

1-磷酸鞘氨醇受体 2 抑制小鼠血管通透性研究*

李晓莞¹, 李秀国¹, 多久和阳², 崔弘^{1△}

1. 延边大学医学院 机能学实验中心(延吉 133002); 2. 日本金泽大学医学部 生理学教室(金泽 920-8640)

【摘要】 目的 研究 1-磷酸鞘氨醇受体 2(S1PR2)对小鼠血管通透性的作用。方法 将野生鼠和 S1pr2^{-/-}鼠(S1PR2 基因缺乏)气管内滴注脂多糖(LPS)制备急性肺损伤模型(LPS组),以气管内滴注生理盐水为对照。通过检测肺伊文思蓝色素漏出,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖肺血管渗漏,以及肺组织湿质量/干质量比值,观察 S1PR2 对血管通透性的影响,并通过 Miles 分析,观察血管内皮细胞生长因子(VEGF)对皮肤血管内皮通透性亢进反应。结果 与生理盐水组比较,LPS 注射增加野生鼠和 S1pr2^{-/-}鼠伊文思蓝漏出(P 均 <0.01)、FITC 标记葡聚糖肺血管外漏出(P 均 <0.01)和引起肺水肿。LPS 组中 S1pr2^{-/-}鼠与野生鼠比较,伊文思蓝漏出量、FITC 标记葡聚糖肺血管外漏出更多(P 均 <0.01),肺水肿更重($P<0.001$);LPS 组野生型和 S1pr2^{-/-}鼠均增加 VEGF 剂量依赖性的伊文思蓝漏出,在 50、100 ng 的 VEGF 诱导下,与野生鼠比较,S1pr2^{-/-}鼠伊文思蓝漏出量均较高(P 均 <0.01)。结论 S1PR2 参与内皮细胞屏障保护,抑制血管通透性。

【关键词】 1-磷酸鞘氨醇 1-磷酸鞘氨醇受体 2 血管通透性 小鼠

Inhibitory Effects of Sphingosine-1-phosphate Receptor-2 on Vascular Permeability in Mice LI Xiao-wan¹, LI Xiu-guo¹, TAKUWA Yoh², CUI Hong^{1△}. 1. *Experimental Center of Functional Science, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China;* 2. *Department of Physiology, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8640, Japan*

△ Corresponding author, E-mail: cuihong@ybu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the effect of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) on vascular permeability in mice. **Methods** Acute lung injury models of mice were constructed with intra-tracheal administration of lipopolysaccharide (LPS) and compared with the controls with intra-tracheal administration of saline. The effect of S1PR2 on vascular permeability was observed by detecting leakage of Evans blue into lung tissues, pulmonary vascular leakage of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, and the wet/dry mass ratio of lungs. The effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on vascular endothelial permeability was detected by Miles analysis. **Results** LPS injections induced significant Evans blue leakage, FITC-dextran pulmonary vascular leakage and pulmonary edema, which appeared to be more serious in S1PR2-deleted mice compared with those in wild-type mice. LPS enhanced Evans blue leakage associated with VEGF in a dose-dependent way in both S1PR2-deleted mice and wild type mice. But the vascular permeability response in subcutaneous tissues induced by VEGF was higher in S1PR2-deleted mice than that in wild-type mice. **Conclusion** S1PR2 is involved in endothelial cell barrier protections, which inhibits vascular permeability.

【Key words】 Sphingosine-1-phosphate Sphingosine-1-phosphate receptor 2 Vascular permeability Mice

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是鞘磷脂代谢产物之一,是具有生物活性细胞膜的重要组成部分。S1P 通过与细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体 S1PR1、S1PR2、S1PR3、S1PR4、S1PR5 结合发挥生物学作用。其中 S1PR2 广泛表达于各种组织和细胞中,S1PR2 具有多方面功能,可影响心脏的发育、免疫系统等^[1-3]。但是目前 S1PR2 对血

管通透性方面的研究尚少,为此,本研究利用 S1pr2^{-/-}鼠(S1PR2 基因缺乏)研究 S1PR2 对小鼠血管通透性的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

实验动物选用 8~10 周龄 S1pr2^{-/-}鼠及同窝出生的野生鼠(C57BL/6J),雌雄各半,体质量为 22~25 g,由日本金泽大学医学部实验动物中心提供。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,

