



李礼博士, 男, 西南大学研究员、博士生导师。国家优秀青年基金获得者, 重庆市“巴渝学者”特聘教授, 重庆市青年拔尖人才入选者。中国细胞生物学学会理事、中国动物学会斑马鱼分会委员、重庆市细胞生物学会秘书长。课题组以斑马鱼为模式动物, 围绕着髓系细胞发育及免疫细胞在组织损伤修复再生中的功能等开展研究。近年来在髓系细胞分化及白血病发生的分子机理、巨噬细胞调控组织损伤修复的作用机制等方面取得重要的研究进展。相继在 *Immunity*、*Leukemia*、*Blood*、*JBC* 等杂志上共发表论文20余篇, 产生了重要的国际学术影响。

<http://smkxxy.swu.edu.cn/viscms/smkxxyindex/jiaoshou3736/20150926/242263.html>

小胶质细胞的发育调控

赵方莹 李礼*

(西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要 小胶质细胞最初被del Rio-Hortega定义。作为中枢神经系统的巨噬细胞, 小胶质细胞的正常功能对于清除凋亡细胞、修剪突触、抵御病原微生物、维持神经系统稳态及促进神经组织的修复再生等起着不可或缺的重要作用, 也在多种神经系统疾病, 如神经退行性疾病等的发生发展中扮演重要角色。因此, 一直以来科研工作者都努力探析关于小胶质细胞发育的多个重要问题, 如它们的来源、向CNS迁移与定植的路径、分化与成熟的形态功能改变和微环境调控机理、不同亚类的分布和与神经细胞相互作用的角色机制等。该篇综述将回顾关于小胶质细胞发育研究的历史, 总结近来关于小胶质细胞的起源、向CNS的定植、分化与成熟的分子机制及其对CNS重要功能等的研究进展, 并讨论今后的重点关注方向。

关键词 小胶质细胞; 发育; 分子机制

Microglia Development

ZHAO Fangying, LI Li*

(School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Microglia were initially defined by Dr. del Rio-Hortega. As a tissue resident macrophage in the central nervous system (CNS), microglia serve as soldiers to protect the CNS environment, including removing apoptotic cells, pruning synapses, clearing pathogenic microorganisms, maintaining the homeostasis and promoting the recovery and regeneration of the CNS tissues after injury. It also has functions in the progress of nervous system disorders, such as neurodegenerative diseases. Therefore, researchers paid great efforts to investigate the cellular and molecular mechanisms underlying microglia development, such as when and where they are originated, how

国家自然科学基金(批准号: 31822033、31771623、31571500)、科技部国家重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB942802)和中央高校基本科研业务费(批准号: XDJK2017A015)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68254946, E-mail: alisir@swu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31822033, 31771623, 31571500), the National Key Basic Research Program of China Grant (Grant No.2015CB942802) and Fundamental Research Funds for the Central Universities Grant (Grant No.XDJK2017A015)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68254946, E-mail: alisir@swu.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:26:22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1050.018.html>

they migrate and colonize to the CNS, what is the significance of their morphological and functional changes in the CNS niches and what are the key molecules given by the microenvironment to regulate their differentiation and maturation, how many subclasses of them exist, and how they are distributed and interacted with neurons, and so on. In this review, we retrospect the history of microglia development, summarize the recent progress on study of the origin, colonization, differentiation, maturation and functions of microglia. We also discuss the focused points in the future.

Keywords microglia; development; mechanisms

作为组织定居型细胞的一大亚群,小胶质细胞既是一种位于大脑和脊髓中的神经胶质细胞,又是中枢神经系统(central nervous system, CNS)的常驻巨噬细胞群^[1]。小胶质细胞最初于1899年被Nissl发现,被称为“Stäbchenzellen”(棒状细胞)。它们最初被认为是具有迁移和吞噬能力的神经胶质细胞。随后del Rio-Hortega基于对发育中动物大脑的碳酸银染色,发现该细胞驻留在中枢神经系统中且不同于其他的非神经细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。他于1920年首次将这种细胞称为“小胶质细胞”。del Rio-Hortega被称为“小胶质细胞之父”。之后Hickey和Kimura发现血管周的小胶质细胞是骨髓来源的,并表达高水平的MHCII类蛋白用于抗原呈递,这证实了del Rio-Hortega对于小胶质细胞是通过吞噬作用和抗原呈递发挥同巨噬细胞相似的功能的假定^[2-3]。小胶质细胞占大脑内所有细胞的10%~15%^[4],它们是中枢神经系统中免疫防御的主要防线,不断清除中枢神经系统中的斑块、受损的或不必要的神经元和突触以及感染的病原体。此外,小胶质细胞也参与调节神经元的发育和功能。研究表明,许多神经退行性疾病如多发性硬化症、阿尔兹海默症和帕金森病均和小胶质细胞的功能异常有关^[5-6]。因此,小胶质细胞对于神经系统的发育和功能乃至损伤修复都具有重要作用,并可成为治疗神经退行性疾病的潜在靶点。

1 小胶质细胞的起源

小胶质细胞起源的研究始于它们被del Rio-Hortega发现后。最初的一些研究认为至少有一部分小胶质细胞源于神经外胚层。这个观点是基于对小鼠海马体内小胶质细胞进行放射性自显影的形态学观察,提示小胶质细胞似乎来自同样产生星形胶质细胞的前体。同时,蛋白皮质素-1抗体可标记发育中的大鼠脑中一部分神经上皮细胞和小胶质细胞,

