

鞘氨醇-1-磷酸受体1在肾脏中的表达及临床病理意义

严 苗 刘 璐 陈 铖

摘 要 **目的** 探讨鞘氨醇-1-磷酸受体1(sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1P₁) 在肾脏疾病时肾脏中的表达及相关性。**方法** 采用免疫组化染色法测定肾脏切片中 S1P₁ 表达并半定量分析。**结果** 正常组、肾脏疾病组中肾脏均存在 S1P₁ 的表达分布,但各肾脏疾病组的表达强度均低于正常组(Normal 组 0.309 ± 0.023 , IgAN 组 0.061 ± 0.029 , HTN 组 0.053 ± 0.012 , MPGN 组 0.134 ± 0.060 , LN 组 0.109 ± 0.021 , MCD 组 0.085 ± 0.026), 各组与对照组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** S1P₁ 在正常肾脏组织中表达,多种肾脏疾病时 S1P₁ 表达下调,提示 S1P₁ 可能参与肾脏疾病的发生。

关键词 肾小球疾病 鞘氨醇-1-磷酸受体1

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.013

Expression and Clinical Pathological Significance of Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 in the Kidney. Yan Miao, Liu Lu, Chen Cheng. Department of Nephrology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To observe the expression of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P₁) in the kidney and explore its clinical pathological significance. **Methods** The expression of S1P₁ in the kidney was semi-quantitative analysed by immunohistochemical staining method. **Results** S1P₁ existed on the kidney tissue of the normal group, but also the kidney disease groups. But in the kidney disease groups, the intensity was remarkably lower than the normal group (Normal group 0.309 ± 0.023 , IgAN group 0.061 ± 0.029 , HTN group 0.053 ± 0.012 , MPGN group 0.134 ± 0.060 , LN group 0.109 ± 0.021 , MCD group 0.085 ± 0.026). Each group comparing with control group had statistically difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of S1P₁ in the kidney was decreased in a variety of kidney diseases, which conforms that S1P₁ may participate in kidney disease.

Key words Glomerular disease; S1P₁

鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-Phosphate, S1P)受体1(S1P₁),亦称内皮分化基因1(endothelial differentiation gene 1, EDG1),是一种连接脂质信号分子S1P的G-蛋白偶联受体,在调节细胞增殖、凋亡、迁移等方面起着关键作用^[1]。成熟的红细胞缺乏细胞器,当然缺乏S1P降解的场所——内质网,同时缺乏S1P裂解酶和S1P磷酸水解酶,因此胞质中蓄积了循环系统中占比较多的S1P,而白蛋白和高密度脂蛋白是血浆S1P主要的运载体^[2-4]。在以血尿、蛋白尿为主要表现的肾小球疾病中,S1P从破碎的红细胞中释放,或随白蛋白、高密度脂蛋白通过肾小球滤过膜。本实验是为检测S1P₁在肾小球中是否有表达及以血尿、蛋白尿为表现的肾脏疾病时S1P₁的表达

改变。

材料与方法

1. 病理切片来源与分组:选取武汉大学人民医院10例肾癌切除后癌旁组织(距肿块 ≥ 3 cm)作为对照组和38例肾穿刺活检肾脏组织标本(包括IgA肾病12例、膜增生性肾小球肾炎MPGN 6例、高血压肾病HTN 5例、狼疮性肾炎LN 10例、微小病变型肾病MCD 5例)。

2. 免疫组织化学:组织蜡块常规切为4 μ m厚切片,常规脱蜡,高压高温抗原修复,H₂O₂室温封闭,加兔一抗S1P₁(1:200, CST公司),4℃孵育过夜;加兔二抗10 μ l(1:200, CST公司),加免疫组化二步法试剂一(CST公司),加免疫组化二步法试剂二,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片。

3. 免疫组织化学结果的半定量分析:观察肾组织以棕黄色为阳性信号,每张切片在400 $\times$ 高倍镜下随机选取8个视野,用专业图像分析软件IPP 6.0进行分析,计算肾小球阳性区域平均光密度值(MA值)=

