

## S1P 信号通路: 上皮细胞和内皮细胞屏障功能调控的新靶点

梅慧芳<sup>1,2</sup>, 孙丽新<sup>1,3</sup>, 江振洲<sup>2,3</sup>, 张陆勇<sup>1,3\*</sup>(中国药科大学<sup>1</sup>江苏省新药筛选重点实验室;<sup>2</sup>江苏省药效研究与评价服务中心;<sup>3</sup>药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 1-磷酸鞘氨醇(S1P)是一种具有多种生物活性的鞘脂类代谢产物,通过激活G蛋白偶联受体S1PRs调节重要的生理功能。S1P是维持上皮细胞和内皮细胞屏障功能重要的信号分子,S1P信号通路通过调节黏附连接和紧密连接组装、细胞骨架重排、黏着斑形成,发挥对屏障功能的调控作用,因此S1P信号通路可能成为改善急性肺损伤、炎症性肠病和败血症等疾病中屏障功能紊乱的新靶点。本文对S1P信号通路在上皮细胞和内皮细胞屏障功能调控中的作用及其在屏障功能破坏相关性疾病模型中的保护作用的研究进展进行综述,以期开发治疗屏障功能破坏相关性疾病的新药提供理论参考。

**关键词** S1P信号通路;上皮细胞屏障功能;内皮细胞屏障功能;急性肺损伤;炎症性肠病;败血症;FTY720

**中图分类号** R54 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0654-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160604

**引用本文** 梅慧芳,孙丽新,江振洲,等. S1P信号通路:上皮细胞和内皮细胞屏障功能调控的新靶点[J]. 中国药科大学学报,2016,47(6):654–660.

**Cite this article as:** MEI Huifang, SUN Lixin, JIANG Zhenzhou, *et al.* Sphingosine 1-phosphate signaling pathway: a novel target for regulation of epithelial and endothelial barrier function[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(6): 654–660.

## Sphingosine 1-phosphate signaling pathway: a novel target for regulation of epithelial and endothelial barrier function

MEI Huifang<sup>1,2</sup>, SUN Lixin<sup>1,3</sup>, JIANG Zhenzhou<sup>2,3</sup>, ZHANG Luyong<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening; <sup>2</sup>Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation; <sup>3</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a pleiotropic sphingolipid metabolite that has been shown to regulate important physiological function by activation of its G-protein-coupled receptors S1PRs. S1P has been identified as an important signaling molecule in maintaining epithelial and endothelial barrier function. S1P signaling pathway is involved in epithelial and endothelial barrier function by regulation of adherens junction and tight junction assembly, cytoskeletal reorganization, and focal adhesion formation. Thus, S1P signaling pathway may become a novel therapeutic target for cell barrier dysfunction during some illnesses such as acute lung injury, inflammatory bowel disease and sepsis. In this review, the research progress of S1P signaling pathway in regulating epithelial and endothelial barrier function and the application of S1P in barrier dysfunction-related diseases were summarized, so as to provide references for future research.

**Key words** S1P signaling pathway; epithelial barrier function; endothelial barrier function; acute lung injury; inflammatory bowel disease; sepsis; FTY720

This study was supported by the Major Projects of International (Regional) Joint Research NSFC (No. 81320108029); the National Natural Science Foundation of China (No. 81274146) and 2015 Annual Special Scientific Research Project in Chinese Medicine Industry (No. 201507004-002)

**收稿日期** 2016-03-03 **\*通信作者** Tel: 025-83271023 E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn

**基金项目** 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究项目(No. 81320108029);国家自然科学基金资助项目(No. 81274146);2015年度中医药行业科研专项资助项目(No. 201507004-002)

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是一种鞘脂类代谢产物,存在于血小板、红细胞、血液和淋巴液等细胞和体液中。S1P具有重要生理功能,既可作为细胞内第二信使,直接调节细胞的相关靶点,又可分泌到细胞外,结合并激活细胞膜表面S1P受体(S1P receptors, S1PRs)发挥作用,在细胞增殖和迁移、心血管系统、免疫系统等方面都有着重要作用。S1P在上皮细胞和内皮细胞屏障功能调控中的作用备受关注,S1P信号通路参与调节细胞黏附连接和紧密连接的组装、细胞骨架重排、黏着斑的形成,参与屏障完整性的维持,在屏障功能破坏相关性疾病中发挥屏障功能保护作用。本文对S1P信号通路在上皮细胞和内皮细胞屏障功能调控中的作用及其在相关疾病中的研究进行总结,以期为今后相关领域的研究和药物开发提供参考。

