

1-磷酸鞘氨醇及受体 1 在小鼠肺缺血再灌注损伤中的表达变化和意义

祝卿¹, 周文琴¹, 万里^{2△}, 金资源³, 张学湖³, 林丽娜³

1. 四川大学华西第二医院 麻醉科 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041);

2. 四川大学华西第二医院 产科 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(成都 610041);

3. 温州医科大学附属第一医院 麻醉科(温州 325000)

【摘要】目的 探讨 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)及其受体 1(S1PR1)在肺缺血再灌注损伤(PIRI)肺组织中的表达变化及意义。**方法** 采用无损伤血管夹阻断小鼠左主支气管、左肺静脉和左肺动脉缺血 30 min, 松开血管夹, 接受再灌注 2 h, 制作小鼠 PIRI 模型($n=8$), 同时设正常对照组($n=8$)和假手术组($n=8$), 3 组小鼠均处死后取肺组织。根据肺组织 HE 染色、湿/干质量比结果论证模型制作情况。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测肺组织中生成 S1P 的关键限速酶鞘氨醇激酶-1(*SphK1*)及 S1PR1 mRNA 表达变化; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测肺组织中 S1P 及 S1PR1 蛋白含量的变化。**结果** 与正常对照组和假手术组比较, 缺血再灌注可导致肺组织病理评分升高, 肺干/湿质量比增高, 肺组织 *SphK1* 和 S1PR1 mRNA 表达升高($P<0.05$), 肺组织中 S1P、S1PR1 蛋白含量均明显增加($P<0.05$)。**结论** PIRI 后, 肺组织中 S1P 及 S1PR1 的表达升高, 提示 S1P/S1PR1 信号通路参与了 PIRI 的病理生理改变过程, 可能是 PIRI 潜在的治疗靶点。

【关键词】 1-磷酸鞘氨醇 1-磷酸鞘氨醇受体 1 肺缺血再灌注

The Expression of Sphingosine-1-phosphate and Sphingosine-1-phosphate Receptor 1 in Mouse Model of Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury ZHU Qing¹, ZHOU Wen-qin¹, WAN Li^{2△}, JIN Zi-yuan³, ZHANG Xue-hu³, LIN Li-na³. 1. Department of Anesthesiology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education (Sichuan University), Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education (Sichuan University), Chengdu 610041, China; 3. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

△ Corresponding author, E-mail: wlannie1202@163.com

【Abstract】Objective To investigate the expressions of sphingosine 1-phosphate (S1P) and S1P G-protein-coupled receptor 1 (S1PR1) in pulmonary ischemia reperfusion injury (PIRI) tissues and explore their relationship. **Methods** The model of PIRI was established *in vivo* male C57BL/6 mice ($n=8$). The left pulmonary hilum was occluded for 30 min with a microvascular clamp through a left thoracotomy. Reperfusion began with removal of the clamp. Normal group ($n=8$) and sham group ($n=8$) were set as control. The hematoxylin and eosin (HE) staining of ultrastructural changes and wet-to-dry mass ratio in lung tissues were measured for judging the succeed model. The mRNA expressions of sphingosine kinase 1 (*SphK1*) and S1PR1 were determined by real-time PCR, and ELISA was used to detect the concentrations of S1P and S1PR1 in the lung tissues. **Results** The mRNA expressions of *SphK1*, S1PR1 and the concentrations of S1P and S1PR1 and wet-to-dry mass ratio of the lung tissues in ischemia-reperfusion mice were higher than those normal mice and sham operation mice ($P<0.05$). **Conclusion** The increased expressions of S1P and S1PR1 in lung tissues after PIRI suggest that the S1P/S1PR1 signal pathway is involved in the pathophysiological process of PIRI, and may be a potential therapeutic target for it.