并且一些识别小胶质细胞的抗体也标记了部分神经外胚层细胞。这些结果似乎支持小胶质细胞具有神经外胚层的谱系来源^[7-8]。但这个观点很快受到挑战。小胶质细胞与外周单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)表型相似,且表达许多与巨噬细胞相关的标志物,如CD11b、CD14和EMR1(鼠中被称为F4/80),提示了小胶质细胞来自造血系统的髓系细胞,尤其是单核细胞/巨噬细胞^[9-11]。但小胶质细胞与血管周的和脑膜巨噬细胞不同,后两类巨噬细胞来源于血液中的单核细胞。研究表明,生理条件下晚期的单核细胞不进入健康的大脑,但辐射诱导的骨髓细胞清除可促进血液来源的Ly-6C^{hi}CCR2⁺单核细胞定植CNS,提示辐射后血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)开放对于小胶质细胞定植的重要性。这些数据证明,单核细胞可以在病理条件下进入CNS实质并转化为与小胶质细胞形态相似的细胞,然而,它们的小胶质细胞属性以及对CNS的病理贡献仍存在争议。近来的一项研究表明,外周来源的巨噬细胞在骨髓移植后和CNS炎症期间会浸入脑组织,成为脑定植巨噬细胞(brain-engrafting macrophages, beMφs),这些细胞会在小胶质细胞耗竭时补充脑组织。RNA深度测序分析结果提示,beMφs保持与小胶质细胞不同的独特的功能和转录特性。因此,beMφs作为一种独特的CNS细胞类型,与真正原位产生的小胶质细胞仍存差异^[12],生理条件下的小胶质细胞并不是主要源于外周的单核/巨噬细胞。

基于Cx3cr1-GFP敲入小鼠的谱系追踪,为深入解析小胶质细胞的起源提供了关键工具。研究者首先在E9.5检测到卵黄囊中GFP⁺细胞,随后通过追踪,发现GFP⁺细胞于E10.5迁移至CNS中。同时,小鼠中表达Runx1和CD11b的巨噬细胞祖细胞在E8.5和E9.5之间由卵黄囊迁移到CNS区域^[13](图1)。这些细胞还会产生Ter119⁺的红细胞,表明卵黄囊中存在可分化两种谱系的红髓前体(erythroid/myeloid progeni-

tors, EMP)。随后未成熟的F4/80⁺CX3CR1⁻(A1)和F4/80⁺CX3CR1⁻(A2)巨噬细胞定居在小鼠E9.0期的脑表面上,并展现变形虫样的形状^[14]。虽然这些实验中并非所有的小胶质细胞都被遗传标记,但几乎所有的被标记小胶质细胞都来自卵黄囊细胞,并且出现在永久造血开始前。来自血液的髓系前体在出生后对成体小胶质细胞没有显著贡献,因此小胶质细胞前体可能来源于卵黄囊而不是来自胎肝或骨髓中的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)^[8](图1)。但这个观点近来受到了来自斑马鱼研究的挑战。Xu等^[15]利用光诱导的高时空分辨率命运图揭示斑马鱼中的小胶质细胞有多个来源。他们通过对不同发育时期不同位置的血液前体细胞进行微量细胞的精细标记和永久追踪,发现斑马鱼胚胎/幼鱼的小胶质细胞来源于喙周血岛(rostral blood island, RBI)区域(图1),相当于小鼠卵黄囊,而成年斑马鱼的小胶质细胞来自背主动脉腹侧壁(ventral wall of dorsal aorta, VDA),相当于哺乳动物主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区域(图1)。他们进而发现,VDA区域产生的小胶质细胞是Runx1依赖的、cMyb非依赖的,并且发育调节不同于RBI区域来源的小胶质细胞(图1)。

2 小胶质细胞向CNS的定植

小胶质细胞在CNS的不同区域定植有两种机制:增殖和迁移,前者使小胶质细胞数量增加,后者使它们能够到达神经实质的新区域^[16]。小胶质细胞

增殖在发育的脑中不断发生,体外研究发现,调控小胶质细胞增殖的几个因子存在于发育的CNS中,其中IL-3、IL-6、GM-CSF和CSF-1对小胶质细胞增殖具有刺激作用^[17-19]。但目前还不清楚增殖与小胶质细胞定植的关系。小胶质细胞定植的第二个机制是迁移。CNS发育过程中,细胞死亡频繁发生,小胶质细胞可能被受伤或死亡的细胞所吸引,使得它们能够向神经组织迁移,以便在必要时清除死亡细胞或损伤组织^[20-21]。然而小胶质细胞前体在中枢神经系统中迁移的具体分子机制仍未明确。最初在小鼠中的研究发现小胶质细胞进入大脑是依赖循环的。该结论基于心脏搏动缺陷的*Ncx1*缺失小鼠的大脑中小胶质细胞显著减少^[22]。近来,斑马鱼的活体成像结果显示,斑马鱼胚胎期的小胶质细胞前体主要通过两条途径进入视顶盖区域。约59%小胶质细胞前体从中脑的双侧周边进入视顶盖,它们可能沿着脑膜在眼睛和大脑之间迁移。另外有约34%小胶质细胞前体通过脑的腹侧部到达视顶盖,偶尔会有少量小胶质细胞前体(约7%)直接从大脑背外侧进入视顶盖。同时,通过阻止斑马鱼心跳,他们发现,发育早期小胶质细胞前体在视顶盖的迁移与定植不依赖于血液循环^[23],这与小鼠的研究结果有所不同。斑马鱼发育的脑中,神经元细胞死亡开始于2 dpf(days post-fertilization),在3 dpf达到峰值,随后下降,这与小胶质细胞前体定植的时间窗呈现较强相关性。抑制神经元细胞死亡显著减少了大脑中小胶质细胞的数量,但对外周巨噬细胞基本没有影响。这种减少

