

磷酸鞘胺醇对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的 调控及机制研究

张媛媛 李伟阳 刘 欣 李丽英*

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

摘要 采用Western blot、免疫荧光和PCR检测小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7中S1P受体 $S1PR_{1-3}$ 的表达, 然后应用吞噬实验和免疫荧光的方法检测磷酸鞘胺醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)对其吞噬功能的调节。分别应用药理学工具和小干扰RNA的方法研究S1P调节其吞噬活性的作用机制。结果显示, 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7表达 $S1PR_{1-3}$; S1P剂量依赖地增强小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7的吞噬功能, 应用 $S1PR_2$ 或 $S1PR_3$ 的拮抗剂和siRNAs可抑制S1P增强的小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7的吞噬活性; 而应用 $S1PR_1$ 的拮抗剂和si $S1PR_1$ 并不影响S1P增强的RAW264.7的吞噬作用; 且S1P可以显著上调RAW264.7中 $S1PR_2$ 和 $S1PR_3$ 的表达, 但是不改变 $S1PR_1$ 的表达, 提示S1P通过正反馈机制增强其介导的小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7的吞噬功能。结果表明, S1P/ $S1PR_{2/3}$ 信号通路增强小鼠单核巨噬细胞吞噬活性, 为单核巨噬细胞吞噬作用的分子机制调控研究提供了新线索。

关键词 吞噬; 单核巨噬细胞; 磷酸鞘胺醇; 磷酸鞘胺醇受体; 小干扰RNA

Regulation of Mouse Monocyte/Macrophages Phagocytosis by Sphingosine 1-Phosphate

Zhang Yuanyuan, Li Weiyang, Liu Xin, Li Liying*

(College of Basic Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Macrophage phagocytosis is an essential step in innate immunity. However, the signals regulating the phagocytosis are still not fully understood. This study aimed to evaluate the effects of S1P and S1P receptors ($S1PRs$) on macrophage phagocytosis *in vitro*. We found that $S1PR_1$, $S1PR_2$ and $S1PR_3$ were all expressed in monocyte/macrophages RAW264.7. A powerful phagocytosis activity was exerted by S1P on monocyte/macrophages and the effects of pro-phagocytosis were markedly inhibited by $S1PR_2$ or $S1PR_3$ antagonists or siRNAs, but not $S1PR_1$ antagonist or siRNA. Interestingly, exogenously added S1P induced significant up-regulation of $S1PR_{2/3}$, but not affected $S1PR_1$, suggesting a self-amplifying loop of S1P to enhance macrophage phagocytosis activity. In conclusion, the results revealed that S1P/ $S1PR_{2/3}$ signaling axis stimulated phagocytosis activity in mouse monocyte/macrophages and provided new clues for the molecular mechanisms of macrophage phagocytosis.

Keywords phagocytosis; monocyte/macrophage; sphingosine 1-phosphate; sphingosine 1-phosphate receptor; small interfering RNA

收稿日期: 2015-05-12 接受日期: 2015-07-15

国家自然科学基金(批准号: 81430013)和北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(批准号: IDHT20150502)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-83950101, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

Received: May 12, 2015 Accepted: July 15, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81430013) and the Project of Construction of Innovative Teams and Teacher Career Development for Universities and Colleges Under Beijing Municipality (Grant No.IDHT20150502)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950101, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

网络出版时间: 2015-09-06 17:02:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150906.1702.006.html>

磷酸鞘胺醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是一种新近发现的具有重要生理功能的膜磷脂代谢产物,它在细胞增殖、存活、迁移、分化以及免疫功能调节等方面都有着极其重要的作用^[1-3]。S1P是鞘磷脂中间代谢产物,既可以作为细胞内第二信使发挥作用,又可以与细胞表面的特定受体结合而发挥重要的生物学功能^[4]。S1P与其相应受体结合后激活或抑制多种信号转导通路,从而发挥不同的生物学效应。

单核巨噬细胞作为机体先天免疫系统的重要组成部分,发挥了重要的作用^[5]。单核巨噬细胞是单核吞噬系统的固有成员,在抗感染和无菌性炎症的先天免疫应答中发挥中心作用,并且还能够招募适应性免疫细胞,其沿着趋化因子浓度梯度的迁移,使得单核巨噬细胞能够对炎症进行干预^[6-7]。此外,通过不同细胞因子的分泌与内源性和外源性抗原的呈递,单核巨噬细胞能够将先天性免疫应答和适应性免疫应答联系起来^[8]。