* 国家自然科学基金(No. 81460001)资助

△ 通信作者, E-mail: cuihong@ybu.edu.cn

FITC)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) (Sigma Chemical, St. Louis, 美国), 伊文思蓝(和光, 日本), 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) (PeproTech Inc., Rocky Hill, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 急性肺损伤模型的建立 LPS诱发肺损伤已是共识。将小鼠分为急性肺损伤模型组(LPS组)和阴性对照组。小鼠经乙醚麻醉, 颈部切开, 暴露气管, 用27G注射针经气管滴注100 μ L LPS溶液(溶于生理盐水, LPS 4 mg/kg), 而后将小鼠直立, 垂直旋转小鼠, 使药物在肺内均匀分布, 然后颈部皮肤缝合。阴性对照组为气管内滴注100 μ L生理盐水。

1.2.2 小鼠肺伊文思蓝色素漏出检测 通过静脉内注射伊文思蓝色素, 检测其在肺血管外的漏出, 探讨肺血管通透性。小鼠气管内注射LPS 23 h时, 进行乙醚麻醉, 将100 ng/mL伊文思蓝溶液100 μ L(溶于生理盐水)经小鼠尾静脉注射。1 h后, 小鼠颈椎脱臼致死, 剪断腹主动脉, 右心室注入生理盐水, 进行灌流, 充分冲洗肺血管内血液及伊文思蓝, 取出肺组织, 照相, 置60 $^{\circ}$ C温箱烘干于24 h, 干燥的肺称质量, 将肺浸泡于1 mL甲酰胺溶液中, 置37 $^{\circ}$ C温箱中温育72 h, 取出组织, 离心, 取上清液, 分光光度计 λ 620 nm进行比色, 根据标准曲线计算每克肺组织中伊文思蓝的含量。

1.2.3 小鼠肺组织血管FITC-葡聚糖渗漏测定 小鼠经气道注射LPS 24 h时, 进行乙醚麻醉, 将100 μ L FITC标记葡聚糖溶液(7.5 mg/mL, 30 mg/kg)经小鼠尾静脉注射, 30 min后, 小鼠进行安乐死, 切开腹主动脉, 向右心室注入40 g/L多聚甲醛, 进行肺组织灌流固定, 取出肺组织, 用冷冻组织包埋剂OCT复合剂进行包埋, 制作冰冻切片。用丙酮固定切片, 用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)进行核染色, 标本用防止褪色剂封片, 共聚焦激光显微镜观察FITC标记葡聚糖漏出。一张切片, 任意观察3个视野, 用Image-J软件计算出各视野FITC阳性面积, 计算出阳性面积在视野总面积所占的比值。

1.2.4 小鼠肺组织湿质量/干质量比值测定 小鼠气管内注射LPS 24 h时, 取肺组织在电子天平上称湿质量后, 置60 $^{\circ}$ C烘烤24 h至恒重, 称取干质量, 计算肺组织的湿质量/干质量比值。

1.2.5 Miles分析 为了检测S1pr2^{-/-}鼠的肺血

管通透性亢进是否为血管内皮自体反应, 我们进行了Miles分析, 观察VEGF对皮肤血管内皮通透性亢进反应。剃除LPS组小鼠背部毛, 进行乙醚麻醉, 尾静脉注射100 ng/mL伊文思蓝液100 μ L(溶于生理盐水), 10 min后在小鼠背部剃毛处皮下各注射100 μ L PBS和VEGF溶液(0、50、100 ng), 20 min后小鼠腹腔注射戊巴比妥安乐死, 尽快切取小鼠背部注射药物部位的皮肤组织, 照相, 皮肤组织浸泡于0.4 mL甲酰胺溶液, 置室温4 d, 使伊文思蓝从皮下组织中全部漏出, 按上述1.2.2方法定量皮下组织伊文思蓝含量。

1.2.6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Prism 5 software(GraphPad Prism software)进行多因素方差分析(2-way ANOVA)和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S1PR2抑制对LPS诱导的肺血管通透性的影响

2.1.1 肺组织伊文思蓝色素漏出实验 外观上, 生理盐水组野生鼠和S1pr2^{-/-}鼠肺组织呈白红色, LPS组野生鼠和S1pr2^{-/-}鼠肺组织均呈现青色, 说明LPS诱导肺组织伊文思蓝漏出增加。定量分析显示, 生理盐水组野生鼠和S1pr2^{-/-}鼠的肺伊文思蓝量差异无统计学意义。而LPS组中S1pr2^{-/-}鼠的伊文思蓝漏出量为野生鼠的约1.6倍($P < 0.001$); LPS组2种小鼠肺伊文思蓝量均高于生理盐水组小鼠(P 均 < 0.01), 见图1。提示S1PR2抑制LPS诱导的肺血管通透性增加。