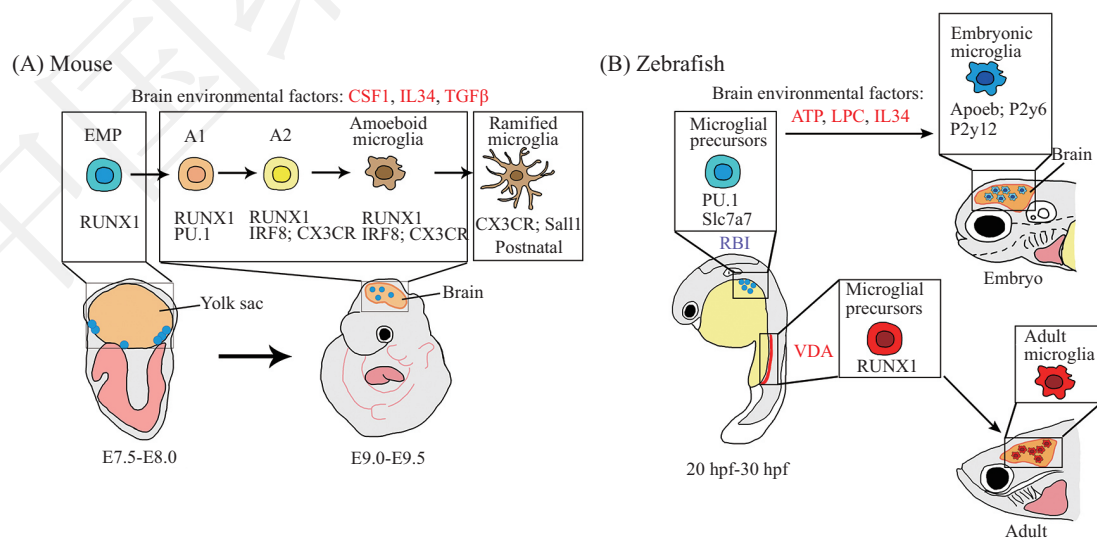


图1 小胶质细胞在小鼠和斑马鱼中的起源

Fig.1 The origin of microglia in mouse and zebrafish

是由于小胶质细胞前体进入大脑的数量及其在大脑中的群体稳态维持缺陷造成的。反之,通过理化方法和遗传学手段促进神经元凋亡可显著增加小胶质细胞的数量。深入的研究表明,损伤或死亡的神经元释放ATP介导小胶质细胞迁移(图1)。同时,由凋亡细胞分泌的磷脂LPC也可以通过其同源受体*gpr132b*有效促进小胶质细胞前体迁入大脑,提示LPC-Gpr132b信号通路参与了小胶质细胞的迁移与定植(图1)。此外,有研究表明,小鼠脑中小胶质细胞表达CSF1R,小胶质细胞在CSF1R缺陷小鼠的整个生命过程中基本不存在,并且使用CSF1R抑制剂处理成年小鼠也导致小胶质细胞的显著减少^[24]。小胶质细胞发育依赖于CSF1R但不依赖于其经典的配体CSF1,而IL34(一种新发现的CSF1R配体)富集表达在胚胎组织和大脑中,提示IL34可能支持了CNS中小胶质细胞的维持^[25]。近来的结果提示,在*il34*和*csf1ra*缺陷的斑马鱼幼鱼中,胚胎巨噬细胞不能迁移并定植于大脑,但它们的初始发育和迁移到脑外周组织基本不受影响。而IL34-CSF1Ra途径的激活足以将胚胎巨噬细胞吸引至CNS,且该过程与神经元凋亡无关。这些研究提示,神经元细胞凋亡和细胞因子信号可能协同协调小胶质细胞前体的迁移和定植^[26]。

3 小胶质细胞的分化与成熟

3.1 分子特征变化

与其他组织定居巨噬细胞相似,小鼠小胶质细胞表达常见的分子标志物,如趋化因子受体CX-3CR1、CSF1R,整合素CD11b、CD45、CD68,表面糖蛋白F4/80和IBA1等。在稳定状态下,这些蛋白的基因表达水平低于血管周的巨噬细胞和血液中的单核细胞^[27]。此外,高通量基因表达研究鉴定了数个区分小胶质细胞与CNS或周围的其他细胞类型的分子标记,如*Olfml3*、*Tmem119*、*Hexb*、*Fcrls*、*p2ry12*,这些基因标志着小胶质细胞的成熟^[28],这种成熟取决于TGFβ1的存在^[29]。TGFβ1及其受体在CNS中小胶质细胞表达最多,而在神经元中表达较少,提示TGFβ1可能通过自分泌的方式影响了小胶质细胞前体的分化与成熟。此外,有研究表明,小胶质细胞中一个独特的亚群表达了转录因子Hoxb8^[30]。这些Hoxb8⁺小胶质细胞占成年小鼠大脑中所有小胶质细胞的约30%。小鼠缺乏Hoxb8功能或在Tie2⁺髓系细

胞中Hoxb8特异性缺失会表现出类似强迫症疾病的过度梳理和脱毛等行为,提示这群小胶质细胞对于神经相关疾病的重要作用^[31]。在斑马鱼的早期胚胎中,大脑和视网膜中的小胶质细胞下调*lcp1*基因,开始表达高水平的*apoeb*,一种众所周知的神经营养脂质载体^[32]。*apoeb*被认为是斑马鱼小胶质细胞的一种分子标记物^[33-34]。

3.2 形态学变化

小胶质细胞在不同的发育阶段表现出不同的形态。第一阶段,变形虫样的小胶质细胞(amoeboid microglia),其具有类似CNS外的巨噬细胞样的形态学、组织化学和免疫学特征,因此该阶段的小胶质细胞也被称为脑巨噬细胞。变形虫样的小胶质细胞是圆形的且具有短而宽的分枝^[35-36]。胚胎阶段的变形虫样小胶质细胞部分可能会退化,但是它们中的大多数会形成薄的突起并变得分枝化(ramified microglia)。随着胚胎的发育,变形虫样的小胶质细胞逐渐消失,小胶质细胞分枝的复杂性渐渐增加。

3.3 功能改变

变形虫样的小胶质细胞具有吞噬作用,但不具有抗原呈递和炎症的特性。分枝状的小胶质细胞不具有吞噬作用和抗原呈递功能,但能维持免疫稳定的环境。当脑中出现病原体或损伤等炎症情况时,分枝状的小胶质细胞迅速转变为具有完全吞噬形式的活化的小胶质细胞。激活的小胶质细胞分泌促炎介质和神经毒素,导致促炎信号级联扩大^[37]。此外,在CNS发育过程中,变形虫样的小胶质细胞簇积聚在小鼠的脑白质区,这种聚集持续至出生后第14天,此期间为神经元轴突生长、延长和髓鞘形成的活跃时间段。提示变形虫样的小胶质细胞不仅可以吞噬发育过程中死亡的细胞,也可以通过分泌细胞外基质分子(例如血小板反应蛋白)指导轴突的发育^[38-39]。当变形虫样的小胶质细胞分化成分枝状的小胶质细胞时,它们变得不那么活跃,并且逐渐获得成体小胶质细胞的行为和功能。体外培养的成体小胶质细胞可以产生许多物质,如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养因子3(neurotrophin 3, NT3)、白细胞介素1(interleukin 1, IL1)和IL6、M-CSF、G-CSF和TNF-α。小胶质细胞释放的这些因子除了作用于神经系统中的其他细胞群体外(例如NGF和NT3可以促进神经元的存活),还可以调节自身的增殖和功能^[7]。分枝状的小胶质细胞均匀地分布在整个脑实

