

# S1P/S1PRs 信号通路调控周细胞功能和血脑屏障完整性在 NPSLE 小鼠中的作用

李建斌, 吴 锐

(南昌大学第一附属医院风湿免疫科, 南昌 330006)

**【摘要】目的:**探究神经精神性红斑狼疮(neuropsychiatric systemic lupus erythematosus, NPSLE)发病过程中周细胞脱失的病理意义,以及鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)及其受体(S1P receptors, S1PRs)信号通路在调控周细胞功能和维持血脑屏障完整性中的作用机制。**方法:**应用墨菲罗斯大鼠/淋巴细胞增生(Murphy Roths Large/lymphoproliferation, MRL/lpr)小鼠 NPSLE 模型,基于神经行为学改变筛选 NPSLE 小鼠。实验设计包括:探索 NPSLE 小鼠脑组织中 S1P/S1PRs 通路分组表达变化;应用 S1P 拮抗剂(FTY720)、S1PR1 激动剂(SYL927)和 S1PR2 阻断剂(JTE-013)干预 S1P/S1PRs 通路,评估对 NPSLE 小鼠神经行为学、血脑屏障通透性、神经组织病理变化及相关蛋白表达的影响。通过伊文思蓝渗透实验评估血脑屏障通透性,免疫荧光检测周细胞和内皮细胞分布,蛋白免疫印迹法(Western blot)分析相关蛋白表达。**结果:**NPSLE 小鼠表现出明显的认知障碍、焦虑和抑郁样行为,伴随海马区神经元损失、脑微血管周细胞脱失及血脑屏障通透性增加。分子水平上,NPSLE 小鼠脑组织中 S1P 和 S1PR2 表达上调,S1PR1、紧密连接蛋白 1(Zonula Occludens-1, ZO-1)和上皮钙黏蛋白(E-cadherin)表达下调。干预 S1P/S1PRs 信号通路明显改善行为异常,减轻海马区神经元损伤,降低伊文思蓝染料渗漏,增强紧密连接蛋白表达,改善周细胞脱失。**结论:**周细胞脱失是 NPSLE 血脑屏障功能障碍的关键早期事件,S1P/S1PRs 信号通路失衡在 NPSLE 病理过程中发挥重要作用。靶向干预 S1P/S1PRs 信号通路可保护周细胞功能,维持血脑屏障完整性,为 NPSLE 的病情评估和治疗提供新策略。

**【关键词】**神经精神性红斑狼疮;周细胞;血脑屏障;鞘氨醇-1-磷酸;鞘氨醇-1-磷酸受体;紧密连接蛋白

**【中图分类号】**R747.9;R593.24

**【文献标志码】**A

## The role of the sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptors signaling pathway in regulating pericyte function and blood-brain barrier integrity in a mouse model of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

Li Jianbin, Wu Rui

(Department of Rheumatology and Immunology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the pathological significance of pericyte loss in the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE) and the mechanism of action of the sphingosine 1-phosphate (S1P)/sphingosine 1-phosphate receptors (S1PRs) signaling pathway in regulating pericyte function and maintaining blood-brain barrier integrity. **Methods:** MRL/lpr mice were used to establish a model of NPSLE, and NPSLE mice were selected based on neurobehavioral changes. The experiment was designed to explore the changes in the expression of S1P/S1PRs pathway components in the brain tissue of NPSLE mice, intervene in the S1P/S1PRs pathway by using the S1P antagonist (FTY720), the S1PR1 agonist (SYL927), and the S1PR2 blocker (JTE-013), and assess their influence on neurobehavioral changes, blood-brain barrier permeability, histopathological changes in nervous tissue, and the expression of related proteins. Evans blue extravasation assay was used to assess blood-brain barrier permeability, immunofluorescence assay was used to observe the distribution of pericytes and endothelial cells, and Western blot was used to measure the expression of re-

lated proteins. **Results:** NPSLE mice exhibited significant cognitive impairment, anxiety, and depressive-like behaviors, accompanied by neuronal loss in the hippocampus, the loss of cerebral microvascular pericytes, and increased blood-brain barrier permeability. At the molecular level, there were increases in the expression levels of