【Key words】 S1P S1PR Pulmonary ischemia reperfusion

肺缺血再灌注损伤(PIRI)可导致肺顺应性下降、氧弥散障碍, 最终发展为呼吸衰竭^[1], 常发生在肺移植术、肺栓塞、体外循环、心肺复苏等多种临床

情况下。肺移植术中, PIRI 会诱发急性/慢性免疫排斥反应、原发性肺功能延迟恢复、移植肺功能不全等, 是影响移植肺存活及患者转归的重要因素^[2]。目前针对 PIRI 仍缺乏行之有效的干预措施。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)

作为一种具有重要生物学活性的天然溶血磷脂,广泛存在于真核细胞内,并以自分泌或旁分泌形式释放到组织液及外周循环中^[3]。S1P 主要通过与其细胞膜表面相应的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)结合,发挥第一信使的功能,对细胞增殖、分化、黏附、迁移等许多生理活动起着调控作用^[4-5]。现有研究表明, S1P 对多种肺部疾病(哮喘、慢性阻塞型肺疾病、肺纤维化)的病理生理改变也发挥了重要调控作用^[6]。但对于缺血再灌注后,肺组织中的 S1P 如何参与到肺损伤的进程中,目前尚不明确。因此本研究拟通过观察小鼠肺组织中 S1P 及其受体(S1PR1)在缺血再灌注后的表达变化,为后期更为深入的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,购于上海实验动物研究中心。清洁级饲养条件,小鼠自由摄食、饮水,12 h 光照,8~10 周龄,体质量 23~25 g。

1.2 小鼠肺缺血再灌注损伤模型制备及实验分组

将 24 只小鼠随机分为正常对照组、假手术组和 PIRI 模型组,每组 8 只。PIRI 模型组小鼠参照 ZANOTTI 等^[7]描述的方法制备 PIRI 模型:经氯胺酮(0.1 mg/g)加赛拉嗪(0.01 mg/g)腹腔内注射麻醉后(实验过程中每小时给予首剂药量的 1/3 维持麻醉),行气管切开置管术,接小动物呼吸机行机械通气维持呼吸,潮气量 0.4~0.6 mL,呼吸频率 120 min⁻¹,吸/呼比 0.4。经尾静脉注射普通肝素(20 U/kg)后,由左侧胸腔第 3~4 肋间开胸,寻找左肺门,采用无损伤血管夹阻断左主支气管、左肺静脉和左肺动脉。阻断 30 min 后松开血管夹,进行再灌注 2 h。整个实验过程中采用恒温加热垫保温。制模成功后(即左肺缺血 30 min 再灌注 2 h),处死动物,留取左肺用于后续实验检测。假手术组:仅行气管切开机械通气,机械通气参数与 PIRI 模型组相同,不接受缺血再灌注,行机械通气 2 h 30 min 后留取组织标本。正常对照组:小鼠麻醉后直接取肺标本。

1.3 肺组织湿/干质量比测定

小鼠左肺组织滤纸吸干表面附着水分,用分析天平准确测量湿肺质量并记录,于 60 ℃ 恒温箱烘烤 48 h 至肺干重恒定,测得肺组织干重,计算肺组织湿/干质量比,以评估肺水肿的严重程度。

1.4 肺组织损伤评分

取小鼠左肺组织在体积分数为 10% 甲醛中固定 24 h。经组织脱水机处理后,石蜡包埋,连续切片,按标准石蜡切片 HE 染色法进行染色。用光学显微镜观察并摄片。每张肺组织切片根据 NISHINA 等^[8]描述的方法进行双盲评估。通过 HE 染色观察肺切片中病理形态学改变(是否有中性粒细胞浸润/渗出至肺泡、肺组织充血/出血、肺泡壁受损等),肺损伤程度记分方法:0 分为最轻,1 分为轻度,2 分为中等,3 分为严重,4 分为最严重。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测小鼠肺组织中鞘氨醇激酶-1(*SphK1*)和 *S1PR1* mRNA 表达水平