吞噬作用是固有免疫和适应性免疫的一个重要组成部分,吞噬体的形成和成熟以及抗原呈递中涉及的信号转导、细胞骨架重构和膜重组等复杂过程是它们消除病原体的前提条件^[9-10]。脂质在这些事件中所起的关键作用越来越受到重视。鞘脂、胆固醇和磷酸肌醇是第二信使产生的必需物质。它们还有助于肌动蛋白细胞骨架的重构和细胞膜的方向性流动^[11]。单核巨噬细胞的吞噬功能同时依赖于涉及脂质和蛋白质复杂分子间的相互作用。鞘脂是真核细胞脂质双层普遍存在的组件并且已成为重要信号转导分子的来源,大多数都参与细胞的各种病理生理过程^[12-13]。鞘脂代谢物,诸如S1P被证明可调节免疫系统和免疫细胞的生物学功能^[14-15]。S1P/S1PRs信号通路介导骨髓来源单核巨噬细胞迁移至受损肝脏发挥了促炎和促纤维化作用。然而, S1P/S1PRs信号通路是否调节小鼠单核巨噬细胞吞噬活性及作用机制尚不明确。因此,为了进一步研究单核巨噬细胞吞噬功能相关的调控机制,在我们课题组之前研究S1P工作的基础上,继续研究其对小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7的吞噬功能的调节和作用机制。关于S1P/S1PRs信号通路病理生理作用的研究将为各种炎症性疾病的治疗提供新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW264.7细胞系购自中国医学科学院基础医

学研究所细胞资源中心细胞库。

1.2 试剂及仪器

RPMI-1640培养基、青霉素/链霉素购自美国GIBCO公司;胎牛血清(FBS)购自德国BIOCHROM公司; S1P、H₂S1P购自美国BIOMOL公司; W146、JTE-013和CAY-10444购自美国Cayman公司; 红外荧光染料标记的二抗购自美国LI-COR公司; 抗GAPDH单克隆抗体和溴化乙锭(EB)购自美国Sigma公司; 山羊抗大鼠Cy3标记抗IgG抗体购自美国Jackson ImmunoResearch公司; 兔抗鼠抗S1PR₁、抗S1PR₂和抗S1PR₃抗体购自美国Santa Cruz公司; RNeasy Mini Kit购自德国Qiagen公司; BCATM Protein Assay Kit购自美国Pierce公司; M-MLV逆转录试剂盒和Lipofectamine RNAiMAX购自美国Invitrogen公司; SYBR Green PCR Master Mix和Taqman Universal PCR Master mix购自美国ABI公司; 细胞吞噬珠(pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles)购自美国Life Technologies公司。

RT-qPCR仪(ABI Prism 7300)购自美国ABI公司; Odyssey红外荧光扫描成像系统购自美国LI-COR公司; 高内涵显微成像系统购自美国Thermo公司; BIO-RAD 680型酶标仪、垂直电泳装置和蛋白转印装置购自美国BIO-RAD公司; CO₂培养箱和超净工作台购自德国Heraeus公司; 96孔细胞培养板购自美国Costar公司。

1.3 细胞培养

RAW264.7细胞培养于RPMI-1640培养基中,内含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素/链霉素,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 细胞免疫荧光

用4%多聚甲醛固定小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7,用0.5% Triton X-100(PBS配制)室温孵育15 min,然后用PBS洗3次,每次5 min; 37 °C用2%牛血清白蛋白封闭30 min; 加一抗(anti-S1PR₁、anti-S1PR₂和anti-S1PR₃兔源多克隆抗体, 1:200) 4 °C过夜; 用PBS洗3次,每次5 min; 加荧光二抗(TRITC-goat anti-rabbit IgG, 1:100), 37 °C孵育1 h; 用PBS洗3次,每次5 min; 加入DAPI染色5 min,用PBS洗3次,每次5 min; 荧光显微镜下观察,拍片。

1.5 蛋白质印迹实验(Western blot)

在4 °C条件下,加入裂解液提取小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7中的蛋白,用BCA Protein Assay Kit测定样品蛋白质含量。每个样本取50 μg蛋白进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳并转至PVDF膜上,用含5%

脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭1 h, 加入1:200稀释倍数的S1PR₁、S1PR₂或S1PR₃兔多克隆抗体于4 °C孵育过夜, TBST漂洗3次, 每次10 min, 加入二抗, 室温孵育1 h后, TBST漂洗3次, 每次10 min, 直接用Odyssey红外荧光扫描成像系统进行扫描成像。标本中内参照GAPDH的测定采用相同步骤。

1.6 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7 Latex beads吞噬实验

预处理pHrodo™ Red/Green Zymosan A BioParticles, 用2 mL PBS溶解pHrodo™ Red/Green Zymosan A BioParticle, 涡旋转移到玻璃管中, 加入6 mL PBS, 超声5 min使之均匀分散, 备用。将RAW264.7按5 000/孔传至96孔板, 饥饿4 h; 加入不同浓度的SIP, 阻断剂提前1 h加入; 加预处理过的pHrodo™ Red/Green Zymosan A BioParticles 50 μL/孔, 在37 °C吞噬30 min。将细胞用4%多聚甲醛4 °C固定细胞30 min, 弃去上清, 吹干, 加入DAPI染色5 min, 用PBS洗3次, 每次5 min, 用荧光显微镜在波长为485 nm和580 nm下观察, 拍片; 细胞中含有3个或更多的乳胶珠被定为阳性细胞, 计数至少200个细胞来测定阳性吞噬率。