## 1 S1P的作用方式

S1P在哺乳动物的血液、淋巴液和组织间存在浓度梯度。血浆中S1P含量高达微摩尔水平,淋巴液中含量比血液中低4~5倍,间质液中含量比血液中大约低1 000倍。体内S1P的浓度梯度的存在与S1P调节血管渗透性的作用有关<sup>[1]</sup>。血浆中S1P主要与血清白蛋白和高密度脂蛋白(HDL)等以结合形式存在,其中HDL和S1P具有很高的亲和性,因此在血浆中HDL是S1P的主要载体,HDL-S1P的结合物也参与维持内皮屏障功能<sup>[2]</sup>。

S1P合成的关键酶是鞘氨醇激酶(SphK),包括SphK1和SphK2。S1P生成后,可在细胞内或细胞外发挥作用。S1P一方面作为细胞内第二信使,直接作用于细胞内的靶点,调控 $\text{Ca}^{2+}$ 水平、细胞生存和生长<sup>[3]</sup>。另一方面,S1P通过自分泌或旁分泌途径,发挥其细胞外效应<sup>[3]</sup>,包括参与血管成熟,调控细胞增殖,调控细胞骨架重排,调控黏附连接、紧密连接形成,调节上皮和内皮细胞屏障功能<sup>[4-5]</sup>。S1P的细胞外效应由细胞膜上的S1PRs介导,S1PRs是G蛋白偶联受体(GPCRs)家族成员,包括S1PR1~S1PR5 5个亚型,S1PRs在不同的组织具有不同的分布,与G蛋白 $\alpha$ 亚基具有不同的结合效力,从而介导S1P的不同效应<sup>[6]</sup>。

## 2 S1P信号通路参与调节上皮细胞和内皮细胞屏障功能

屏障结构的存在有利于机体维持内环境稳定、抵抗病菌等有害物质入侵、维持生理平衡。在多细胞机体中,细胞屏障(包括上皮细胞和内皮细胞屏障)的形成与组织划分及特定功能的维持密切相关<sup>[7]</sup>。机体屏障功能受多种因素调节,其中S1P被认为是有力的屏障增强效应分子,S1P信号通路参与机体多种细胞屏障功能的维持。

### 2.1 S1P信号通路与细胞间连接

相邻上皮细胞或内皮细胞间的连接结构调节各种溶质及细胞在细胞旁间隙的扩散,起屏障作用维持组织内稳态。细胞-细胞间的连接结构包括紧密连接、黏附连接和缝隙连接。紧密连接和黏附连接在相邻细胞间形成连续的圆周带状结构,使细胞黏附在一起。连接结构由特定的跨膜蛋白构成,跨膜蛋白的胞外端通过相互结合将相邻的细胞连接在一起,而胞内端则锚定于细胞骨架。细胞间连接结构的形成与细胞旁渗透性密切相关<sup>[8]</sup>,对细胞屏障功能的维持至关重要。

钙黏素是一类 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的细胞黏附分子,是细胞黏附连接的主要蛋白,最常见的钙黏素有E-钙黏素、VE-钙黏素等。钙黏素的胞内结构域通过细胞内锚定蛋白( $\alpha$ -连环蛋白和 $\beta$ -连环蛋白)与肌动蛋白细胞骨架成分相结合,维持细胞黏附的稳定<sup>[9]</sup>;同时,钙黏素和p120连环蛋白的结合也维持细胞黏附的稳定<sup>[10]</sup>。钙黏素与细胞屏障功能的维持密切相关。给小鼠注射VE-钙黏素单抗导致肺血管渗透性显著增加<sup>[11]</sup>。过表达胞外段缺失的VE-钙黏素突变体,或以EDTA螯合细胞外的 $\text{Ca}^{2+}$ ,同样导致内皮细胞屏障功能的破坏<sup>[12]</sup>。破坏p120与VE-钙黏素的结合,使黏附连接解聚,导致小鼠肺血管渗透性增加,屏障功能被破坏<sup>[10]</sup>。在狗肾细胞中,减少E-钙黏素的N-糖基化,稳定其黏附连接结构,增强细胞屏障功能,增加跨细胞电阻(TER)<sup>[13]</sup>。

在人肺动脉内皮细胞(HPAEC)中,S1P促进VE-钙黏素与 $\alpha$ -连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白的结合,细胞TER增加<sup>[14]</sup>。Mohammad等<sup>[15]</sup>的研究表明抑制HPAEC的SphK1表达,减少细胞S1P生成,导致VE-钙黏素表达下降、在细胞连接处分布减少,进而引起细胞TER下降、渗透性增加,屏障功能被