引物(Primer Premier 5.0 软件设计)由生工生物工程(上海)有限公司提供。*SphK1*, F: 5'-GATCCTCACCGAACGGAAGAAC-3', R: 5'-TTAGCCATTCACCACCTCAT-3', 扩增产物 183 bp; *S1PR1*, F: 5'-TTCTCACCTGTCTCCCCTTAC-3', R: 5'-GCCTACCAAATTCCCAACAAC-3', 扩增产物 122 bp; 内参基因 *GAPDH*: F: 5'-GGTGTCTCTCTGCGACTTCA-3', R: 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3', 扩增产物 186 bp。在 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪中进行扩增反应。扩增体系: EVaGreen qPCR Master Mix (2 ×) 10 μL, 引物 F (10 μmol/L) 1 μL, 引物 R (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 7 μL, Template (cDNA) 1 μL。扩增条件: 95 ℃ 预变性 10 min 后, 40 个循环: 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 1 min; 最后进入熔解曲线步骤, 记录 Ct 值。通过将目的基因 Ct 值与内参 *GAPDH* 相比, 计算后获得 2^{-ΔΔCt} 值, 进行量化分析。

1.6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测肺组织中 S1P 及 S1PR1 蛋白的变化

肺组织进行匀浆后,按照 ELISA 试剂盒(生产厂家: LifeSpan BioSciences, 由上海西唐生物科技有限公司提供)说明书操作。30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。采用 ELISA Calc 回归/拟合软件计算组织中 S1P 及 S1PR1 质量浓度。

1.7 统计学方法

肺组织损伤评分采用中位数(最小值~最大值)表示,其余计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析;肺组织损伤评分比较应用 Kruskal-Wallis 和检验分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PIRI 小鼠肺组织形态学及肺损伤指标的变化

在制备 PIRI 模型过程中可见：缺血期，模型组左肺呈暗红色，表面粗糙不平滑、体积缩小、膨胀不均；再灌注期，模型组左肺有明显出血灶。正常对照组肺组织呈淡粉红色，肺质地均匀、表面平整。假手术组与正常对照组比较，无明显变化。左肺组织切片 HE 染色光学显微镜下观察：正常对照组肺泡壁结构完整，无炎性细胞浸润；假手术组与正常对照组相比无明显改变，偶可见肺小血管轻度充血及灶性

出血；而 PIRI 小鼠，左肺肺泡间隔增宽，肺泡腔内可见浆液性渗出物，肺泡腔与间质内出现中性粒细胞浸润，部分肺泡结构破坏(图 1)。并且与正常对照组比较，PIRI 小鼠肺湿/干质量比增高，同时肺损伤病理评分也升高($P<0.05$)。而假手术组无明显改变(附表)。说明 PIRI 模型制作成功。

2.2 PIRI 小鼠肺组织中 S1P/S1PR1 的表达变化

结果见图 2、图 3。Real-time PCR 结果显示：与

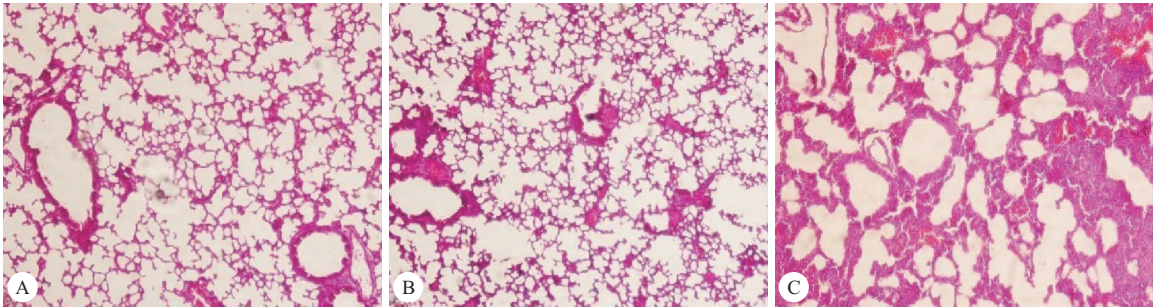


图 1 HE 染色观察小鼠肺组织的病理形态学变化。×100

Fig 1 Pulmonary histopathologic changes in mice observed by HE staining. ×100

A: Normal group; B: Sham group; C: PIRI group

附表 小鼠肺湿/干质量比及肺组织损伤评分

Table Wet-to-dry mass ratio (W/D) and pathological score of lung tissues

Item	Normal group (n=8)	Sham group (n=8)	PIRI group (n=8)
W/D	3.96±0.18	4.07±0.17	6.91±0.43 *
Pathological score [median (range)]	0 (0-1)	0.5 (0-1)	3 (3-4) *