质中,会分泌一些分子维持自身的稳态和更新,如果没有这些因子,小胶质细胞数量将逐渐减少并引起CNS功能异常^[40]。斑马鱼中,变形虫样的小胶质细胞吞噬活性明显变强,且其溶酶体酸性增强。因此,中性红染色液很容易被摄取,并呈现红色。斑马鱼的中性红信号可反映小胶质细胞的分布、数量乃至其功能^[34]。

4 小胶质细胞发育的分子机制

小胶质细胞起源于原始髓系。调控髓系细胞发育的因子,如PU.1、IRF8、RUNX1等,在小胶质细胞发育中扮演不可或缺的重要角色(图1)。PU.1是ETS转录因子家族的成员,PU.1缺陷的小鼠不仅缺乏循环的单核细胞,也缺乏小胶质细胞。PU.1调控EMP转变为A1状态的小胶质细胞(c-Kit^{lo}卵黄囊细胞)。其他转录因子如RUNX1和IRF8也是小鼠胚胎发育过程中小胶质细胞分化不可缺少的调节因子^[14]。IRF8调控A1态的小胶质细胞向A2态的分化(不成熟的c-Kit^{F4/80^{hi}}CX3CR1⁺卵黄囊细胞)^[41]。RUNX1不仅可以调节髓系细胞分化,还可以调节小胶质细胞增殖和稳态的维持。同时,RUNX1可能调节激活的变形虫样的小胶质细胞向未活化的分枝状的小胶质细胞转化,暗示RUNX1转录因子对小胶质细胞的激活很重要^[42]。

CSF1R是表达在全身单核细胞中的酪氨酸激酶跨膜受体,是单核吞噬细胞存活、分化、发育和趋化性的关键调节因子。Csf1r^{-/-}的小鼠完全缺失小胶质细胞。使用IL-34(一种CSF1R的配体)报告基因小鼠,研究人员确定该细胞因子来源于皮肤中的角质细胞和CNS中的神经元,IL-34缺乏导致皮肤中的朗格汉斯细胞缺失,并且脑中小胶质细胞减少^[43]。同样,缺乏CSF1R衔接蛋白DAP12的小鼠成年期小胶质细胞数量减少^[44]。这些结果表明,CSF1R及其配套信号对组织定居巨噬细胞,尤其是格汉斯细胞和小胶质细胞发育及稳态维持尤其重要。

Oleg Butovsky等^[29]研究了小胶质细胞的分子特征,鉴定了239个基因和8个小RNA,相比髓系细胞和其他免疫细胞,它们在小胶质细胞中特异或高表达。在239个基因中,与星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元相比,有106个基因在小胶质细胞中富集表达。研究者们发现,TGF- β 是小胶质细胞体外发育所必需的并且在TGF- β 1缺陷的小鼠CNS中不

存在小胶质细胞。研究结果还发现,小胶质特异特征基因的表达依赖于TGF- β 信号。TGF- β 及其受体在神经元和神经胶质细胞中低表达,当大量的神经元损伤和衰老期间其表达上调。研究者还观察到小胶质细胞中Tgfb和Tgfb1的高表达。这些结果提示,TGF- β 可能主要通过自分泌的方式作用在小胶质细胞的受体上(图1)。

近来,通过对斑马鱼小胶质细胞发育缺陷的正向遗传筛选相继鉴定了多个调控小胶质细胞发育的重要因子。*fms*(即*Csf1r*斑马鱼直系同源基因)功能丧失的斑马鱼突变体,胚胎期小胶质细胞短暂缺失^[34]。磷酸盐输出蛋白基因*xpr1b*是小胶质细胞发育的重要参与者,*xpr1b*(人类*XPR1*的斑马鱼直系同源基因)编码一种保守的跨膜蛋白,有助于维持细胞磷酸盐的平衡^[45]。*xpr1b*突变体斑马鱼缺乏小胶质细胞,并且还表现出破骨细胞功能缺陷特征的骨硬化表型。进一步研究表明,*xpr1b*通过细胞自主性来调控小胶质细胞发育^[46]。*nlrc3-like*基因也以细胞自主性的方式在小胶质细胞前体中的分化和成熟中发挥作用。在*nlrc3-like*^{-/-}突变体斑马鱼中,原始巨噬细胞在脑外大量聚集却不会迁移到大脑中形成小胶质细胞,且全身的炎症反应过度激活^[47],因此NLRC3-like阻止了不恰当的巨噬细胞激活,从而使得它们可以进入脑中发育为小胶质细胞。这些研究提示,原始巨噬细胞需要调节自身的活化状态以响应发育的信号。*slc7a7*,一种亮氨酸/精氨酸转运蛋白,可以在小胶质细胞前体及成熟的小胶质细胞中表达,是小胶质细胞前体定植大脑所必需的因子之一^[48]。此外,Rag-Ragulator复合物参与小胶质细胞的发育和功能。RagA和Lamtor4是Rag-Ragulator复合物的两个组分,RagA以细胞自主性方式调控小胶质细胞,斑马鱼缺失RagA功能(*rraga*^{-/-})会导致脑中小胶质细胞数量减少,并且小胶质细胞中溶酶体增大,不能及时消化吞入的凋亡神经元^[49]。

5 小胶质细胞的功能

5.1 清除CNS中的凋亡细胞

程序性细胞死亡是许多器官(包括大脑)发育的驱动力^[50-51]。在早期CNS发育期间和成年脑中,小胶质细胞在去除凋亡的神经元中起到重要作用(图2)。研究表明,大脑中积聚的凋亡细胞可能暴露所谓“eat-me”信号,允许吞噬细胞选择性地识别并从组织