破坏。在体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中,较低浓度 S1P(0.5 和 1  $\mu\text{mol/L}$ )显著增加 VE-钙黏素在细胞-细胞连接区域的分布,促进黏附连接的形成;然而高浓度 S1P(10  $\mu\text{mol/L}$ )破坏 VE-钙黏素的组装<sup>[16]</sup>。FTY720 是 S1P 的结构类似物,与 S1PRs 结合发挥 S1P 样的生物效应。Kei 等<sup>[17]</sup>研究表明 FTY720 通过 S1PR 介导,激活 RacGTPase,促进人肺微血管内皮细胞  $\alpha$ -连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白和 VE-钙黏素在细胞-细胞连接区域的再分布,增加 TER 值,增强细胞屏障功能。

然而有研究表明,S1P 所引起的 TER 的快速增加不依赖于 VE-钙黏素的表达,但 VE-钙黏素可能参与 S1P 诱导的 TER 值增加的持续阶段<sup>[18]</sup>。因此钙黏素在介导 S1P 的屏障增强作用中所扮演的角色需要进一步研究说明。

S1P 信号通路除了促进黏附连接组装,也促进细胞紧密连接的形成。紧密连接限制溶质在细胞间隙的扩散(屏障作用),也限制膜蛋白在细胞膜顶端和基底侧区域之间的运动(栅栏作用)。紧密连接由连接黏附分子和紧密连接蛋白 claudins、occludin 组成,这些跨膜蛋白质的胞外端通过相互结合将相邻的细胞连接在一起,而胞内端则通过与紧密连接蛋白 zona occludens 蛋白(ZO-1, ZO-2, ZO-3)结合并锚定在细胞骨架上,稳定紧密连接结构。S1P 通过 S1PR1/Gi/Akt/Rac 通路,促进 ZO-1 向板状伪足和细胞-细胞连接再分布,而用 siRNA 技术下调 ZO-1 表达后 S1P 的屏障增强作用也减弱<sup>[5]</sup>。磷酸化 FTY720(FTY720-P)同样也是 S1PR 的激动剂,FTY720-P 给药 2 周后,小鼠肠系膜淋巴结被膜下淋巴管内皮细胞连接处 ZO-1 分布增加,这一作用经 S1PR1 介导<sup>[19]</sup>。FTY720 S-phosphate(Tys)是 FTY720-P 的结构类似物,也是 S1P 和 FTY720 的结构类似物,肺屏障保护作用比 S1P 和 FTY720 更强,Tys 作用下 VE-钙黏素、 $\beta$ -连环蛋白和 ZO-1 向细胞外周的分布增加<sup>[20]</sup>。在组胺诱导的大鼠羧基提肌血管泄漏模型中,SEW2871 有效的抑制组胺诱导的微血管泄露,这一效应与对紧密连接的调控有关。单独注射 S1P 并不能抑制组胺诱导的微血管泄露,只有在用 JTE-013 抑制 S1PR2 后,S1P 才表现出保护作用。这一现象表明 S1P 对紧密连接的调控与 S1PR1 和 S1PR2 之间的平衡有关<sup>[21]</sup>。Li 等<sup>[22]</sup>研究表明,在 HUVEC 中,低浓度

S1P(0.5  $\mu\text{mol/L}$ )在 S1PR1-PLC-IP<sub>3</sub>R-Ca<sup>2+</sup>-Rac1 通路介导下促进紧密连接形成,起屏障保护作用;而高浓度 S1P(10  $\mu\text{mol/L}$ )通过 S1PR2-Ca<sup>2+</sup>内流-RhoA/ROCK 途径破坏紧密连接形成,诱发 HUVEC 高渗透性反应。这些研究表明 S1P 信号通路可以调控紧密连接蛋白形成和分布而调节屏障功能,但不同受体的作用有待进一步研究。