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900688, 81470912);中华医学会临床研究专项基金资助项目(14050470584)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者:陈铖,电子邮箱:chenchengc2001@aliyun.com

肾小球阳性区域的积分光密度 (IA)/肾小球阳性区域的总面积 (area), 以平均光密度值 (MA 值) 大小反映 S1P₁ 在肾小球中表达的强弱水平。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 11.5 统计软件, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

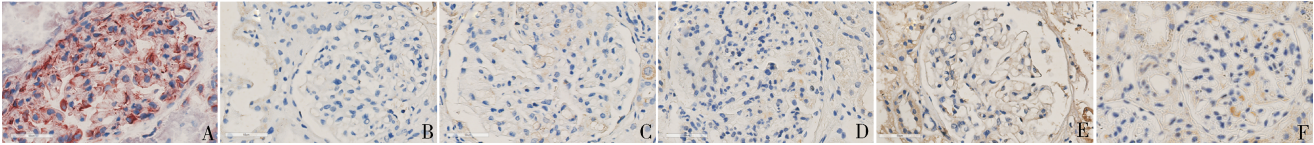


图 1 肾小球 S1P₁ 表达 (DAB, ×400)

A. 正常对照组; B. IgAN 组; C. HTN 组; D. MPGN 组; E. LN 组; F. MCD 组

组别	MOD 值	<i>t</i>	<i>P</i>
正常对照组	0.309 ± 0.023	—	—
IgAN 组	0.061 ± 0.029	12.510	0.001
HTN 组	0.053 ± 0.012	22.280	0.000
MPGN 组	0.134 ± 0.060	3.690	0.035
LN 组	0.109 ± 0.021	15.870	0.001
MCD 组	0.085 ± 0.026	8.029	0.004

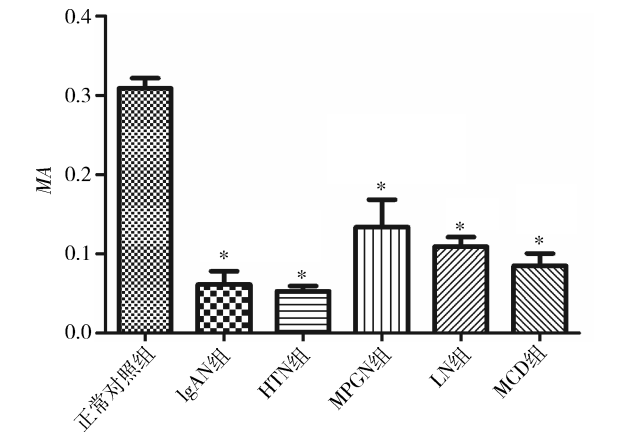


图 2 肾组织中 S1P₁ 表达的平均光密度值比较

与正常对照组比较, * *P* < 0.05

讨 论

鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 是 S1P₁ 在体内的天然配体, 是广泛存在于血液、淋巴液及多种细胞中的一种脂质活性分子。S1P 与其特异性 G 蛋白偶联受体 (S1P₁₋₅) 产生多种重要生物学效应。目前有大量研究证实了 S1P-S1P₁ 通路参与多种生理病理过程, 包括促进淋巴细胞回巢、影响血管成熟、减轻缺血再灌注损伤、增加肿瘤侵袭性^[5-14] 等。肾脏中足细胞、系膜细胞、肾小球内皮细胞、肾小管上皮细胞均有

结 果

S1P₁ 在肾小球上的表达: S1P₁ 在正常对照组足细胞、系膜细胞、内皮细胞中表达分布, 而肾小球疾病组肾小球中表达明显降低, 测定和计算 MA 值结果显示肾小球疾病组中的各组的 S1P₁ 的表达水平较对照组弱, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 1、表 1、图 2)。