中清除这些细胞。已被发现的“eat-me”信号有磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS), 其表达在外翻的凋亡细胞表面, 使得小胶质细胞上特定的吞噬受体和结合蛋白分子与其结合。已经有证据表明, 暴露在小胶质细胞表面的乳脂肪球表皮生长因子8(milk fat globule-EGF factor 8, MFG-E8)直接与PS结合^[52], 并且其表达水平影响小胶质细胞的吞噬行为, 提示MFG-E8对小胶质细胞识别和清除垂死细胞很重要^[53]。最近, 斑马鱼胚胎大脑的活体实时成像揭示小胶质细胞通过向死亡细胞延伸分枝吞噬凋亡神经元。在这些细胞延伸的尖端, 形成大的吞噬体, 并在死亡细胞上逐渐伸展。有证据表明, 表达在小胶质细胞膜上的两种PS受体, 即BAI1和TIM4, 共同调节凋亡细胞的清除。BAI1促进吞噬体的形成, 而TIM4则稳定这些结构, 最有可能是通过允许肌动蛋白在吞噬体周围聚合来实现的^[54]。大脑中凋亡细胞总是被许多有活力的神经元和其他的细胞-细胞连接所包围, 因此凋亡细胞的清除需要释放一些因子, 便于小胶质细胞远程识别并迁移到凋亡细胞处执行吞噬功能^[55-57]。趋化因子CX3CL1已经证明可作为“find-me”信号由凋亡神经元释放, 用乙醇诱导神经元凋亡的实验表明, 可溶性CX3CL1存在于细胞外培养基中, 并且这些凋亡细胞促进了野生型而非*Cx3cr1*敲除的小胶质细胞的吸引^[58]。

由于细胞在被刺激或损伤时释放或泄露ATP, 所以细胞外核苷酸被认为参与小胶质细胞的吞噬事件。小胶质细胞表达几种功能的P2受体, 其中P2X4、P2X7和P2Y12受体已经被发现在小胶质细胞的生理和病理均有作用^[59-61]。此外, 小胶质细胞表达代谢型P2Y6受体, 通过内源性激动剂UDP的激活触发小胶质细胞吞噬作用。在大鼠中系统给予红藻氨酸, 导致海马CA1和CA3区域中神经元细胞死亡时, 观察到小胶质细胞中编码P2y6受体的mRNA水平增加。当神经元受损时, P2Y6受体表达上调, 并且可作为吞噬感应器感测扩散的UDP信号, 这有可能是小胶质细胞P2受体先前未知的病理生理功能^[62]。

5.2 促进神经元的存活

小胶质细胞通过释放支持神经元网络形成的营养因子来帮助完善周围的细胞环境, 促使它们的正常分化和发育(图2)。例如, 周围小胶质细胞释放的胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)促进出生后V层皮层神经元的存活。免疫组

织化学分析显示, 小胶质细胞在出生后早期(出生后第1天至第7天)沿着大脑下和胼胝体的轴突纤维积聚, 表明小胶质细胞可能与这些纤维相互作用并支持这些纤维^[63]。这一假设得到了数据的证实, 小胶质细胞的抑制或消耗促进了V层皮层神经元的死亡。此外小胶质细胞的这种神经支持作用部分是由趋化因子(即CX3CL1-CX3CR1)信号转导和小胶质细胞释放IGF-1介导的, 因为CX3CR1缺失或IGF-1抑制导致类似的V层皮层神经元的死亡。趋化因子信号和IGF-1信号传导之间的机制联系仍不清楚。小胶质细胞分泌的IGF-1能够保护未成熟的少突胶质细胞免于谷氨酸酯介导的细胞凋亡^[64]。小胶质细胞还分泌碱性成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、表皮生长因子、血小板衍生生长因子、神经生长因子和脑源性神经营养因子, 它们维护神经元的发育并终身发挥调控作用^[65-67]。因此小胶质细胞是CNS中神经元存活和正常功能维持的重要守护者。

5.3 调控神经元的活性

在生理条件下, 小胶质细胞大部分时间都处于“静息”状态, 但少部分高度运动的状态表现在几分钟的时间内并不断地“巡查”周围的微环境^[68](图2)。在小鼠视觉皮层中静息的小胶质细胞可以通过其动态过程与树突棘接触^[69-70]。小胶质细胞和突触之间的紧密相互作用意味着可以在这两个细胞之间发生信号传导。眼内注射电压门控钠通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)来下调神经元活性整体, 最终导致小胶质细胞与突触接触的频率显著降低^[70]。海马区域切片结果显示, 通过高频刺激长期增强后, 小胶质细胞运动没有变化^[71]。然而在视觉系统发育的关键时期长期(8~10天)视觉剥夺可影响这种接触频率^[72]。这些研究暗示, 小胶质细胞可能参与健康大脑中神经元活性的稳态调节。Li等^[73]观察斑马鱼幼鱼视顶盖中的小胶质细胞形态和神经元活性, 发现静息态的小胶质细胞不停巡查周围的大脑区域。神经元活性的局部增加刺激静息态小胶质细胞的分枝, 使其与神经元接触形成。小胶质细胞接触形成后, 降低神经元的活性。这一过程需要激活神经元上的pannexin-1半通道, 以及静息态小胶质细胞中小Rho GTP酶rac的激活, 这是一种可能在神经元和小胶质细胞之间通过ATP/P2嘌呤受体信号相连的机制级联。该研究结果揭示了神经元活动对静息态小胶质细胞运动的指导作用, 并提示小胶质细胞在神经

元活性的稳态调节中扮演重要角色。

5.4 调节神经元的突触修剪

小胶质细胞可修剪突触活性的功能已经在小鼠的大脑皮质、海马体和下丘脑中得到证实,它们的突触元件包含物经常存在于吞噬小体中^[74-75](图2)。在发育的关键时期,神经元异常的突触修剪导致未成熟树突棘的突触密度增加^[76],这种现象经常发生在各种发育或遗传紊乱的异常病理状态下,如人类X染色体易损综合征。因此,精确消除发育过程中不需要的突触对机体形成健康的神经回路至关重要。*Schafer*等^[77]研究表明,在小鼠视觉皮层发育的修剪过程中,小胶质细胞吞噬了外侧膝状核中视网膜神经节细胞的突触。*Paolicelli*等^[78]证明,在CNS发育过程中小胶质细胞有助于突触修剪。在他们的研究中,PSD95(突触后组分)或SNAP25(突触前组分)与小鼠中GFP标记的小胶质细胞共定位,表明小胶质细胞吞噬突触成分;并且小胶质细胞中吞噬小体中含有超微结构的突触特征,因此树突棘的小胶质细胞吞噬作用可能在正常衰老和整个成年期持续存在^[79]。