2.1.2 FITC-葡聚糖测定肺血管渗漏 由图2可见, 与生理盐水组比较, LPS注射可增加野生鼠和S1pr2^{-/-}鼠的FITC标记葡聚糖肺血管外漏出(P 均 < 0.01)。与野生鼠比较, S1pr2^{-/-}鼠的FITC标记葡聚糖肺血管外漏出更显著, 约为野生鼠的1.6倍($P < 0.01$)。

2.1.3 肺组织湿质量/干质量比值测定 与生理盐水组比较, LPS注射增加野生型和S1pr2^{-/-}鼠肺组织湿质量/干质量比值, 说明LPS诱导肺水肿。在生理盐水组, 野生鼠和S1pr2^{-/-}鼠的肺组织湿质量/干质量比值差异无统计学意义, 但LPS组S1pr2^{-/-}鼠较野生鼠肺水肿更严重($P < 0.001$), 见图3。

2.2 S1pr2^{-/-}鼠增加血管通透性因子对内皮的反应

野生型和 $S1pr2^{-/-}$ 鼠均增加 VEGF 剂量依赖性的伊文思蓝漏出,引起血管通透性亢进。在 50、100 ng 的 VEGF 诱导下,与野生鼠比较, $S1pr2^{-/-}$

鼠伊文思蓝漏出量均较高(P 均 < 0.01),见图 4。说明在 $S1pr2^{-/-}$ 鼠中血管内皮通透性因子对内皮的反应亢进。

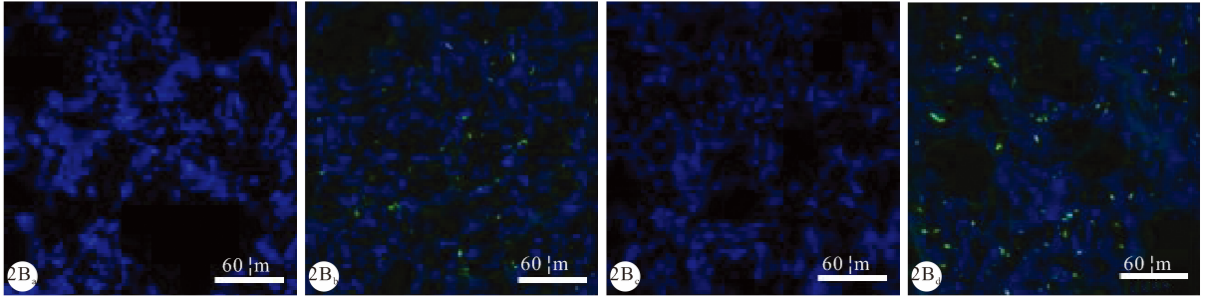
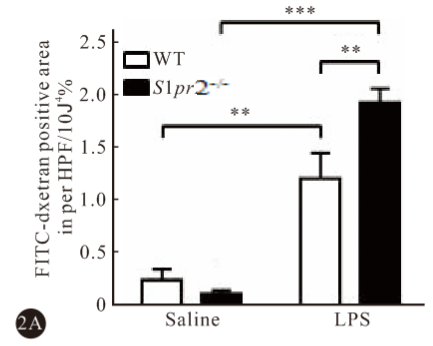
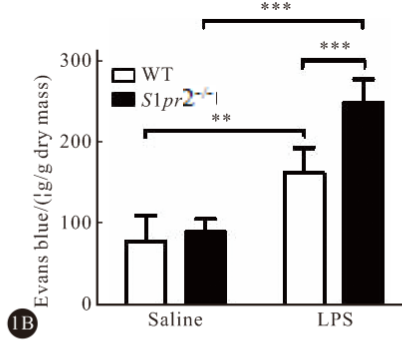
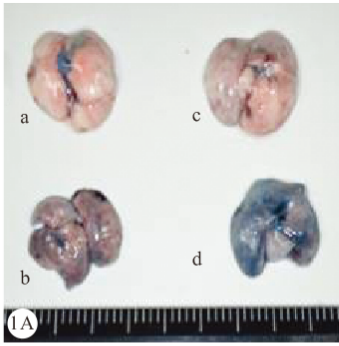