* $P<0.05$, vs. normal group

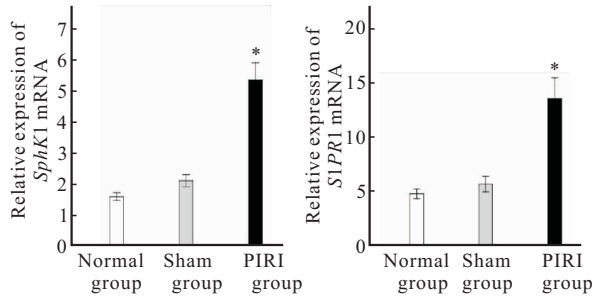


图 2 小鼠肺组织 S1PR1 和 SphK1 基因定量结果

Fig 2 Expressions of S1PR1 and SphK1 mRNAs of lung tissues in mice

* $P<0.05$, vs. normal group

正常对照组和假手术组相比，PIRI 模型组 *SphK1* 和 *S1PR1* mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。同时，ELISA 检测结果也提示，与正常对照组和假手术组相比，上述指标均 PIRI 小鼠肺组织中 S1P、S1PR1 蛋白质量浓度上升($P<0.05$)。而假手术组与正常对照组相比，未见明显差异。

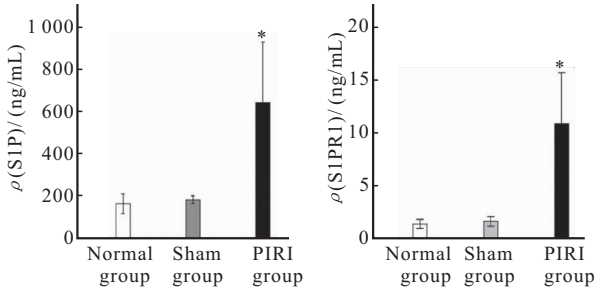


图 3 小鼠肺组织中 S1P 和 S1PR1 蛋白的表达

Fig 3 Expressions of S1P and S1PR1 proteins of lung tissues in mice

* $P<0.05$, vs. normal group

3 讨论

鞘氨醇来源于细胞膜脂质结构的重要组成成分鞘脂，它在鞘氨醇激酶的作用下转化为 S1P^[5]。在机体内几乎所有细胞都能合成 S1P，作为一种具有天然生物活性的膜磷脂代谢产物，S1P 主要与其特异受体(S1PR1~S1PR5)结合，启动细胞跨膜信号转导。同时，S1PR 与不同的异源三聚体 G 蛋白相偶联(包括 G_q、G_i 和 G_{12/13})，通过激活磷脂酶 C (PLC)、Ras 和 Rho 家族小 G 蛋白等，对细胞内多个信号传导通路进行调节，介导了广泛的生物学效应^[9-10]。生理状态下，S1P 可促进细胞有丝分裂、抑制细胞的凋亡、调节细胞间黏附作用等。近年来

的研究揭示,S1P 由于具有多种生物学效应,已成为器官再灌注损伤保护研究的热点^[11]。由于器官缺血再灌注损伤的发病机制涉及炎性介质释放、中性粒细胞活化、细胞凋亡等^[2],而上述病理生理的改变可导致呼吸膜的损伤,从而出现屏障功能受损、通透性增高,成为肺损伤重要的发病学基础^[12]。而 S1P 通过维持内皮屏障稳定,降低血管通透性^[13-15],有望成为 PIRI 的重要调控靶标。