## 2.2 S1P 信号通路与细胞骨架

细胞骨架是指细胞质中的蛋白纤维网络结构,包括微管、微丝和中间纤维。细胞骨架参与细胞内及相邻细胞间的信号传导,调节细胞形态和运动性,也与维持细胞屏障功能密切相关,细胞骨架结构改变导致细胞形态发生变化,进一步引起屏障功能破坏<sup>[23]</sup>。Garcia 等<sup>[24]</sup>通过测量 TER 证明 S1P 通过 S1PR1 和 S1PR3 介导,剂量依赖性地增强内皮细胞屏障功能。肌动蛋白细胞骨架重排在 S1P 的屏障增强作用中起重要作用,1  $\mu\text{mol/L}$  S1P 迅速诱导 F-actin 在细胞外周的聚合和肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化;而具有肌动蛋白解聚作用的细胞松弛素 B 和肌动蛋白聚合抑制剂 latrunculin 显著抑制 S1P 的屏障增强作用<sup>[24]</sup>。Wang 等<sup>[25]</sup>用原子力显微镜技术研究 S1P 作用下 HPAEC 细胞骨架结构和机械力的改变,结果显示 S1P 显著增加细胞外周区域弹性模量,弹性模量的变化与 S1P 的屏障增强作用一致,与 S1P 促进皮动蛋白向细胞外周的分布有关。Camp 等<sup>[26]</sup>以 FITC 标记的葡聚糖证明 S1P 迅速增强肺内皮细胞屏障功能,研究表明 1  $\mu\text{mol/L}$  的 S1P 在 5 min 内即可诱导皮动蛋白向肺内皮细胞外周转位,并诱导外周 MLC 磷酸化,这些作用由 S1PR1 介导。而 Li 等<sup>[22]</sup>发现 S1P 通过激活 S1PR2,使 F-actin 解聚、细胞 TER 值下降,破坏 HUVEC 屏障功能。这些研究表明肌动蛋白细胞骨架组装/解聚的动态过程及随后在细胞外周的分布参与 S1P 对细胞屏障功能的调节。

其他细胞骨架相关蛋白也参与 S1P 对细胞屏障功能的调节,皮动蛋白参与促进肌动蛋白聚合和细胞外周肌动蛋白重排,诱导细胞骨架重排的诱因也引起皮动蛋白的酪氨酸磷酸化<sup>[27]</sup>。肌球蛋白轻链激酶催化 MLC 的磷酸化,MLC 的磷酸化促使肌动蛋白-肌球蛋白相互作用,促进应力纤维的形成<sup>[28]</sup>。S1P 作用于肺内皮细胞,诱导皮动蛋白迅速向细胞外周的分布<sup>[25-26]</sup>。皮动蛋白耗竭后,S1P

诱导的 HPAEC 细胞 TER 增加的峰值下降 50%,而表达皮动蛋白的内皮细胞在 S1P 刺激下,屏障功能增强<sup>[29]</sup>。S1P 作用后,也迅速促进细胞外周 MLC 的磷酸化<sup>[24,26]</sup>。Zhao 等<sup>[30]</sup>用 siRNA 技术减少肌球蛋白轻链激酶、皮动蛋白、细丝蛋白 A/C、黏着斑激酶表达后,S1P 的屏障增强作用显著减弱。这些研究表明除了肌动蛋白细胞骨架之外,其他细胞骨架辅助蛋白同样与 S1P 的屏障增强作用有关。

细胞外基质与肌动蛋白细胞骨架之间的物理联系被称为黏着斑(focal adhesion,FA)。FA 是由整合素蛋白、肌动蛋白结合结构蛋白和信号分子蛋白形成的复合物。肌动蛋白结合结构蛋白包括黏着斑蛋白、踝蛋白和  $\alpha$ -辅肌动蛋白,信号分子蛋白包括桩蛋白和黏着斑激酶(FAK)<sup>[31]</sup>。FAK 是一种非受体型酪氨酸蛋白激酶,从敲除 FAK 的小鼠胚胎提取的内皮细胞与野生型内皮细胞相比,渗透性显著增加,说明 FAK 与屏障功能的维持有关<sup>[32]</sup>。siRNA 技术下调 FAK 表达后,S1P 诱导 HPAEC 屏障增强的持续时间和峰值均下降<sup>[30]</sup>。S1P 作用于 HPAEC 后,选择性的迅速诱导 FAK 催化区活化环的 Y576 位点的磷酸化,增强其催化活性,FAK 活性增加与 S1P 诱导的屏障增强作用具有时间相关性<sup>[33]</sup>。用 Src 特异性抑制剂 PP2 阻断 S1P 诱导 FAK 磷酸化,减少 S1P 引起的 FA 蛋白向细胞外周的转位,这说明 S1P 促进 FAK 磷酸化的作用与 Src 活性有关<sup>[34]</sup>。但 PP2 不抑制 S1P 的屏障增强作用<sup>[24]</sup>。Wang 等<sup>[34]</sup>研究发现 FTY720 也可特异性诱导 FAK 的 Y576 位点磷酸化,增强细胞屏障功能。与 S1P 类似<sup>[24,30]</sup>,用 PP2 抑制 FTY720 诱导的 FAK 磷酸化后不影响其屏障增强作用。siRNA 技术下调 FAK 不影响 FTY720 屏障增强的峰值(以 TER 为指标),但显著减少屏障增强持续阶段的 TER。这些研究表明 FAK 的表达/磷酸化参与 S1P 的屏障增强作用,但 FAK 在 S1P 信号通路介导的屏障增强早期阶段的作用有待进一步研究。