1.7 RNA干扰(RNAi)实验

RNA干扰的靶向基因为S1P_{1,3}受体, 同时采用1个与其他已知的哺乳动物基因序列不具有同源性的siRNA序列作为阴性对照, 其序列均由美国Thermo scientific公司合成。将已退火的siRNA溶解在250 μL无Rnase的灭菌去离子水中, 使其浓度为20 μmol/L。转染前一天将2×10⁵细胞接种于60 mm培养皿中, 使细胞在24 h内汇合达到40%~50%; 次日稀释siRNA(200 pmol): 5 μL siRNA加入245 μL opti-MEM; 稀释Lipofectamine RNAiMAX: 5 μL Lipofectamine RNAiMAX加入245 μL opti-MEM; 将上述稀释的siRNA与稀释的转染试剂混合后室温静置10~20 min; 弃去细胞培养皿中的培养基, 加入2 mL无血清、无抗生素的DMEM培养基, 然后加入0.5 mL上述混合液后轻轻摇匀; 在37 °C、5% CO₂条件下培养6~8 h后弃去培养基; 更换为含10% FBS的完全培养基, 共转染48 h; 收集细胞采用RT-qPCR和Western blot鉴定靶基因沉默效率。

1.8 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

(1)细胞总RNA的提取: 采用QIAGEN® RNeasy MiniKit提取RNA, 并用Nano Vue检测RNA的浓度及纯度。(2)反转录方法制备cDNA: 将稀释后的总

RNA 4 μL(2 μg)、Oligo(dt)15 (0.5 μL)、10 mmol/L dNTP (1 μL)、超纯水(6.5 μL), 依次加入PCR反应管中, 65 °C反应5 min, 立即转入冰浴中, 短暂离心后, 加入5×第一链缓冲液(4 μL)、0.1 mmol/L DTT(二硫苏糖醇 2 μL)、MMLV(200 units)(1 μL)、超纯水(1 μL), 轻轻混匀, 短暂离心, 37 °C 50 min; 70 °C 15 min终止反应, 冰浴冷却, 并以不加反转录酶的反应体系作为阴性对照。(3)样本测定: 使用选定的引物对样本做实时荧光定量聚合酶链反应, 以18S rRNA为内参, 用 $\Delta\Delta C_t$ 计算mRNA表达(mRNA相对含量= $2^{-(C_t\text{目的基因}-C_t18S)}$)。所用引物序列: 18S rRNA上游引物: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', 下游引物: 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'; S1PR₁上游引物: 5'-TCT GCG GGA AGG GAG TAT GT-3', 下游引物: 5'-CGA TGG CGA GGA GAC TGA A-3'; S1PR₂上游引物: 5'-TGC CCG CCT TCA GCA T-3', 下游引物: 5'-AAA AAG TAG TGG GCT TTG TAG AGG AT-3'; S1PR₃上游引物: 5'-TCT CAG CCT TCA TCC ATT AAC TCT AC-3', 下游引物: 5'-AGG GAG CCT TAT GTC ATA CCA CAA-3'。

1.9 DNA琼脂糖凝胶电泳

用0.5×TBE-Buffer 2%的琼脂糖凝胶50 mL, 在微波炉中加热至琼脂糖溶解; 待溶液冷却至60 °C左右, 加入10 mg/mL浓度的溴化乙锭至终浓度为0.5 mg/mL, 充分混匀后, 缓慢倒入制胶槽内, 直至有机玻璃板上形成一层均匀的胶面; 在凝胶完全凝固后, 小心地拔出梳子, 然后将制胶内槽放在电泳槽内; 加电泳缓冲液至液面没过胶面1~1.5 mm; DNA样品与10×Loading-buffer(含有溴酚蓝和甘油等物质)混合后, 用微量取样器慢慢将混合物加至样品槽中; 盖上电泳槽并通电, 使DNA向阳极移动, 采用电压为80~100 V; 当溴酚蓝染料移动到距凝胶前沿1~2 cm处停止电泳, 用准备好的保鲜膜包住凝胶在紫外灯下观察并拍照。