作者简介:李建斌, Email: jianbinli2080@163.com,

研究方向:自身免疫性和自身炎症性疾病。

通信作者:吴 锐, Email: ndyfy00400@ncu.edu.cn。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20251126.1452.004>

(2025-11-27)

S1P and S1PR2 and reductions in the expression levels of S1PR1, ZO-1, and E-cadherin in the brain tissue of NPSLE mice. Intervention in the S1P/S1PRs signaling pathway significantly improved behavioral abnormalities, alleviated neuronal injury in the hippocampus, reduced Evans blue dye leakage, enhanced the expression of tight junction protein, and improved pericyte loss. **Conclusion:** Pericyte loss is a key event in the early stage of blood-brain barrier dysfunction in NPSLE, and dysregulation of the S1P/S1PRs signaling pathway plays a crucial role in the pathological process of NPSLE. Targeted intervention of the S1P/S1PRs signaling pathway can protect pericyte function, maintain blood-brain barrier integrity, and provide new strategies for the assessment and treatment of NPSLE.

**[Key words]** neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; pericyte; blood-brain barrier; sphingosine 1-phosphate; sphingosine 1-phosphate receptor; tight junction protein

神经精神性红斑狼疮 (neuropsychiatric SLE, NPSLE) 是系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 严重的并发症之一, 涉及广泛的神经精神症状, 严重影响患者生活质量并增加病死率<sup>[1]</sup>。NPSLE 的诊断主要依赖临床表现和排除其他疾病, 缺乏特异性生物标志物和影像学指标<sup>[2]</sup>。特别值得注意的是, NPSLE 的中枢神经系统病变活动性与 SLE 全身炎症活动状态常不一致, 难以准确评估病情活动度<sup>[3]</sup>。血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 功能障碍在 NPSLE 发病中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。传统观点认为自身抗体和炎症介质通过受损 BBB 进入中枢神经系统, 引发神经炎症和神经元损伤<sup>[5]</sup>。既往研究主要集中于内皮细胞损伤对 BBB 通透性的影响, 而忽视了周细胞在这一过程中的作用<sup>[6]</sup>。周细胞作为脑微血管的重要组成部分, 在 BBB 完整性维持中可能比内皮细胞扮演更为关键的角色<sup>[7]</sup>。鞘氨醇-1-磷酸 (Sphingosine-1-phosphate, S1P) 及其受体 (S1P receptors, S1PRs) 信号通路在免疫调节和血管生物学中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。S1PR1 和 S1PR2 在血管完整性调控中表现出拮抗作用: S1PR1 促进血管稳定性, 而 S1PR2 则与血管通透性增加相关<sup>[9-10]</sup>。本研究旨在探索 NPSLE 发病过程中周细胞脱失的病理作用, 明确 S1P/S1PRs 信号通路对周细胞功能和 BBB 完整性的调控机制, 为 NPSLE 的病情评估和治疗提供新的理论基础和潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 MRL/lpr 雌性小鼠 30 只及墨菲罗斯大鼠/MpJ 小鼠 (Murphy Roths Large/MpJ, MRL/MpJ) 雌性对照鼠 6 只 (6 周龄, 体质量 18~22 g) 由常州卡文斯实验动物有限公司提供

[实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2018-0003]。所有小鼠饲养于 SPF 级屏障环境, 温度 22~24 °C、相对湿度 50%~60%, 自由摄取饲料与饮水, 明暗周期 12 h/12 h。本研究方案经南昌大学第一附属医院动物伦理委员会审查批准 (审批号: CDYFY-IACUC-202210QR007)。

### 1.2 主要试剂与仪器

本研究使用抗体、二抗、试剂及仪器信息如下: 抗体为兔抗 S1P 多克隆抗体 (ABclonal)、兔抗 S1PR1 多克隆抗体 (Proteintech)、兔抗 S1PR2 多克隆抗体 (Proteintech)、兔抗 ZO-1 多克隆抗体 (Proteintech)、兔抗 E-cadherin 多克隆抗体 (Proteintech)、兔抗 NG2 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology)、兔抗 CD31 单克隆抗体 (碧云天); 二抗为山羊抗兔 IgG HRP (Proteintech)、山羊抗小鼠 IgG HRP (Proteintech)、山羊抗兔 IgG Dylight488 (Abbkine)、山羊抗小鼠 IgG Dylight594 (Abbkine); 试剂为 DAPI 染色试剂盒 (Sigma)、芬戈莫德 (Fingolimod, FTY720) (Sigma-Aldrich)、SYL927 (中国医学科学院药物研究所)、JTE-013 (Tocris); 仪器为荧光显微镜 (NE620 江南)、全自动酶标仪 (Varioskan LUX 赛默飞)。