C1q配体通过绑定抗体触发补体激活,其定位在视网膜的突触上。C1q和CR3受体敲除的突变体小鼠的视网膜突触的修剪过程表现出明显缺陷^[80]。唾液酸通常暴露在神经元的外膜上,可能在小胶质细胞的突触修剪与补体系统间构成联系。此外,在没有C3或CR3的小鼠中,小胶质细胞的突触修剪作用显著减少,导致突触密度增加,视觉特异轴突投射到视网膜核的分离发生缺陷^[81]。同时,体外神经元和小胶质细胞共培养实验也证实了CR3依赖的突触吞噬。因此,小胶质细胞通过趋化因子/趋化因子受体和经典补体级联对突触修剪、神经网络结构重塑发挥重要作用。

近来,*Parkhurst*等^[82]发现,缺乏小胶质细胞的小鼠在多项学习任务中表现出缺陷,并且运动学习依赖的突触形成显著减少。此外,研究者利用*CX3CR1^{CreER}*小鼠去除小胶质细胞中脑源性神经营养因子(BDNF)在很大程度上重复了小胶质细胞耗竭的小鼠表型。小胶质细胞的BDNF增加了神经元原肌球蛋白相关激酶受体B磷酸化,这是突触可塑性的关键介质。他们的研究结果揭示了小胶质细胞通过BDNF信号促进学习相关的突触形成,从而在学习和记忆中发挥重要的生理功能。

5.5 促进神经损伤的修复

小胶质细胞在响应CNS损伤方面发挥重要作用,主要参与受损组织的清除、感染的抵抗和组织稳态的恢复等(图2)。受损神经元和星形胶质细胞刺激小胶质细胞产生促炎细胞因子,如IL1、IL6和TNF- α ,以及抗炎细胞因子,如IL4、IL10和TGF- β 。活化的小胶质细胞招募外周血来源的免疫细胞渗入受损区域并引发炎症反应。这导致细胞因子和趋化因子进一步释放,从而激活小胶质细胞以清除受损组织并调控神经元修复^[83-85]。研究发现,巨噬细胞通过小胶质细胞激活渗入受损大脑,其数量在损伤后24小时内剧烈增加,随后迅速下降。相比之下,小胶质细胞数量在损伤后的第一周逐渐增加。有趣的是,小胶质细胞数量在晚期(损伤后3周)出现第二个高峰。此外,M2型小胶质细胞数量在脑损伤后1周增加,M1型细胞在脑损伤后4周增加^[86-87]。病理条件下,小胶质细胞被来自受损神经元和星形胶质细胞释放的ATP、谷氨酸、一氧化氮(NO)、生长因子和细胞因子激活后,在受损部位引发早期反应。局部受损部位和星形胶质细胞通过连接蛋白通道释放的ATP激活小胶质细胞中的G蛋白偶联的P2Y受体,促使其对损伤快速反应^[88]。一些研究表明,在受损的CNS中,外向钾电流、整合素 β 1、磷酸肌醇3-激酶和Akt信号途径也参与小胶质细胞的运动^[89]。越来越多的证据表明,活化的小胶质细胞对损伤后的中枢神经系统修复有促进作用。然而,这些研究大多使用原代培养的小胶质细胞,需要更精确的在体数据检验。总之,更好地了解小胶质细胞对神经修复的影响,将有助于制定治疗策略,提高中枢神经系统损伤后的功能恢复。

6 展望

虽然距离小胶质细胞发现已超过了100年,我们对小胶质细胞的认知仍不充分。关于小胶质细胞的起源仍存在着争论,这些争论是物种特异性的,还是受限于当下的技术,仍需要进一步探讨。近来,随着光学、热学和单细胞组学等技术的发展,通过结合DNA条形码、高分辨显微成像、单细胞测序、光遗传学和热遗传学等手段,开发构建单细胞谱系示踪数学模型和实时追踪电脑模拟,进而发展细胞标记和谱系示踪的新方法和新技术正渐渐成为可能。这些新方法和技术将有助于最终解析小胶质细胞的