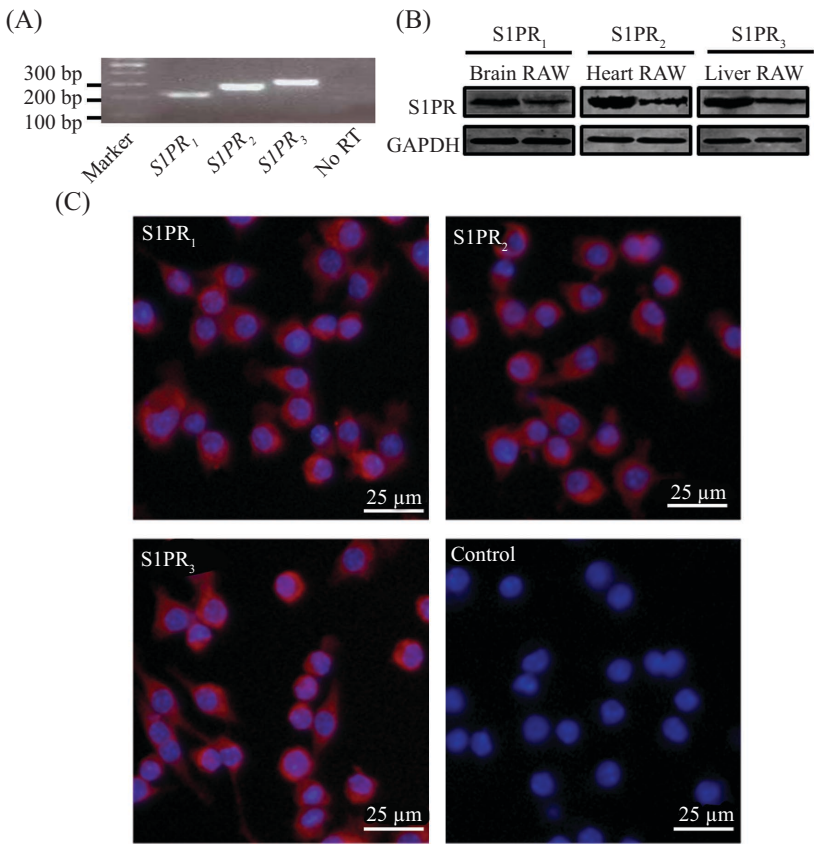
1.10 统计学分析

所有实验数据以均值±标准误表示, 采用SPSS 16.0统计软件对实验结果进行分析, 两组间比较采用Student's *t*检验, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05认为有显著性差异。

2 结果

2.1 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7中S1PR₁、S1PR₂、S1PR₃表达的检测

分别应用RT-qPCR和Western blot方法在mRNA



A: 用RT-qPCR的方法检测RAW264.7中*S1PR₁₋₃* mRNA水平的表达。B: 用免疫印迹的方法检测RAW264.7中*S1PR₁₋₃*蛋白水平的表达。脑、心、肝分别作为*S1PR₁₋₃*的阳性对照。C: *S1PR₁₋₃*在RAW264.7上特异性表达的细胞免疫荧光。*S1PR₁₋₃*呈红色, 细胞核呈蓝色。
A: expression of *S1PR₁₋₃* mRNA in RAW264.7 was measured by RT-qPCR. B: expression of *S1PR₁₋₃* protein in RAW264.7 was detected by Western blot. Brain, heart and liver tissue were used as positive controls. C: the representative images of immunostaining for *S1PR₁*, *S1PR₂* or *S1PR₃* (red) in RAW264.7. Cells were co-stained with DAPI to identify nuclei (blue).

图1 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7中*S1PR₁*、*S1PR₂*和*S1PR₃*表达的检测
Fig.1 The expressions of *S1PR₁*, *S1PR₂* and *S1PR₃* were measured in RAW264.7 cells

和蛋白质水平检测*S1PR₁₋₃*三个受体的表达(图1A和图1B)。结果显示, 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7表达*S1PR₁₋₃*。用细胞免疫荧光的方法进一步检测*S1PR₁₋₃*在RAW264.7细胞上的表达(图1C)。结果显示, RAW264.7特异性表达*S1PR₁₋₃*。

2.2 S1P对小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7吞噬功能的影响

我们检测不同浓度S1P对RAW264.7的诱导吞噬作用, 发现随S1P浓度的升高, RAW264.7的吞噬作用逐渐增强, 且具有浓度依赖效应, LPS(100 μg/mL)作为阳性对照(图2)。

为了明确S1P对RAW264.7的促吞噬作用由受体介导, 用H₂S1P对比S1P, 进行RAW264.7的吞噬实验。H₂S1P是S1P的结构类似物, 无细胞内第二信使功能, 只能通过与细胞表面受体结合发挥效用^[16]。S1P和H₂S1P的对比实验常用作判断S1P发挥作用

