core genes(*PDPN*, *Cdk2*, and *Ccl16*) were selected using machine learning algorithms. Functional enrichment analysis revealed their involvement in key biological pathways. Focusing on PDPN, we constructed a cerebral hemorrhage animal model and verified that PDPN expression was significantly up-regulated in microglia after hemorrhage. Treatment with the PDPN-inhibitory monoclonal antibody SZ168 improved neurological deficits and reduced hematomas in mice. Mechanistically, SZ168 inhibited microglial polarization toward a pro-inflammatory phenotype and promoted an anti-inflammatory phenotype by modulating the NF-κB pathway, thereby reducing inflammatory factor release. In conclusion, PDPN plays a critical role in neuroinflammation after cerebral hemorrhage by regulating microglial polarization, suggesting its potential as a therapeutic target for cerebral hemorrhage treatment.

Keywords: cerebral haemorrhage; inflammation response; podoplanin; microglia; bioinformatics

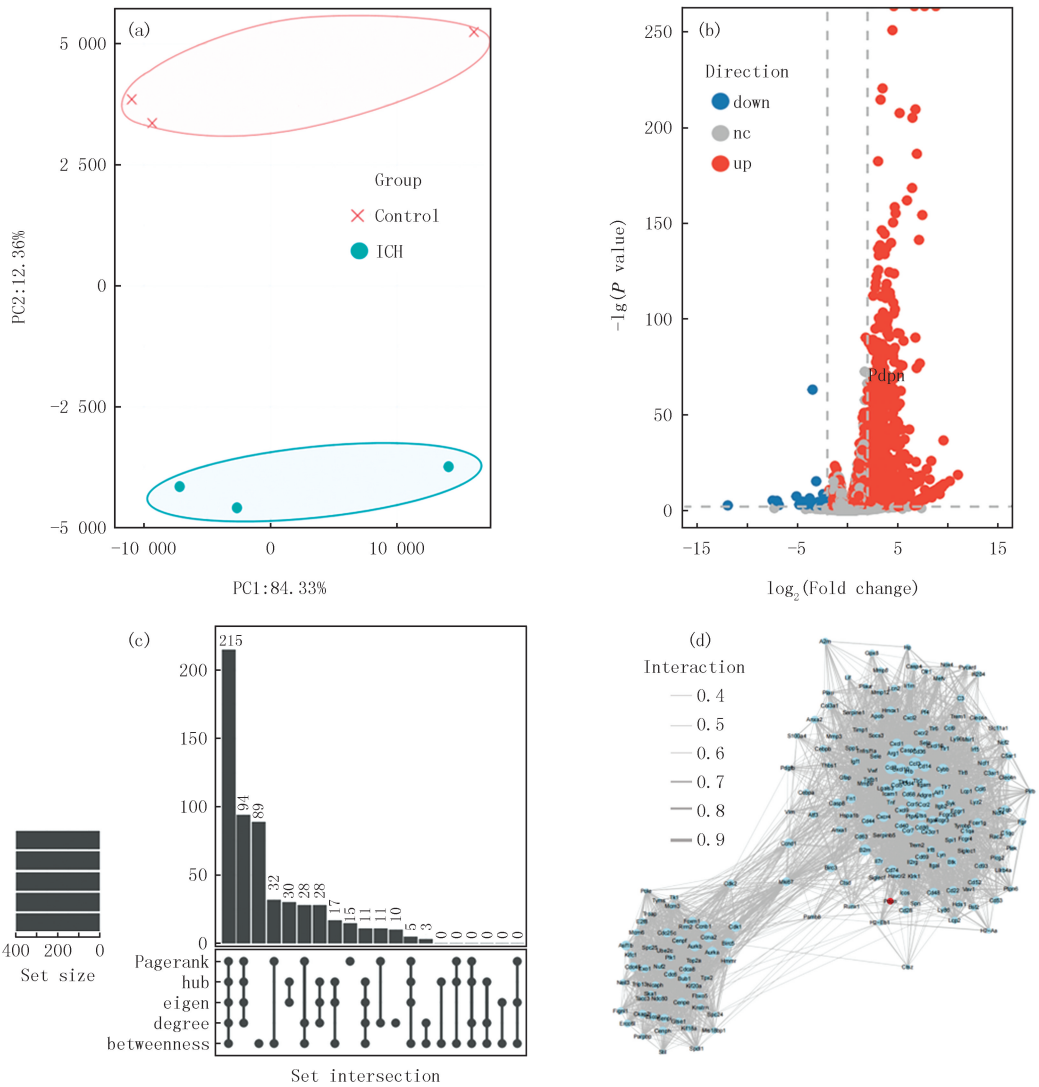
[责任编辑 刘洋 赵晓华]