### 3 S1P 信号通路在疾病模型中的作用

多种病理状态(如急性肺损伤、缺血再灌注损伤、炎症性肠病等)与细胞屏障功能破坏有关,通过调控 S1P 信号通路增强屏障功能,可以改善病症。

#### 3.1 急性肺损伤

急性肺损伤(ALI)是一种严重的炎症性肺部

疾病,其特点是血管渗透性显著增加,与肺泡上皮细胞屏障功能破坏有关<sup>[35]</sup>。在比格犬 ALI 模型中,S1P 对 LPS 造成的肺损伤具有改善作用。S1P 减少 LPS 引起的肺内分流形成,并降低支气管肺泡灌洗液中的蛋白质(72%)和中性粒细胞(95%)含量<sup>[36]</sup>。Zhao 等<sup>[37]</sup>研究发现抑制 S1P 裂解酶可增加 C57BL/6 小鼠肺组织和支气管肺泡灌洗液中的 S1P 含量,减少 LPS 引起的肺损伤和炎症。急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是 ALI 的严重阶段,以肺泡毛细血管屏障破坏、渗透性增加为主要表现。Sun 等<sup>[38]</sup>的研究发现 ALI 重症患者血浆中 S1PR3 浓度升高,且 ALI 病死率与血浆 S1PR3 浓度升高有关,这提示血浆中 S1PR3 水平可作为 ALI 病程的生物标志物。进一步研究表明 S1PR3 的遗传突变体是构成 ARDS 的危险因素,S1PR3 可作为改善 ARDS 的潜在靶点,识别 S1PR3 的突变体可能推动 ARDS 的遗传诊断及个体化治疗<sup>[39]</sup>。

#### 3.2 缺血再灌注损伤

在器官移植、卒中、大出血和心肺转流术等情况下都可能出现缺血再灌注损伤。微血管功能紊乱、血管屏障破坏参与了多种局部或系统性的缺血再灌注损伤。内皮细胞屏障破坏可导致肺水肿,加重肺移植引发的缺血再灌注损伤,再灌注前注射 S1P 能显著增强内皮屏障功能,减少单核细胞向植入肺的浸润,增强接受者移植后肺的氧化功能<sup>[40]</sup>。肝脏缺血再灌注损伤通常引发急性肾损伤,在围手术期炎症细胞因子增加、血管渗透性增加,预先注射 S1P 能减轻系统炎症和血管内皮损伤<sup>[41]</sup>。

#### 3.3 炎症性肠病

炎症性肠病是一组累及肠道的慢性非特异性炎症性疾病,其病因及发病机制尚未完全清楚,一般认为与环境、遗传、微生物感染及免疫等多种因素有关。近年来研究表明,包括溃疡性结肠炎<sup>[42]</sup>和克罗恩病<sup>[43-44]</sup>在内,炎症性肠病的发生与肠道上皮细胞屏障功能破坏,进而导致肠道通透性增加有关<sup>[45]</sup>。S1P 信号通路参与肠道上皮细胞屏障功能的维持。Greenspon 等<sup>[46]</sup>研究发现 S1P 增加体外培养的肠道上皮细胞 E-钙黏素表达,促进 E-钙黏素和  $\beta$ -连环蛋白在质膜的分布,降低细胞旁通透性,增强肠道上皮细胞屏障功能。此外在 IL-10<sup>-/-</sup>小鼠克罗恩病模型中,S1PR1 特异性激动剂 SEW2871 改善肠道紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 的表达,增加

肠上皮屏障功能,从而减轻结肠炎症状<sup>[47-48]</sup>。

### 3.4 败血症

Winkler 等<sup>[49]</sup>研究报道,败血症患者血清 S1P 水平显著下降,其下降程度与病症严重程度呈正相关。S1P 作为细胞屏障有效的调节因素,其含量的降低可能是败血症病程中毛细血管泄漏、组织灌注受损的诱因之一。

## 4 S1P 信号通路相关药物研究进展

根据 S1P 的体内生成及作用方式,主要可以从 3 个方面对 S1P 信号通路进行调控。其一是对 S1P 的合成和降解进行调控,如 SphK1、SphK2 抑制剂的开发<sup>[50]</sup>以及对 S1P 裂解酶抑制剂的研究<sup>[37]</sup>;其二是对 S1PRs 进行调控,开发 S1P 各种受体亚型的激动剂或抑制剂;其三是研究直接靶向 S1P 的抗体。在改善屏障功能方面目前研究较多的是 S1PRs 的配体,包括 FTY720、SEW2871 和 JTE-013。