图 1 $S1PR2$ 基因缺乏对 LPS 诱导肺组织伊文思蓝漏出的影响

图 2 $S1PR2$ 基因缺乏对 LPS 诱导肺组织 FITC-葡聚糖外渗的影响

Fig 1 Effects of $S1PR2$ -deficiency on LPS-induced Evans blue leakage in lungs

Fig 2 Effects of $S1PR2$ -deficiency on LPS-induced FITC-dextran leakage of lungs

1A, 2B; Photograph; 1B, 2A; Statistical chart ($n=5$. * $P<0.01$; * * $P<0.001$); a, c: Wild type (WT) and $S1pr2^{-/-}$ mice in saline group, respectively; b, d: WT and $S1pr2^{-/-}$ in LPS group, respectively

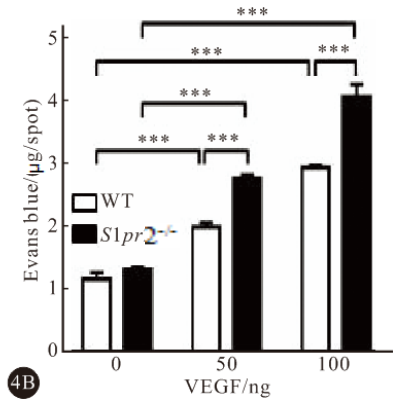
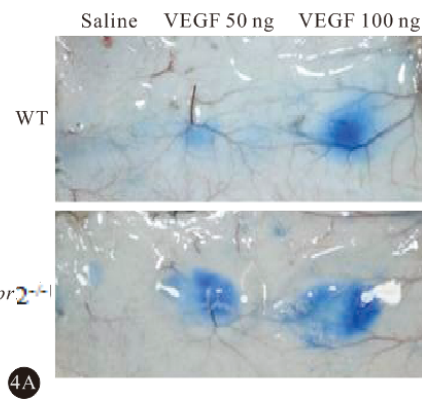
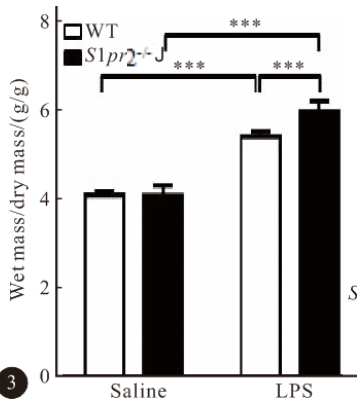


图 3 $S1PR2$ 基因缺乏对 LPS 诱导肺组织的湿质量/干质量比值的影响

图 4 $S1PR2$ 基因缺乏对 VEGF 诱导的血管通透性影响

Fig 3 Effects of $S1PR2$ -deficiency on LPS-induced wet-to-dry mass ratio in lungs

Fig 4 Effects of $S1PR2$ -deficiency on vascular permeability induced by VEGF

3, 4B; Statistical chart ($n=5$. * * * $P<0.001$); 4A; Photograph; WT: Wild type

3 讨论

目前的研究显示, S1P 可以诱导血管成熟、血管再生,并具有调节血管的通透性等作用。这些功能的调节主要依赖存在于血管内皮细胞和平滑肌细胞

上的 S1P 受体^[4]。S1P 与血管内皮细胞表达的 S1PR 相互作用对血管内皮具有重要的保护作用,其引起的效应多由 S1PR1 或 S1PR3 介导。S1P 作用于血管内皮细胞,通过 S1PR1 介导激活 G_i 和通过 S1PR3 介导激活 $G_q/G_{12/13}$,从而引起内皮细胞迁