表 S1 免疫学试验方法
Tab. S1 Immunological test methods

名称	方法
免疫荧光染色	小鼠 ICH 后 48 h 进行深度麻醉,再经心脏灌注 30 mL 冰冷 PBS 和 30 mL 4%多聚甲醛.全脑收集后,置于 4%多聚甲醛中固定 24 h.随后,依次将大脑放入 75%、80%、95%、100%(Ⅰ)、100%(Ⅱ)乙醇中脱水,每次 0.5 h;再放入乙醇+二甲苯体积比(1:1)中 2 h,二甲苯(Ⅰ)和二甲苯(Ⅱ)各 10 min,最后进行浸蜡并用纯蜡包埋.包埋后冷却,用石蜡切片机进行冠状切片(5 μm)制备.脑切片用于双重免疫荧光染色:一抗包括抗钙结合蛋白(Iba-1; 1:1 000,Abcam,美国)和抗 Podoplanin(5 μg/mL,Thermo Fisher Scientific,美国),4 ℃孵育过夜;二抗(1:100,碧云天,中国)37 ℃孵育 1 h.染色完成后,用荧光显微镜观察并拍照,图片分析使用 Fiji/ImageJ 软件完成.
免疫组织化学	小鼠经 1%戊巴比妥钠麻醉后,经心脏灌注 30 mL 冰冷 PBS 和 30 mL 4%多聚甲醛.收集全脑,置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,随后转移至 70%乙醇中保存.用于石蜡包埋和 5 μm 厚切片制备.切片经柠檬酸盐或 EDTA 缓冲液进行热诱导抗原修复后,用氧化物酶处理,并以无血清蛋白封闭.随后,切片用抗 Podoplanin 抗体(5 μg/mL,Thermo Fisher Scientific,USA)染色,4 ℃孵育过夜.之后,使用 HRP 标记的二抗和二氨基苯胺(DAB)显色,并以苏木素进行复染,以显示免疫反应性.最后,使用 ImageJ 软件测量 5 张切片的 Podoplanin 免疫染色密度.
免疫印迹实验	小鼠经灌注冰冷 PBS(0.1 mol/L,pH 7.4)后,分别于术后 24、48 和 72 h 取血肿周围组织,保存于-80 ℃冰箱备用.脑组织在玻璃匀浆器中与含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解缓冲液混合,研磨至 10%组织匀浆,冰上裂解 30 min,随后在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 20 min.细胞裂解同法处理,4 ℃下 12 000 g 离心 20 min 后收集上清液,并用 BCA 法测定蛋白浓度.等量蛋白(每孔 30 μg)经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(80 V 电压 30 min,120 V 电压 40 min),转移至硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉封闭.一抗 4 ℃孵育过夜,随后用抗兔或抗小鼠 IgG 偶联二抗(1:5 000,碧云天,中国)处理.二抗孵育结束后,用 PBS 冲洗,使用增强化学发光系统进行 3 次蛋白可视化,并用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量分析.所用抗体为抗 Podoplanin(1:1 000,Thermo Fisher Scientific,USA);抗 iNOS(1:4 000,Proteintech,武汉,中国);抗 Arg-1(1:10 000,Proteintech,武汉,中国);抗 P65(1:1 000,Proteintech,武汉,中国);抗 p-P65(1:2 000,Proteintech,武汉,中国);抗 IκBα(1:5 000,Proteintech,武汉,中国);抗 p-IκBα(1:2 000,Proteintech,武汉,中国);抗 Gapdh(1:10 000,Proteintech,武汉,中国);抗 β-actin(1:5 000,Proteintech,武汉,中国).
酶联免疫吸附试验	ICH 模型构建 48 h 后,经心内灌注 0.1 mol/L PBS 清除循环血液,获取脑组织样本.按组织质量(g):裂解液体积(mL)=1:10 的比例,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上机械匀浆后 4 ℃静置 30 min,12 000 r/min 低温离心 20 min 收集上清.采用未稀释上清液,使用联科生物(Multi sciences)小鼠特异性 ELISA 试剂盒定量 IL-1β、TNF-α 及 MPO 水平,严格遵循试剂说明书操作.

表 S2 引物序列信息表
Tab. 2 The sequence information of qPCR primers

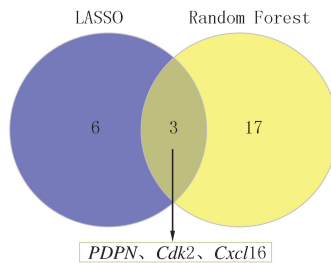
基因	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
CD86	F:TCAGTGATCGCCAACTTCAG	20
	R:TTAGGTTTCGGGTGACCTTG	20
iNOS	F:CACCTGGAACAGCACTCTCT	20
	R:CTTTGTGCGAAGTGTCAGTG	20
CD206	F:CGCGAGGCAATTTTAAATCT	20
	R:ATTTGCATTGCCAGTAAGG	20
Arg-1	F:AAGAATGGAAGAGTCAGTGTGG	22
	R:GGGAGTGTTGATGTCA GTGTG	21
GAPDH	F:TGTCCGTCGTGGATCTGAC	19
	R:CCTGCTTACCACCTTCTTG	20