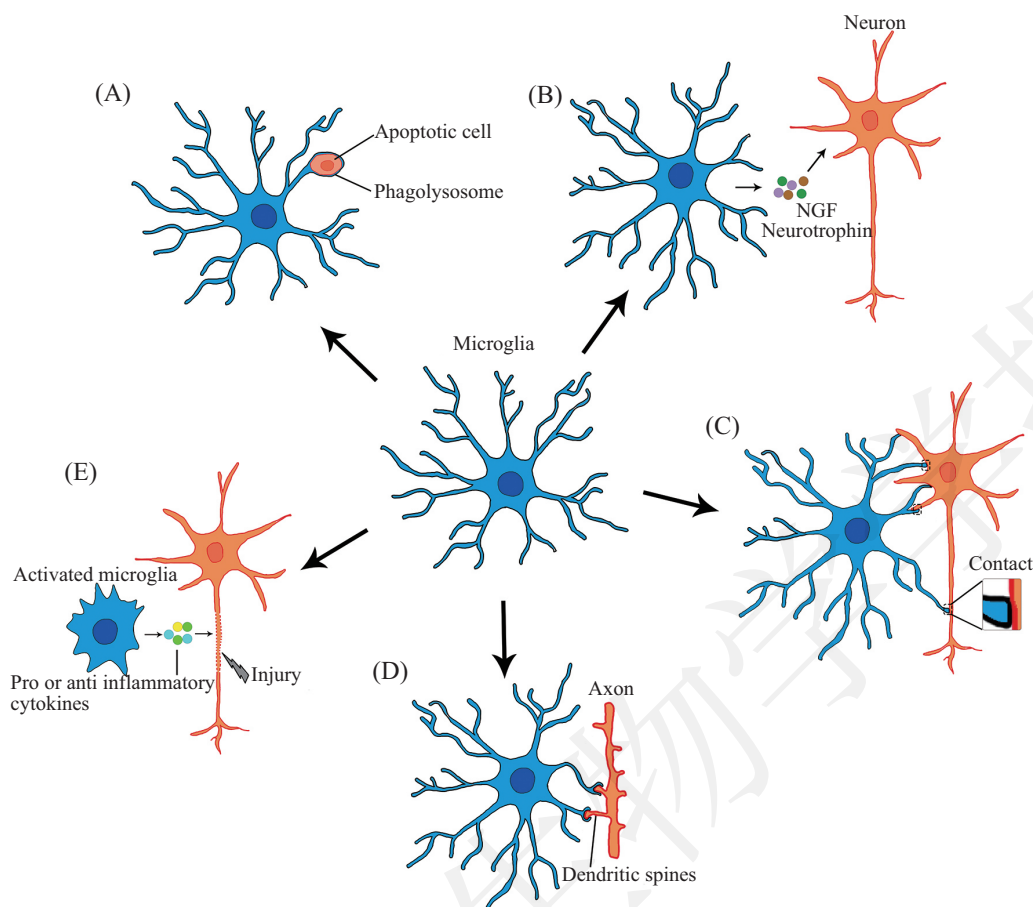


图2 小胶质细胞的功能

Fig.2 The functions of microglia

来源。对于小胶质细胞发育的分子机理,尤其是脑微环境细胞与定植与脑中的巨噬细胞前体细胞对话,进而驯化这些细胞发育成为小胶质细胞的分子机制仍不清晰。虽然TGF- β 是被发现的微环境驯化小胶质细胞的重要因子,但关于TGF- β 的来源仍不清晰。同时,脑微环境细胞成分复杂,不同类型不同发育阶段的脑微环境细胞,如神经元和胶质细胞等,是否在小胶质细胞发育中起作用,以及起着怎样的作用仍不清楚。脑中的小胶质细胞在不同发育阶段不同脑区是否存在着不同的亚群,不同亚群之间的区别与联系如何,对不同脑微环境细胞尤其是不同类型的神经元以及相关疾病的发生发展进程中起着怎样的调节作用仍悬而未决。在未来的研究中,综合利用组学分析手段,结合传统的分子生物学、遗传学等方法,在不同模式动物中深入解析小胶质细胞的发育调控机制,尤其是表观遗传调控机理,正变得越来越被关注,这些都将有助于阐明小胶质细胞发育的综合调控网络。与此同时,结合各种神经发

育和退行性相关疾病的临床病例和疾病动物模型,深入解析小胶质细胞对于疾病发生的调控机理,将有助于探讨利用小胶质细胞作为治疗靶标或药物递送载体的可行性。

参考文献 (References)

- 1 Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 2013; 7(2): 45.
- 2 Rio-Hortega PD. The microglia. *Lancet* 1939; 233(6036): 1023-6.
- 3 Barron KD. The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 1995; 134: 57-68.
- 4 Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992; 48(2): 405.
- 5 Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflamm* 2004; 1(1): 14.
- 6 Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 2010; 58(3): 253-63.
- 7 Cuadros MA, Navascués J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 1998; 56(2): 173-89.

- 8 Kaur C, Hao A, Wu C, Ling E. Origin of microglia. *Microsc Res Techniq* 2001; 54(1): 2-9.
- 9 Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 4080-5.
- 10 Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* 1986; 239(4837): 290-92.
- 11 Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 2004; 18(9): 998-1000.
- 12 Cronk JC, Filiano AJ, Louveau A, Marin I, Marsh R, Ji E, *et al.* Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J Exp Med* 2018; 215(6): 1627-47.
- 13 Casano AM, Peri F. Microglia: multitasking specialists of the brain. *Dev Cell* 2015; 32(4): 469-77.
- 14 Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 2013; 16(3): 273-80.
- 15 Xu J, Zhu L, He S, Wu Y, Jin W, Yu T, *et al.* Temporal-spatial resolution fate mapping reveals distinct origins for embryonic and adult microglia in zebrafish. *Dev Cell* 2015; 34(6): 632-41.
- 16 Cuadros MA, Navascués J. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors *Prog Brain Res* 2001; 132: 51-9.
- 17 Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J Immunol* 1986; 137(11): 3521-7.
- 18 Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL. Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res* 2015; 61(1): 10-20.
- 19 Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia *in vitro*. *J Neuroimmunol* 1990; 30(2): 111-20.
- 20 Brockhaus J, M Ller T, Kettenmann H. Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 2015; 16(1): 81-90.
- 21 Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukocyte Biol* 2009; 85(3): 352-70.
- 22 Koushik SV, Wang J, Rogers R, Moskopidhis D, Lambert NA, Creazzo TL, *et al.* Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger(Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. *FASEB J* 2001; 15(7): 1209-11.
- 23 Xu J, Wang T, Wu Y, Jin W, Wen Z. Microglia colonization of developing zebrafish midbrain is promoted by apoptotic neuron and lysophosphatidylcholine. *Dev Cell* 2016; 38(2): 214-22.
- 24 Elmore MP, Najafi A, Koike M, Dagher N, Spangenberg E, Rice R, *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 2014; 82(2): 380-97.
- 25 Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 775-87.
- 26 Wu S, Xue R, Hassan S, Nguyen TML, Wang T, Pan H, *et al.* IL34-Csf1r pathway regulates the migration and colonization of microglial precursors. *Dev Cell* 2018; 46(5): 552-63.
- 27 Melanie G, Miriam M. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 2012; 61(1): 121-7.
- 28 Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, *et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(12): E1738.
- 29 Oleg B, Jedrychowski MP, Moore CS, Ron C, Lanser AJ, Galina G, *et al.* Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014; 17(1): 131-43.
- 30 Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, *et al.* Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 2010; 141(5): 775-85.
- 31 Horwath E, Weissman MM. The epidemiology and cross-national presentation of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2000; 23(3): 493-507.
- 32 Babin PJ, Thisse C, Durliat M, Andre M, Akimenko M, Thisse B. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(16): 8622-7.
- 33 Peri F, Nüsslein-Volhard C. Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion *in vivo*. *Cell* 2008; 133(5): 916-27.
- 34 Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 2001; 238(2): 274-88.
- 35 Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marin-Teva JL, Cuadros MA. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 1995; 354(2): 209-28.
- 36 Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 2015; 22(1): 31-52.
- 37 Cai Z, Delwar HM, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and A β in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2013; 124(5): 307-21.
- 38 Chamak B, Morandi V, Mallat M. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* 1994; 38(2): 221-33.
- 39 Chamak B, Dobberty A, Mallat M. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 1995; 69(1): 177-87.
- 40 Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014; 32(1): 367-402.
- 41 Masuda T, Prinz M. Microglia: a unique versatile cell in the central nervous system. *ACS Chem Neurosci* 2016; 7(4): 428-34.
- 42 Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S. Regulation of postnatal forebrain ameboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci* 2012; 32(33): 11285-98.
- 43 Yaming W, Szretter KJ, William V, Susan G, Cristina R, Marina C, *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 2012; 13(8): 753.