S1P 受体的表达, 其中足细胞中表达 S1P₁₋₄, 系膜细胞表达 S1P₁₋₃ 和 S1P₅。目前在肾脏方面的研究包括 S1P 受体激动剂可通过直接作用小管上皮细胞的 S1P 受体而不是减少淋巴细胞生成起到保护肾脏免受缺血再灌注损伤的损害, S1P-S1P₁ 激活可减轻顺铂引起的小管上皮细胞损害, S1P 过度刺激则会使肾小管上皮细胞转变为系膜细胞而最终导致肾脏纤维化^[9, 10, 15-17]。

基于 S1P 在体内分布的特点, 笔者考虑到在以血尿、蛋白尿为主要表现的肾小球疾病中, S1P 是否会通过肾小球引起 S1P₁ 的表达改变呢? 目前尚缺乏相关研究报道。血尿、蛋白尿不仅是肾脏损害的标志, 也是肾脏病进展的危险因素。本实验证实了正常组和疾病组中的肾小球中足细胞、系膜细胞和内皮细胞中均有 S1P₁ 的表达, 而在以血尿和 (或) 蛋白尿为表现的原发 (如 IgAN 肾病、微小病变型、膜增生性) 和继发 (如高血压肾损害、狼疮性肾炎等) 肾小球疾病组中, 肾小球上的 S1P₁ 的表达明显下调。这提示 S1P₁ 可能参与肾小球疾病的发生、发展中。

本课题组的临床实验部分观察到 S1P 在 IgAN 血中浓度下降, 而尿液中浓度增加, 并与 24h 尿蛋白定量呈正相关, 可能是 IgAN 进展的重要原因。也间接佐证蛋白尿发生时, 协同载体白蛋白一起, 更多的 S1P 通过肾小球。当然, 或许因上述临床实验部分样本量需进一步扩大, 实验并未提示尿液中 S1P 浓度与血尿有明显关联性, 需进一步完善。另外笔者的细胞实验部分证实了 S1P 通过调节 S1P₁ 表达下调而参与介导足细胞骨架紊乱及黏附异常的损伤中。综合本研究实验的发现, 不同肾小球疾病中, S1P₁ 表达下调。笔者推论, 肾小球疾病发生时, S1P 可能会从破

碎的红细胞中释放,或随尿白蛋白通过肾小球滤过膜对肾脏产生影响。S1P可能通过介导S1P₁表达下调介导了足细胞骨架、黏附损伤和参与肾小球疾病进展。有关S1P介导S1P₁表达下调,有文献指出可能是通过S1P诱导其内化进一步发生泛素化降解,或蛋白水解作用等机制所致^[18]。

那么临床上是否可通过上调S1P₁的表达来减轻肾小球疾病的进展,这值得进一步探讨。目前市面上已有S1P₁的激动剂,包括非特异性抑制剂FTY720和特异性激动剂SEW2871、AUY954。其中FTY720已用于多发性硬化的治疗以及器官移植后抗排斥方面^[19,20]。已有许多研究者将S1P₁激动剂FTY720用于肾脏方面研究,包括有FTY720可减轻单侧输尿管结扎的小鼠模型中的肾脏炎症程度、FTY720可以激活系膜细胞中的TGF- β 信号通路而发挥促纤维化作用及在糖尿病肾病模型中发挥保护作用等^[21]。Min等^[22]用高蛋白饮食所致的肾损害模拟蛋白尿模型,发现FTY720可以减轻其中的小管间质炎性反应。也曾提出过FTY720或许可以作为蛋白尿治疗的新的治疗手段。血尿、蛋白尿的治疗,目前主要包括ACEI或ARB制剂、激素和免疫抑制剂。本研究提示S1P₁或许可以作为血尿、蛋白尿诊治的新的研究方向。