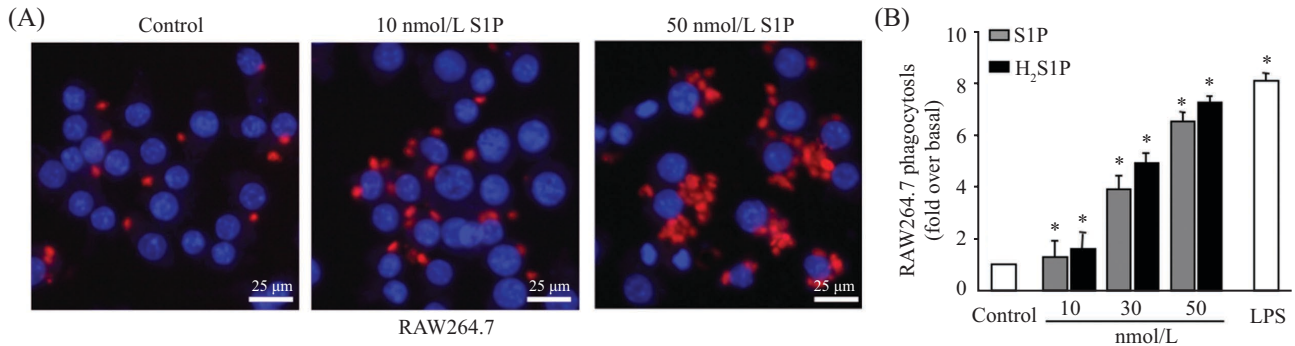
的途径, 若两者作用一致, 则表明S1P的作用是通过受体介导的。结果显示, S1P的作用完全被H₂S1P模拟, 提示S1P的促吞噬作用是通过激活细胞表面受体完成的(图2B)。同时, 我们也对相同浓度下S1P与H₂S1P对RAW264.7细胞的促吞噬作用做了统计学分析, 两者之间差异没有统计学意义, 表明S1P的促吞噬作用确实是通过激活细胞表面受体完成的, 且没有通过其他途径来发挥作用。

2.3 S1P对*S1PR₁₋₃*表达的影响

为了了解S1P受体参与S1P对小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7吞噬的作用机制, 我们检测了S1P刺激RAW264.7后*S1PR₁₋₃*的表达变化情况。RT-qPCR和Western blot的结果均显示, S1P显著上调RAW264.7中*S1PR₂*和*S1PR₃*的表达, 但是不改变*S1PR₁*的表达(图3)。

2.4 S1P对RAW264.7吞噬功能的影响

为进一步研究*S1PR₁₋₃*在RAW264.7吞噬过

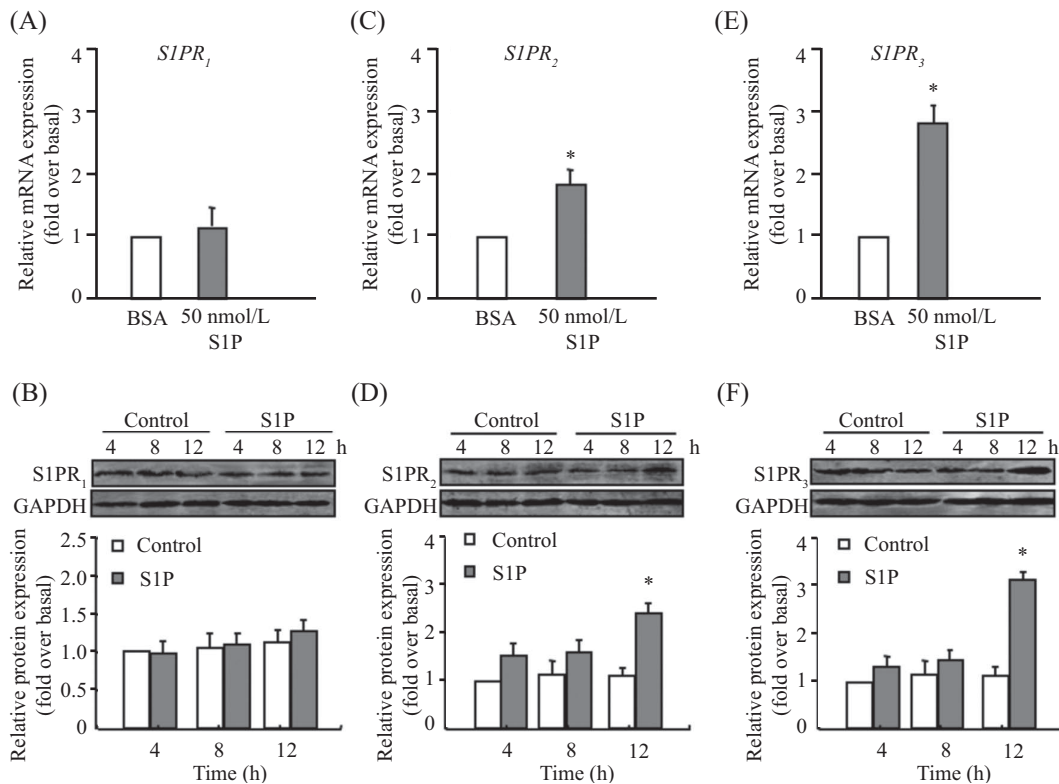


饥饿4 h后的RAW264.7中加入不同浓度的S1P或H₂S1P, 再加预处理过的pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles, 37 °C吞噬30 min。A: 在S1P不同浓度刺激下对RAW264.7吞噬功能的影响; B: 在S1P和H₂S1P作用下的RAW264.7吞噬功能的定量分析。**P* < 0.05, 与对照组比较。

Serum-starved RAW264.7 cells were allowed to phagocytose pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles for 30 min in the presence of varying concentrations of S1P or H₂S1P as indicated. A: representative images showing the internalization of pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles by RAW264.7 with or without different concentrations of S1P; B: quantitative analysis of phagocytosis in RAW264.7 induced by S1P and H₂S1P. **P* < 0.05 compared with control group.