注: (a) 主成分分析(PCA)揭示ICH组与Control组基因表达, (b) GSE216607数据集火山图, 红色圆点表示上调差异基因, 蓝色圆点表示下调差异基因, 灰色圆点表示无显著差异, (c) 基于PageRank、Hub、Eigen、Degree、Betweenness算法对差异基因重要性排序, (d) 构建蛋白质-蛋白质互作(PPI)网络, 展示差异基因之间的相互作用关系。

图S1 脑出血相关差异基因与相互作用分析图

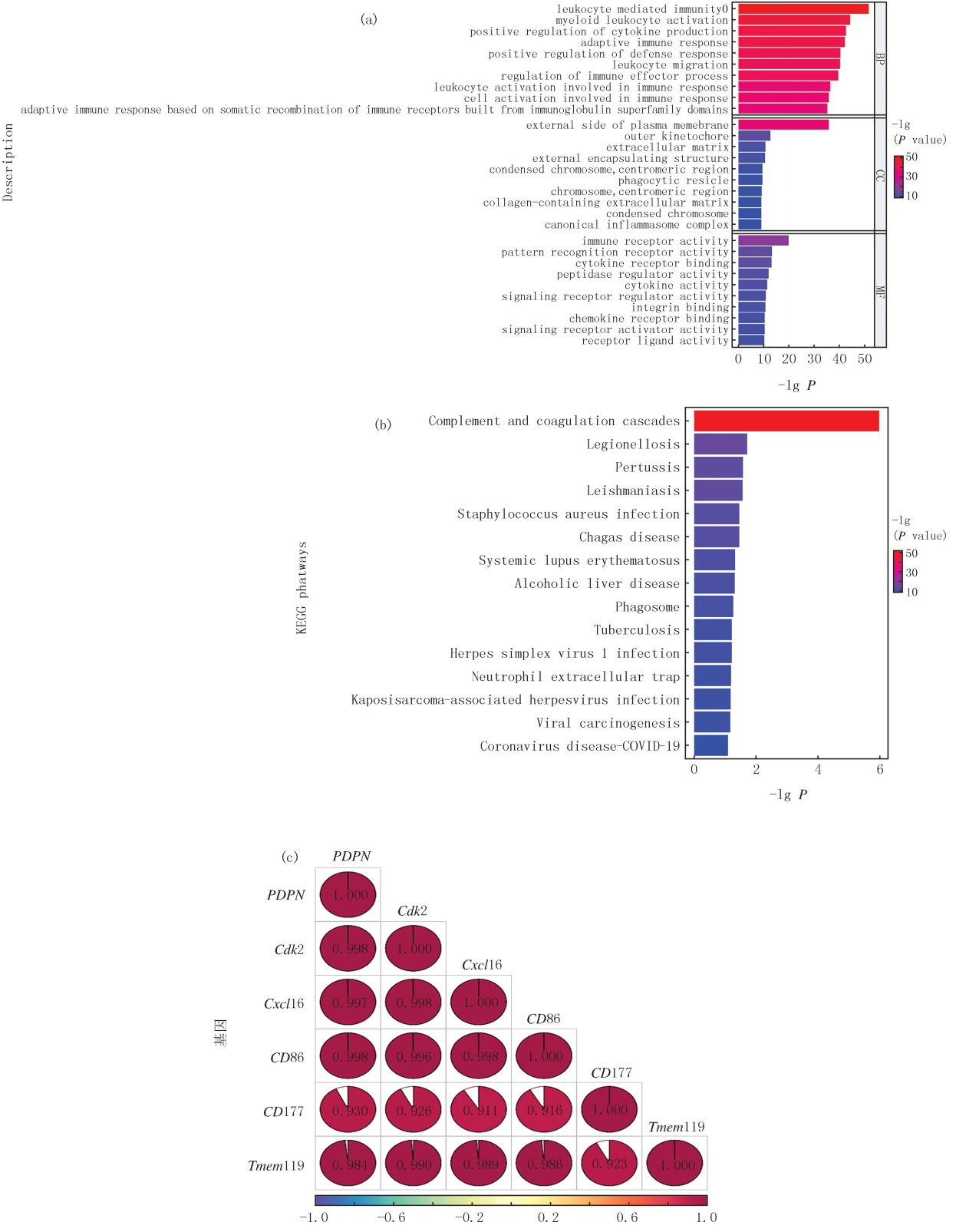
Fig.S1 Cerebral haemorrhage-related differential genes and interaction analysis map



注: LASSO算法选和随机森林算法选择排序靠前的差异基因, 取两种算法的基因交集, 获得3个核心基因 (*PDPN*、*Cdk2*、*Cxcl16*)。

图S2 核心差异基因筛选

Fig.S2 Core differential gene screening and immune function correlation analysis



注: (a-b) 对GSE216607数据集的差异基因进行GO富集分析和KEGG通路分析; (c) 分析3个核心基因与小胶质细胞/巨噬细胞的标志物 *CD86*、*Tmem119*、中性粒细胞的标志物 *CD177* 的相关性。

图S3 差异基因的GO和KEGG通路富集分析图和免疫相关性分析

Fig.S3 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways for the differential genes and immune function correlation analysis