本研究通过无损伤血管夹阻断左肺门成功建立 PIRI 小鼠在体模型,此种造模方法简便易行,能尽量避免组织损伤对实验结果产生影响。假手术组与正常对照组相比,肺组织无显著改变,说明我们采用的机械通气模式未引发明显肺损伤。当小鼠肺缺血 30 min 再灌注 2 h 后,*SphK1* 的 mRNA 表达水平较正常对照组明显上调。由于 *SphK1* 是肺组织中合成 S1P 的主要限速酶^[16],决定 S1P 的生成速率。因此,其表达的提升将加快 S1P 在肺组织中的生成。同时 S1P 膜受体 *S1PR1* 的 mRNA 表达水平也显著增强。并且 ELISA 检测结果进一步证实,PIRI 小鼠肺组织中 S1P、*S1PR1* 蛋白的表达水平高于正常对照组($P < 0.05$)。而假手术组 S1P、*S1PR1* 的表达水平却未见明显改变。这表明,缺血再灌注后,S1P/*S1PR1* 信号通路被激活。S1P 表达的增加可能是机体对 PIRI 的代偿性反应;同时由于 S1P 的膜受体家族 *S1PR1* 的表达水平也明显上调,而 S1P 作为配体通过与该受体系统结合发挥重要的生物学作用,所以 S1P/*S1PR1* 信号通路不仅参与到了 PIRI 的病理生理改变过程中,很可能对 PIRI 存在保护作用。在后续研究中,可就 S1P/*S1PR1* 在 PIRI 进程中的作用地位及作用机制进行更深入的论证,为 PIRI 的防治提供崭新的研究视角。

参 考 文 献

- [1] DE PERROT M, LIU M, WADDELL TK, *et al.* Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003,167(4):490-511.
- [2] OVECHKIN AV, LOMINADZE D, SEDORIS KC, *et al.* Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*, 2007,113(1):1-12.
- [3] ALVAREZ SE, MILSTIEN S, SPIEGEL S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab*, 2007,18(8):300-307.
- [4] PATWARDHAN GA, LIU YY. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res*, 2011,50(1):104-114.
- [5] SPIEGEL S, MILSTIEN S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003,4(5):397-407.
- [6] EBENEZER DL, FU P, NATARAJAN V. Targeting sphingosine-1-phosphate signaling in lung diseases. *Pharmacol Ther*, 2016,168:143-157.
- [7] ZANOTTI G, CASIRAGHI M, ABANO JB, *et al.* Novel critical role of Toll-like receptor 4 in lung ischemia-reperfusion injury and edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009,297(1):L52-L63.
- [8] NISHINA K, MIKAWA K, TAKAO Y, *et al.* ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Anesth Analg*, 1997,84(5):1097-1103.
- [9] TAKABE K, PAUGH SW, MILSTIEN S, *et al.* "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*, 2008,60(2):181-195.
- [10] STRUB GM, MACEYKA M, HAIT NC, *et al.* Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*, 2010,688:141-155.
- [11] EGOM EE, KE Y, SOLARO RJ, *et al.* Cardioprotection in ischemia/reperfusion injury: spotlight on sphingosine-1-phosphate and bradykinin signalling. *Prog Biophys Mol Biol*, 2010,103(1):142-147.
- [12] LUCAS R, VERIN AD, BLACK SM, *et al.* Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochem Pharmacol*, 2009,77(12):1763-1772.
- [13] MIZUGISHI K, YAMASHITA T, OLIVERA A, *et al.* Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*, 2005,25(24):11113-11121.
- [14] WANG L, DUDEK SM. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc Res*, 2009,77(1):39-45.
- [15] DIAB KJ, ADAMOWICZ JJ, KAMOCKI K, *et al.* Stimulation of sphingosine 1-phosphate signaling as an alveolar cell survival strategy in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010,181(4):344-352.
- [16] MELENDEZ AJ, CARLOS-DIAS E, GOSINK M, *et al.* Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene*, 2000,251(1):19-26.

(2018-04-25 收稿,2018-07-03 修回)

编辑 汤 洁