### 4.1 FTY720

FTY720 是首个可经口服给药的用于治疗多发性硬化症的新型免疫抑制剂,在体内被磷酸化为 FTY720-P,在体内可激活除 S1PR2 以外的 4 种 S1PRs。FTY720-P 通过激活 S1PR1 抑制淋巴细胞从淋巴器官入血,因此减少淋巴细胞经血-脑脊液屏障进入中枢神经系统,从而改善多发性硬化症症状。Hideaki<sup>[51]</sup>等的研究发现,FTY720-P 通过上调 claudin-5 从而抑制多发性硬化症患者血清引起的脑微血管内皮细胞 TER 下降,增强血-脑脊液屏障的屏障功能。这表明 FTY720 可能通过作用于脑微血管内皮细胞,直接调控血-脑脊液屏障而减少淋巴细胞进入中枢神经系统,从而发挥治疗多发性硬化症的作用。FTY720 对血-脑脊液屏障的直接调控作用揭示了多发性硬化症治疗中的新靶点,也提示 FTY720 在治疗神经系统疾病中新的作用机制。

FTY720 对血-脑脊液屏障的调控在急性缺血性脑卒中的治疗中也发挥重要作用。目前治疗急性缺血性脑卒中的重要方法是用重组组织型纤溶酶原激活剂(tPA)溶栓,但 tPA 治疗时间窗窄、存在脑出血的风险。FTY720 与 tPA 联合给药一方面可以增加治疗时间窗内 tPA 的疗效,另一方面可以有效避免治疗时间窗外注射 tPA 引起的脑出血、血-脑脊液屏障破坏的风险<sup>[52]</sup>。

此外,腹腔注射 FTY720 显著降低中性粒细胞

浸润、血浆 MPO 和促炎因子水平,降低血管渗透性,维持血管屏障完整性,减轻肺缺血再灌注损伤<sup>[53]</sup>,这提示 FTY720 有可能成为治疗缺血再灌注损伤的潜在药物。

### 4.2 SEW2871

2004 年,研究人员通过 FLIPR 高通量筛选设备和钙流检测试剂盒对化合物库进行筛选,获得了 S1PR1 选择性激动剂 SEW2871<sup>[6]</sup>。Dong 等<sup>[46-47]</sup>研究发现 SEW2871 通过改善肠道屏障功能,从而起到减轻克罗恩病症状的作用,这提示 SEW2871 可能成为治疗克罗恩病的候选药物。Sammani 等<sup>[54]</sup>在气管内给予 SEW2871,抑制 LPS 引起的肺内皮屏障的破坏,缓解小鼠急性肺损伤症状。此外,在败血症损伤起始阶段以及败血症损伤发生后给予 SEW2871,均能减轻败血症引起的肾微血管渗透性增加,改善肾功能<sup>[55]</sup>。

### 4.3 JTE-013

JTE-013 是 S1PR2 的选择性激动剂。在小鼠脑卒中模型中进行研究发现,缺血再灌注损伤后,经 S1PR2 介导导致神经血管完整性的破坏;敲除 S1PR2 或用特异性抑制剂 JTE-013 抑制 S1PR2 表达,均能降低脑卒中小鼠大脑 MMP-9 活性以及脑微血管 MMP-2/9 活性,降低脑血管渗透性<sup>[56]</sup>。

## 5 讨论和展望

S1P 信号通路的生物学功能及其作用机制已经部分得到阐明,其中 S1P 信号通路对上皮和内皮细胞屏障功能的调控作用引起人们的关注。越来越多的研究证实 S1P 信号通路参与维持屏障完整性。在多种病理模型中的研究证明,调控 S1P 信号通路可以改善屏障功能从而发挥治疗疾病的作用。但 S1P 在临床的应用依然受到限制。首先,S1P 对屏障功能的调控作用的分子机制仍然有待进一步阐明;其次,受体的多样性导致 S1P 生物效应的多样性,S1PRs 在不同细胞类型的表达也不同,S1P 的应用将可能产生复杂的效应;此外,不同浓度的 S1P 也会产生不同的生物效应。因此,需要对 S1P 信号通路进行更深入的研究,使人们对 S1P 的生物学意义及其在疾病中的起效机制有更深入的了解。随着研究的推进,我们将更全面地了解 S1P 信号通路在屏障功能及其他生物学功能中的作用特点,为屏障功能破坏相关性疾病的预防、