移、血管反应及黏附连接等^[5-7]。但是 S1PR2 对血管内皮的作用研究甚少,本研究主要探讨 S1PR2 对血管内皮的通透性作用。

在体内, S1P 是质膜鞘磷脂 (sphingomyeline, SP) 的代谢产物之一,其合成和分解代谢受到多种酶的调控。首先, SP 在神经酰胺脂酶的作用下生成 S1P 的前体物质神经酰胺,而神经酰胺在神经酰胺酶的作用下生成鞘氨醇 (sphingosine, SPH), 然后鞘氨醇经鞘氨醇激酶 (sphingosine kinase, SPHK) 磷酸化作用后生成 S1P, 其中 SPHK 是调控 S1P 合成代谢中最关键的限速酶。在哺乳动物中, 鞘氨醇激酶由鞘氨醇激酶 1 (SPHK1) 和鞘氨醇激酶 2 (SPHK2) 两种亚型编码组成^[8-9]。在造血细胞中 Sphk1、Sphk2 (sphingosine kinase, 鞘氨醇激酶) 缺陷的小鼠, 正常或炎症状态下都出现血管通透性亢进^[10]。说明 S1P 在调控血管通透性中起非常重要的作用。目前研究发现 S1P 主要通过 G 蛋白偶联的受体结合, 激活 Rac GTPase 促进细胞骨架重排, 在细胞周边形成牢固的肌动蛋白环并诱导黏附连接和局部连接在细胞周边的形成, 稳定细胞与细胞间以及细胞与基质间作用, 从而增强内皮细胞的屏障保护功能, 降低血管通透性^[11]。给予小鼠 S1P 或 S1P1 受体选择性激动剂, 可降低 LPS 诱导的急性肺损伤模型中的肺血管通透性, 并减少炎症反应。血管内皮细胞 S1PR1 基因敲除或缺乏, 将导致血管内皮细胞的成熟缺陷、粘着连接不稳定、屏障功能不完善, 甚至血流紊乱等^[12-13]。可见 S1P 加强内皮细胞屏障功能, 抑制血管通透性, 其强化屏障功能中 S1P1 起重要作用。

目前在血管内皮细胞高表达的 S1PR2 在血管通透性中的作用尚不清楚。S1PR2 在各组织中的表达主要在血管内皮细胞。本研究发现, LPS 诱导野生鼠和 S1pr2^{-/-} 鼠肺血管通透性增加 (伊文思蓝色素漏出增加、FITC-葡聚糖的肺血管外漏出增多和肺水肿), 与野生鼠比较, S1pr2^{-/-} 鼠肺血管通透性增加更明显, 并且在皮下组织的 VEGF 诱导的血管通透性反应显著亢进。结果说明, 在血管内皮表达的 S1PR2 抑制 LPS 诱导的肺血管通透性。

本研究明确了 S1PR2 在 LPS 诱导的急性肺损伤等病态的血管通透性亢进中的重要作用, S1PR2 参与内皮细胞屏障保护, 抑制血管通透性, 其具体机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] TAKUWA Y, OKAMOTO Y, YOSHIOKA K, *et al.* Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors*, 2012, 38(5): 329-337.
- [2] KEMPF A, TEWS B, ARZT ME, *et al.* The sphingolipid receptor S1PR2 is a receptor for Nogo-a repressing synaptic plasticity. *PLoS Biol*, 2014, 12(1): e1001763 [2015-04-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kempf+A%2CTews+B%2C+Arzt+ME%2C+et+al.+The+sphingolipid+receptor+S1PR2+is+a+receptor+for+Nogo-a+repressing+synaptic+plasticity%5B%5D.+PLoS+Biol%2C+2014>. doi: 10.1371/journal.pbio.1001763. e1001763.
- [3] YATOMI Y, IGARASHI Y, YANG L, *et al.* Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem*, 1997, 121(5): 969-973.
- [4] TAKUWA Y, OKAMOTO Y, YOSHIOKA K, *et al.* Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1781(9): 483-488.
- [5] PENG X, HASSOUN PM, SAMMANI S, *et al.* Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(11): 1245-1251.
- [6] MCVERRY BJ, PENG X, HASSOUN PM, *et al.* Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(9): 987-993.
- [7] SAMMANI S, MORENO-VINASCOS L, MIRZAPOLIAZOVA T, *et al.* Differential effects of Sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(4): 394-402.
- [8] MANDALA SM, THORNTON R, GALVE-ROPERH I, *et al.* Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(1): 150-155.
- [9] ZHOU J, SABA JD. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242(3): 502-507.
- [10] BLAHO VA, HLA T. Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev*, 2011, 111(10): 6299-6320.
- [11] GARCIA JG, LIU F, VERIN AD, *et al.* Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 2001, 108(5): 689-701.
- [12] BEN SHOHAM A, MALKINSON G, KRIEF S, *et al.* S1P1 inhibits sprouting angiogenesis during vascular development. *Development*, 2012, 139(20): 3859-3869.
- [13] JUNG B, OBINATA H, GALVANI S, *et al.* Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell*, 2012, 23(3): 600-610.

(2016-01-18 收稿, 2016-06-04 修回)

编辑 沈进