- 44 Otero K, Turnbull IR, Poliani PL, Vermi W, Cerutti E, Aoshi T, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and β -catenin. *Nat Immunol* 2009; 10(7): 734-43.
- 45 Giovannini D, Touhami J, Charnet P, Sitbon M, Battini JL. Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell Rep* 2013; 3(6): 1866-73.
- 46 Meireles AM, Shiau CE, Guenther CA, Sidik H, Kingsley DM, Talbot WS. The phosphate exporter xpr1b is required for differentiation of tissue-resident macrophages. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1659-67.
- 47 Shiau CE, Monk KR, Joo W, Talbot WS. An anti-inflammatory NOD-like receptor is required for microglia development. *Cell Rep* 2013; 5(5): 1342-52.
- 48 Rossi F, Casano AM, Henke K, Richter K, Peri F. The SLC7A7 transporter identifies microglial precursors prior to entry into the brain. *Cell Rep* 2015; 11(7): 1008-17.
- 49 Shen K, Sidik H, Talbot WS. The Rag-regulator complex regulates lysosome function and phagocytic flux in microglia. *Cell Rep* 2016; 14(3): 547-59.
- 50 Dekkers MPJ, Vassiliki N, Yves-Alain B. Cell biology in neuroscience: death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. *J Cell Biol* 2013; 203(3): 385-93.
- 51 Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in neural development and disease. *Archives of Disease in Childhood Fetal & Neonatal Edition* 1997; 77(3): 165-70.
- 52 Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002; 417(6885): 182-7.
- 53 Yong L, Xuesen Y, Chenying G, Pan N, Yan L, Jie M. Essential role of MFG-E8 for phagocytic properties of microglial cells. *PLoS One* 2013; 8(2): e55754.
- 54 Mazaheri F, Breus O, Durdu S, Haas P, Wittbrodt J, Gilmour D, *et al.* Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat Commun* 2014; 5(5): 4046.
- 55 Will W, Antonio J. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2007; 8(7): 542-51.
- 56 Philipp N, Clemens G, A Thomas L, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009; 459(7249): 996-9.
- 57 Severina M, Brian S, Iwan E, Will W, Paul M. Prioritization of competing damage and developmental signals by migrating macrophages in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol CB* 2010; 20(5): 464-70.
- 58 Sokolowski JD, Chabanon-Hicks CN, Han CZ, Heffron DS, Mandell JW. Fractalkine is a "find-me" signal released by neurons undergoing ethanol-induced apoptosis. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 360.
- 59 Makoto T, Yukari SM, Schuichi K, Akito M, Shinichi K, Salter MW, *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424(6950): 778-83.
- 60 Tomohisa S, Izumi H, Katsutoshi I, Shinichi K, Kazuhide I, Yoshihiro N. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 2004; 24(1): 1-7.
- 61 Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21(6): 1975-82.
- 62 Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 2007; 446(7139): 1091-5.
- 63 Masaki U, Yuki F, Tatsuhide T, Yuka N, Junichi K, Masaru I, *et al.* Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 2013; 16(5): 543-51.
- 64 Ness JK, Wood TL. Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 2002; 20(3): 476-88.
- 65 Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* 2011; 7(1): 99-108.
- 66 Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 2010; 65(4): 322-31.
- 67 Yamagata T, Muroya K, Mukasa T, Igarashi H, Momoi M, Tsukahara T, *et al.* Hepatocyte growth factor specifically expressed in microglia activated Ras in the neurons, similar to the action of neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210(1): 231-7.
- 68 Axel N, Frank K, Fritjof H. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005; 308(5726): 1314-18.
- 69 Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience [Journal Article; Research Support, N.I.H., Extramural; Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLOS BIOL* 2010; 8(11): e1000527. eng.
- 70 Hiroaki W, Moorhouse AJ, Shozo J, Shinichi K, Junichi N. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009; 29(13): 3974-80.
- 71 Long-Jun W, Min Z. Resting microglial motility is independent of synaptic plasticity in mammalian brain. *J Neurophysiol* 2008; 99(4): 2026-32.
- 72 Tremblay M, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 2010; 8(11): e1000527.
- 73 Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity *in vivo*. *Dev Cell* 2012; 23(6): 1189-202.
- 74 Paolicelli RC, Giulia B, Francesca P, Laura M, Maria S, Patrizia P, *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333(6048): 1456-58.
- 75 Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Ryuta K, Mardinly AR, Ryo Y, *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012; 74(4): 691-705.
- 76 Low LK, Hwai-Jong C. Axon pruning: an essential step underlying the developmental plasticity of neuronal connections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1473): 1531-44.
- 77 Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Ryuta K, Mardinly

- AR, Ryo Y, *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012; 74(4): 691-705.
- 78 Paolicelli RC, Giulia B, Francesca P, Laura M, Maria S, Patrizia P, *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333(6048): 1456-8.
- 79 Tremblay MÈ, Zettel ML, Ison JR, Allen PD, Majewska AK. Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 2012; 60(4): 541-58.
- 80 Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007; 131(6): 1164-78.
- 81 Bettina L, Jens K, Tenner AJ, Harald N. Sialic acid on the neuronal glycocalyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *J Neurosci* 2012; 32(3): 946-52.
- 82 Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; 155(7): 1596-609.
- 83 Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, *et al.* Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflamm* 2012; 9(1): 65.
- 84 Fenn AM, Hall JCE, Gensel JC, Popovich PG, Godbout JP. IL-4 signaling drives a unique arginase⁺/IL-1β⁺ microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4Rα after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2014; 34(26): 8904-17.
- 85 Park KW, Lee HG, Jin BK, Yong BL. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex *in vivo*. *Exp Mol Med* 2007; 39(6): 812-19.
- 86 Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One* 2012; 7(7): e41892.
- 87 Nguyen HX, Beck KD, Anderson AJ. Quantitative assessment of immune cells in the injured spinal cord tissue by flow cytometry: a novel use for a cell purification method. *J Visual Exp* 2011; (50): e2698.
- 88 Dimitrios D, Jaime G, Guang Y, Kim JV, Yi Z, Steffen J, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 2005; 8(6): 752-58.
- 89 Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem* 2016; 159(5): 491-6.