诊断和治疗提供新的靶点和策略,为相关药物的开发提供更好的思路。

### 参考文献

- [1] Hla T, Venkataraman K, Michaud J. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance [J]. *BBA-Mol Cell Biol L*, 2008, **1781**(9):477-482.
- [2] Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(23):9613-9618.
- [3] Mahajan-Thakur S, Böhm A, Jedlitschky G, et al. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: a mutual link between blood coagulation and inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015:831059. doi:10.1155/2015/831059.
- [4] Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment [J]. *World J Cardiol*, 2015, **7**(11):719-741.
- [5] Lee JF, Zeng Q, Ozaki H, et al. Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(39):29190-29200.
- [6] Sun LX, Mei HF, Li H, et al. Sphingosine-1-phosphate signaling pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Prog Pharm Sci (药理学进展)*, 2014, **38**(12):886-891.
- [7] Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, **5**:119-144.
- [8] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2004, **84**(3):869-901.
- [9] Rajwar YC, Jain N, Bhatia G, et al. Expression and significance of cadherins and its subtypes in development and progression of oral cancers: a review [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, **9**(5):ZE05-7.
- [10] St Amant EV, Tauseef M, Vogel SM, et al. PKC $\alpha$  activation of p120-catenin serine 879 phospho-switch disassembles VE-cadherin junctions and disrupts vascular integrity [J]. *Circ Res*, 2012, **111**(6):739-749.
- [11] Corada M, Mariotti M, Thurston G, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(17):9815-9820.
- [12] Venkiteswaran K, Xiao KY, Summers S, et al. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and  $\beta$ -catenin [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **283**(3):C811-C821.
- [13] Nita-Lazar M, Rebutini I, Walker J, et al. Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions [J]. *Exp Cell Res*, 2010, **316**(11):1871-1884.
- [14] Sun XG, Shikata Y, Wang LC, et al. Enhanced interaction between focal adhesion and adherens junction proteins: involvement in sphingosine 1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement [J]. *Microvasc Res*, 2009, **77**(3):304-313.
- [15] Tauseef M, Farazuddin M, Sukriti S, et al. Transient receptor potential channel 1 maintains adherens junction plasticity by suppressing sphingosine kinase 1 expression to induce endothelial hyperpermeability [J]. *FASEB J*, 2016, **30**(1):102-110.
- [16] Liu X, Wu W, Li Q, et al. Effect of sphingosine 1-phosphate on morphological and functional responses in endothelia and venules after scalding injury [J]. *Burns*, 2009, **35**(8):1171-1179.
- [17] Sarai K, Shikata K, Shikata Y, et al. Endothelial barrier protection by FTY720 under hyperglycemic condition: involvement of focal adhesion kinase, small GTPases, and adherens junction proteins [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, **297**(4):C945-C954.
- [18] Xu M, Waters CL, Hu C, et al. Sphingosine 1-phosphate rapidly increases endothelial barrier function independently of VE-cadherin but requires cell spreading and Rho kinase [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, **293**(4):C1309-C1318.
- [19] Singer II, Tian M, Wickham LA, et al. Sphingosine-1-phosphate agonists increase macrophage homing, lymphocyte contacts, and endothelial junctional complex formation in murine lymph nodes [J]. *J Immunol*, 2005, **175**(11):7151-7161.
- [20] Wang LC, Bittman R, Garcia JG, et al. Junctional complex and focal adhesion rearrangement mediates pulmonary endothelial barrier enhancement by FTY720 S-phosphonate [J]. *Microvasc Res*, 2015, **99**:102-109.
- [21] Lee JF, Gordon S, Estrada R, et al. Balance of S1P1 and S1P2 signaling regulates peripheral microvascular permeability in rat cremaster muscle vasculature [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, **296**(1):H33-H42.
- [22] Li Q, Chen B, Zeng C, et al. Differential activation of receptors and signal pathways upon stimulation by different doses of sphingosine-1-phosphate in endothelial cells [J]. *Exp Physiol*, 2015, **100**(1):95-107.
- [23] Alieva IB. Role of microtubule cytoskeleton in regulation of endothelial barrier function [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2014, **79**(9):964-975.
- [24] Garcia JG, Liu F, Verin AD, et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108**(5):689.
- [25] Wang X, Bleher R, Brown ME, et al. Nano-biomechanical study of spatio-temporal cytoskeleton rearrangements that determine subcellular mechanical properties and endothelial permeability [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**:11097. doi:10.1038/srep11097.
- [26] Camp SM, Chiang ET, Sun CD, et al. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by novel FTY720 analogs: methoxy-FTY720, fluoro-FTY720, and  $\beta$ -glucuronide-FTY720 [J]. *Chem Phys Lipids*, 2015, **191**:16-24. doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.8.004.
- [27] Belvitch P, Dudek SM. Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability [J]. *Microvasc Res*, 2012, **83**(1):22-30.
- [28] Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction [J]. *Circ J*, 2009, **73**(2):208-213.