图2 不同浓度S1P对小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7吞噬功能的影响

Fig.2 Effects on the phagocytic activities of RAW264.7 cells treated with different concentrations of S1P



饥饿后的细胞用S1P分别刺激4, 8, 12 h, 然后再分别应用RT-qPCR(A、C和E)和免疫印迹(B、D和F)的方法检测S1PR₁₋₃的表达, mRNA水平检测是在S1P刺激4 h后收细胞完成。蛋白的表达采用GAPDH作为参照。**P* < 0.05, 与对照组比较。

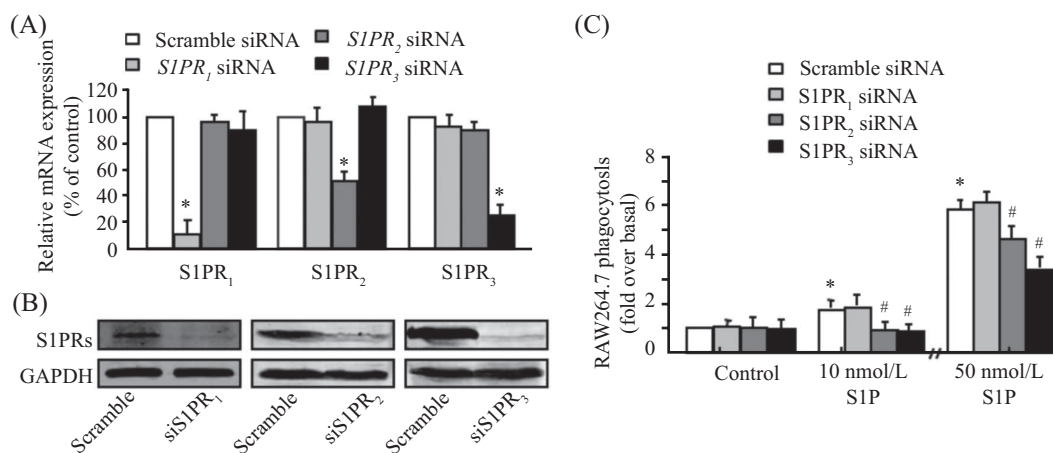
Serum-starved cells were stimulated with S1P for 4, 8, 12 h, respectively. Expression of S1PR₁, S1PR₂ and S1PR₃ in RAW264.7 cells were determined by RT-qPCR (A, C and E) and Western blot (B, D and F). mRNA expression was determined after S1P stimulation for 4 hours. After quantification of the signals, results were normalized relative to GAPDH expression. **P* < 0.05 compared with control group.

图3 S1P对S1PR₁₋₃表达的影响

Fig.3 The effect of S1P on the expression of S1PR₁₋₃

程中的作用, 首先应用RNA干扰的方法分别沉默RAW264.7中S1PR₁₋₃的表达。结果显示, 用S1PR₁-siRNA、S1PR₂-siRNA或S1PR₃-siRNA分别转染RAW264.7, 其S1PR₁、S1PR₂和S1PR₃的表达分别降

低90%、50%和87%, 表明基因沉默程度符合要求, 且以S1PR₁、S1PR₂或S1PR₃为靶基因的siRNA不改变其他S1P受体的表达情况, 说明这些siRNA的作用是特异性的(图4A和图4B)。沉默S1PR₂或S1PR₃的

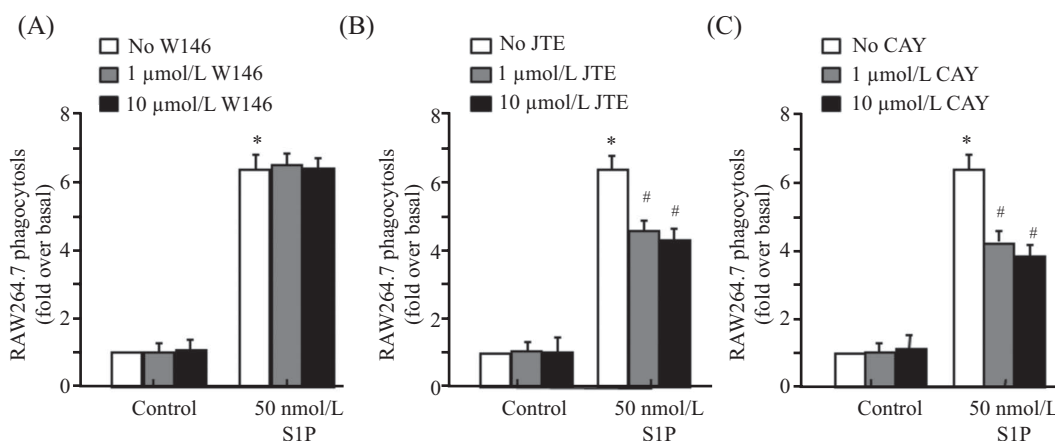


RAW264.7细胞分别用S1PR₁-siRNA、S1PR₂-siRNA或S1PR₃-siRNA小干扰RNA进行转染48 h, 然后再分别应用RT-qPCR(A)和Western blot(B)检测S1PR₁₋₃的表达。C: 沉默S1PR₁₋₃后, S1P对RAW264.7细胞吞噬功能的影响。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与单加S1P组比较。