参考文献

- 1 Kono M, Tucker AE, Tran J, *et al.* Sphingosine - 1 - phosphate receptor 1 reporter mice reveal receptor activation sites in vivo[J]. J Clin Invest, 2014, 124(5): 2076 - 2086
- 2 于杨,秦树存. 脂活性信号分子鞘氨醇 - 1 - 磷酸及其生物学特性[J]. 生理科学进展, 2011, 42(2): 151 - 154
- 3 Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, *et al.* HDL - bound sphingosine - 1 - phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation[J]. Nature, 2015, 523(7560): 342 - 346
- 4 Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, *et al.* Endothelium - protective sphingosine - 1 - phosphate provided by HDL - associated apolipoprotein M[J]. PNAS, 2011, 108(23): 9613 - 9618
- 5 Allende ML, Dreier JL, Mandala S, *et al.* Expression of the sphingosine 1 - phosphate receptor, S1P₁, on T - cells controls thymic emigration[J]. J Bio Chem, 2014, 279(15): 15396 - 15401
- 6 Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, *et al.* Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine - 1 - Phosphate[J]. Science, 2007, 316(5822): 295 - 298
- 7 Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G - protein - coupled receptor S1P₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation[J]. Blood, 2003, 102(10): 3665 - 3667
- 8 Liu YJ, Wada R, Yamashita T, *et al.* Edg - 1, the G protein Coupled receptor for sphingosine - 1 - phosphate, is essential for vascular

- maturation[J]. J Clin Invest, 2000, 106(8): 951 - 961
- 9 Bajwa A, Jo SK, Ye H, *et al.* Activation of sphingosine - 1 - phosphate 1 receptor in the proximal tubule protects against ischemia - reperfusion injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(6): 955 - 965
- 10 Park SW, Kim M, Chen SW, *et al.* Sphingosine - 1 - phosphate protects kidney and liver after hepatic ischemia and reperfusion in mice via S1P₁ receptor activation[J]. Lab Invest, 2010, 90(8): 1209 - 1224
- 11 Karliner JS, Honbo N, Summers K, *et al.* The lysophospholipids sphingosine - 1 - phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(9): 1713 - 1717
- 12 Alberg AJ, Armeson K, Pierce JS, *et al.* Plasma sphingolipids and lung cancer: A population - based, nested case - control study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(8): 1374 - 1382
- 13 Babahosseini H, Roberts PC, Schmelz EM, *et al.* Bioactive sphingolipid metabolites modulate ovarian cancer cell structural mechanics[J]. Integr Biol: Camb, 2013, 5(11): 1385 - 1392
- 14 Barros MG. Sphingolipids in colon cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(5): 773 - 782
- 15 Bajwa A, Rosin DL, Chrosicki P, *et al.* Sphingosine 1 - phosphate receptor - 1 enhances mitochondrial function and reduces cisplatin - induced tubule injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(4): 908 - 925
- 16 Ishizawa S, Fujigasaki JT, Kanazawa Y, *et al.* Sphingosine - 1 - phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via the S1P₂ receptor[J]. Clin Exp Nephrol, 2014, 18(6): 844 - 852
- 17 Shiohira S, Yoshida T, Sugiyama H, *et al.* Sphingosine - 1 - phosphate acts as a key molecule in the direct mediation of renal fibrosis[J]. Physiol Rep, 2013, 1(7): 1 - 16
- 18 Takuwa Y, Ikeda H, Okamoto Y, *et al.* Sphingosine - 1 - phosphate as a mediator involved in development of fibrotic diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(1): 185 - 192
- 19 Chun J, Brinkmann V. A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya)[J]. Discov Med, 2011, 12(64): 213 - 228
- 20 Choe JW, Gardella SE, Herr DR, *et al.* FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine - 1 - phosphate receptor 1 (S1P₁) modulation[J]. PNAS, 2011, 108(2): 751 - 756
- 21 Thangada S, Shapiro LH, Silva C, *et al.* Treatment with the immunomodulator FTY720 (Fingolimod) significantly reduces renal inflammation in murine unilateral ureteral obstruction[J]. Urol, 2014, 191(5): 1508 - 1516
- 22 Min XU, Dan LIU, Ding. FTY720 inhibits tubulointerstitial inflammation in albumin overload - induced nephropathy of rats via the Sphk1 pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(12): 1537 - 1545

(收稿日期:2015 - 11 - 12)

(修回日期:2015 - 12 - 08)