- [29] Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, *et al.* Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate roles for cortactin and myosin light chain kinase[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(23):24692-24700.
- [30] Zhao J, Singleton PA, Brown ME, *et al.* Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement[J]. *Cell Signal*, 2009, **21**(12):1945-1960.
- [31] Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(1):85-90.
- [32] Zhao XF, Peng X, Sun SG, *et al.* Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development[J]. *J Cell Biol*, 2010, **189**(6):955-965.
- [33] Shikata Y, Birukov KG, Birukova AA, *et al.* Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT[J]. *FASEB J*, 2003, **17**(15):2240-2249.
- [34] Wang LC, Chiang ET, Simmons JT, *et al.* FTY720-induced human pulmonary endothelial barrier enhancement is mediated by c-Abl[J]. *Eur Respir J*, 2011, **38**(1):78-88.
- [35] Parekh D, Dancer RC, Thickett DR. Acute lung injury[J]. *Clin Med*, 2011, **11**(6):615-618.
- [36] Szczepaniak WS, Zhang YZ, Hagerty S, *et al.* Sphingosine 1-phosphate rescues canine LPS-induced acute lung injury and alters systemic inflammatory cytokine production *in vivo* [J]. *Transl Res*, 2008, **152**(5):213-224.
- [37] Zhao YT, Gorshkova IA, Berdyshev E, *et al.* Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression[J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2011, **45**(2):426-435.
- [38] Sun X, Singleton PA, Letsiou E, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor-3 is a novel biomarker in acute lung injury[J]. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2012, **47**(5):628-636.
- [39] Sun XG, Ma SF, Wade MS, *et al.* Functional promoter variants in sphingosine 1-phosphate receptor 3 associate with susceptibility to sepsis-associated acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2013, **305**(7):I467-I477.
- [40] Okazaki M, Kreisel F, Richardson SB, *et al.* Sphingosine 1-phosphate inhibits ischemia reperfusion injury following experimental lung transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2007, **7**(4):751-758.
- [41] Lee SY, Kim DH, Sung SA, *et al.* Sphingosine-1-phosphate reduces hepatic ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury through attenuation of endothelial injury in mice [J]. *Nephrology*, 2011, **16**(2):163-173.
- [42] Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, *et al.* Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, **10**(4):462-471. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv223.
- [43] Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, *et al.* Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function[J]. *Gastroenterology*, 2010, **139**(6):2093-2101.
- [44] Lennon EM, Maharshak N, Elloumi H, *et al.* Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10<sup>-/-</sup> mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, **19**(4):712.
- [45] Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, *et al.* Intestinal barrier in inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, **20**(5):1165.
- [46] Greenspon J, Li RY, Xiao L, *et al.* Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of adherens junction protein E-cadherin and enhances intestinal epithelial cell barrier function[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, **56**(5):1342-1353.
- [47] Dong J, Wang H, Wu G, *et al.* Oral treatment with SEW2871, a sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist, ameliorates experimental colitis in interleukin-10 gene deficient mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, **177**(1):94-101.
- [48] Dong J, Wang H, Zhao J, *et al.* SEW2871 protects from experimental colitis through reduced epithelial cell apoptosis and improved barrier function in interleukin-10 gene-deficient mice [J]. *Immunol Res*, 2015, **61**(3):303-311.
- [49] Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, *et al.* Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis [J]. *Crit Care*, 2015, **19**(1):1-8.
- [50] Paugh SW, Paugh BS, Rahmani M, *et al.* A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia[J]. *Blood*, 2008, **112**(4):1382-1391.
- [51] Nishihara H, Shimizu F, Sano Y, *et al.* Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(3):e0121488.
- [52] Campos F, Qin T, Castillo J, *et al.* Fingolimod reduces hemorrhagic transformation associated with delayed tissue plasminogen activator treatment in a mouse thromboembolic model [J]. *Stroke*, 2013, **44**(2):505-511.
- [53] Stone ML, Sharma AK, Zhao Y, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonism attenuates lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2015, **308**(12):L1245-1252.
- [54] Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapioazova T, *et al.* Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung[J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2010, **43**(4):394-402.
- [55] Wang Z, Sims CR, Patil NK, *et al.* Pharmacologic targeting of sphingosine-1-phosphate receptor 1 improves the renal microcirculation during sepsis in the mouse [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, **352**(1):61-66.
- [56] Kim GS, Yang L, Zhang GQ, *et al.* Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke[J]. *Nat Commun*, 2015, **6**:7893. doi:10.1038/ncomms8893.