RAW264.7 were transfected with scramble siRNA, S1PR₁-siRNA, S1PR₂-siRNA or S1PR₃-siRNA for 48 h. The expressions of S1PR₁, S1PR₂ or S1PR₃ were evaluated by real time RT-PCR (A) and Western blot (B). C: effects of silencing S1PR₁, S1PR₂ or S1PR₃ expression on phagocytosis in response to S1P in RAW264.7. * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with S1P-treated alone.

图4 沉默S1PR₁₋₃表达对S1P诱导的RAW264.7吞噬功能的影响

Fig.4 Effects of silencing S1PR₁₋₃ expression on S1P-induced phagocytosis in RAW264.7 cells



饥饿后的RAW264.7分别用S1PR₁拮抗剂W146(A)、S1PR₂拮抗剂JTE-013(B)和S1PR₃拮抗剂CAY-10444(C)进行预处理1 h后, 再在S1P的作用下进行吞噬实验, 并计算阳性吞噬率。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与单加S1P组比较。

Serum-starved RAW264.7 cells were pretreated for 1 h with or without S1PR₁ antagonist W146 (A), S1PR₂ antagonist JTE-013 (B) and S1PR₃ antagonist CAY-10444 (C). Pretreated cells were then allowed to phagocytose in the presence of S1P. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs S1P-treated alone.

图5 S1PRs拮抗剂对S1P诱导的RAW264.7吞噬功能的影响

Fig.5 Effects of S1PRs antagonist on S1P-induced phagocytosis in RAW264.7

表达明显阻断S1P的促吞噬作用, 而沉默S1PR₁的表达不影响S1P诱导的RAW264.7吞噬作用(图4C)。

为进一步确认上述结果, 应用特异性S1P受体拮抗剂进行检测。S1P诱导RAW264.7的吞噬可以被选择性S1PR₂拮抗剂(JTE-013)和S1PR₃拮抗剂(CAY-10444)呈浓度依赖性的阻断(图5B和图5C)。然而, 选择性S1PR₁拮抗剂(W146)并不影响S1P对RAW264.7的吞噬作用(图5A)。同时, W146或JTE-013均对RAW264.7无毒副作用。以上结果表明, 在S1P诱导RAW264.7吞噬过程中, S1PR₂和S1PR₃介

导促进吞噬的信号通路, 而S1PR₁不参与调控, 提示S1P/S1PR_{2/3}通过正反馈机制增强小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7的吞噬功能。

3 讨论

磷脂类物质是所有真核生物细胞膜的主要组成成分, 机体中主要含甘油磷脂和鞘磷脂两大类磷脂。这些磷脂除了参与细胞膜组成外, 还在细胞生命活动中产生许多代谢产物, 其中一些产物为涉及细胞病理生理过程的重要信号分子, 如白三烯、前

列腺素E、花生四烯酸、三磷酸肌醇和二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)等。磷酸鞘胺醇(S1P)是一种新近发现的膜鞘磷脂代谢过程的中间产物,是一种多效的脂质介质,可以影响许多种细胞类型。S1P的生物学作用现已被广泛研究。S1P参与了机体中各种细胞类型的生物学活动包括细胞存活、迁移和分化。在该项研究中,我们观察到S1P调控免疫系统生物学活动的另一新功能。S1P表现出较强的促进小鼠单核巨噬细胞吞噬活性并且是依赖于S1PR₂和S1PR₃的,而且S1PR₂和S1PR₃的阻断剂可以抑制小鼠单核巨噬细胞吞噬功能。

在这项研究中,旨在探讨S1P在小鼠单核巨噬细胞吞噬功能中的作用。我们发现,S1P通过启动S1PR_{2/3}信号通路调节免疫应答的重要功能,并且我们证明了S1P与H₂S1P的促吞噬作用一致,表明S1P通过受体介导方式发挥促吞噬作用,而不是进入细胞或在细胞内产生后直接以第二信使方式发挥作用。S1P受体为G蛋白偶联受体,受体与G蛋白结合以后,下游的细胞信号通路如蛋白磷酸化途径、第二信使途径(cAMP和Ca²⁺)也被激活了。然后转换到细胞行为的长期改变,如基因转录和细胞形态和运动的改变。S1PR₁结合G_i蛋白,而S1PR₂和S1PR₃结合G_q、G_{12/13}、G_i蛋白。有趣的是,外源性S1P可以上调单核巨噬细胞系RAW264.7中S1PR_{2/3}的表达。本研究结果与先前在其他细胞类型,例如人类肝星状细胞系LX-2、HeLa细胞和MEL-7细胞中的研究一致^[17]。这些研究表明,S1P调控免疫细胞功能借助了一个自放大回路,从而提高其生物学活性。

吞噬作用是先天性免疫和适应性免疫的一个重要组成部分。S1P的调查研究表明,S1PR₁和S1PR₂在调控宿主免疫细胞功能方面可能有相反的作用^[18]。这些受体与不同的G蛋白偶联为它们不同的信号转导特性和S1P多种多样的细胞学效应提供了较合理的解释。具体来说,S1P受体与G_i蛋白偶联导致Rac激活和细胞活性增强,而与G_{12/13}蛋白偶联导致Rac抑制和细胞活性减弱^[19]。本实验室先前的研究还表明,在LX-2细胞^[17]和人成纤维细胞^[20]中S1P诱导S1PR_{1/3}介导的为刺激迁移信号和S1PR₂介导的为抑制迁移信号。在这项研究中,我们发现,S1PR₂和S1PR₃在S1P诱导RAW264.7细胞吞噬行为中是必需的,而S1PR₁不是必需的。此结果与之前其他先天性免疫细胞如淋巴细胞^[3,21]中功能的报道结果是一

致的。然而,S1PR₁也被报道可促进单核/巨噬细胞在动脉粥样硬化过程中的吞噬作用^[22],这种差异可能归因于所使用的巨噬细胞的不同组织来源以及它们不同的激活状态和不同S1PRs表达模式。因此,通过进一步观察S1P/S1PRs信号通路的机制对在体外和体内了解单核巨噬细胞吞噬活性是很有必要的。

总之,本研究表明,S1P/S1PR_{2/3}信号通路在单核巨噬细胞的吞噬过程中发挥了重要作用。更重要的是,可以通过改变S1PRs表达模式从而调节单核巨噬细胞的吞噬活性。此外,本研究还发现,S1P可借助自我放大回路来增强细胞的吞噬作用。这些实验数据可能为体内单核巨噬细胞吞噬功能的分子机制研究提供新的线索。因此,通过特异性激活S1PR₁或阻断S1PR_{2/3}可以减弱单核巨噬细胞在组织炎症时的吞噬活性,对相关炎症性疾病具有良好的干预作用。

参考文献 (References)

- 1 Davaille J, Gallois C, Habib A, Li L, Mallat A, Tao J, *et al.* Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(44): 34628-33.
- 2 Davaille J, Li L, Mallat A, Lotersztajn S. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J Biol Chem* 2002; 277(40): 37323-30.
- 3 Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, *et al.* Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007; 316(5822): 295-8.
- 4 Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: Dual messenger functions. *FEBS Lett* 2002; 531(1): 54-7.
- 5 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12): 958-69.
- 6 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *In vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787-95.
- 7 Porta C, Riboldi E, Totaro MG, Strauss L, Sica A, Mantovani A. Macrophages in cancer and infectious diseases: the 'good' and the 'bad'. *Immunotherapy* 2011; 3(10): 1185-202.
- 8 Gordon S. The macrophage: Past, present and future. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1: S9-17.
- 9 Yeung T, Grinstein S. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 2007; 219: 17-36.
- 10 Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: Aging gracefully. *Biochem J* 2002; 366(Pt 3): 689-704.
- 11 Rougerie P, Miskolci V, Cox D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: Role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol Rev* 2013; 256(1): 222-39.
- 12 Merrill AH Jr, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, *et al.* Sphingolipids—the enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142(1): 208-25.

- 13 Saba JD, Hla T. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res* 2004; 94(6): 724-34.
- 14 Nijnik A, Clare S, Hale C, Chen J, Raisen C, Mottram L, *et al.* The role of sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 in immune system function. *J Immunol* 2012; 189(1): 102-11.
- 15 Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 127-59.
- 16 Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, *et al.* Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(50): 35343-50.
- 17 Liu X, Yue S, Li C, Yang L, You H, Li L. Essential roles of sphingosine 1-phosphate receptor types 1 and 3 in human hepatic stellate cells motility and activation. *J Cell Physiol* 2011; 226(9): 2370-7.
- 18 McQuiston T, Luberto C, del Poeta M. Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 2 in the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages. *Microbiology* 2011; 157(Pt 5): 1416-27.
- 19 Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* 2004; 92(5): 913-22.
- 20 Li C, Zheng S, You H, Liu X, Lin M, Yang L, *et al.* Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by action on hepatic myofibroblasts motility. *J Hepatol* 2011; 54(6): 1205-13.
- 21 Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427(6972): 355-60.
- 22 Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Bode C, Graler M, Heusch G, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res* 2011; 108(3): 314-23.