### 1.3 方法

1.3.1 动物模型建立、分组与给药 本研究选用 MRL/lpr 雌性小鼠品系, 该品系是国际公认的可自发发展出狼疮样疾病的动物模型, 因其部分个体表现出的神经精神症状与人类患者高度相似, 是研究神经精神狼疮的理想模型<sup>[11]</sup>。MRL/MPJ 小鼠则作为健康对照, 尽管该品系也可能表现出免疫异常, 但其狼疮症状通常在 3 月龄后才开始出现。从 6 周龄开始对所有小鼠进行神经行为学测试<sup>[12]</sup>, 与基线相比, 行为学指标改变幅度大于 20% 的 MRL/lpr 小鼠被定义为具有 NPSLE 表型。据此, 将所有动物分为 6 组 (每组  $n=6$ ): 健康对照组 (行为学无异常的 MRL/MPJ 小鼠)、SLE 模型对照组 (未表现出 NPSLE 症状的 MRL/lpr 小鼠)、NPSLE 模型组 (表现出 NPSLE 症状的 MRL/lpr 小鼠) 以及 3 个治疗组, 即 S1P 拮抗组、S1PR1 激动组和 S1PR2 阻断组。所选 S1P 拮抗剂 (FTY720)、S1PR1 激动剂 (SYL927) 和 S1PR2 阻断剂 (JTE-013) 均基于先前的研究<sup>[13-15]</sup>, 剂量选择考虑了药物的药代动力学特性及预期治疗效果。各组给药方案为每周 3 次, 持续 3 周: 健康对照组、

SLE 模型对照组和 NPSLE 模型组均灌胃给予 0.2 mL 无菌生理盐水;S1P 拮抗组灌胃给予 0.2 mL FTY720 溶液;S1PR1 激动组灌胃给予 0.2 mL SYL927 溶液;S1PR2 阻断组则腹腔注射 0.2 mL JTE-013 溶液。

1.3.2 神经行为学测试 ①旷场实验 (open-field test, OFT):于测试前 1 h 将待测小鼠放入测试房间适应环境,测试开始后,关闭房间灯光,将小鼠置于底面为 50 cm × 50 cm 的黑色敞箱中待其自由活动 1 min 后记录小鼠 5 min 内在场活动中的总路程和进入中央区的次数。②新物体识别实验 (novel object-recognition test, ORT):实验场地为体积 50 cm × 50 cm × 80 cm 的四周封闭开敞箱。用于检测的物体是 3 个不同的物体:立方体 A、圆锥 B 和圆柱体 C。探索结束后用 75% 乙醇擦拭物体表面,去除嗅觉线索。第 1 天,让小鼠适应 50 min,第 2 天进行两个阶段实验,相隔 1 h。第一阶段时,将物体 A 和 C 放在相反位置,让小鼠适应 10 min。第二个阶段时,物体 C 换成新物体 B。第二阶段实验中,小鼠对物体 A 及 B 探索的时间 (T) 将分别被记录,计算每只小鼠的识别指数:  $[(TB-TA)/(TA+TB)] \times 100\%$ 。公式中,TA 为小鼠对旧物体 (A) 的探索时间, TB 为小鼠对新物体 (B) 的探索时间。③强迫游泳实验:将单只小鼠置于直径 25 cm、高 30 cm 的圆柱形容器中,水深 15 cm,水温  $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ,实验总时长 6 min,并记录 6 min 内小鼠在水中累计不动的时间 (单位:s)。

1.3.3 样本采集与处理 给药结束后,小鼠 3% 戊巴比妥钠 3 mL/kg 深麻醉,眼眶取血 3 500 r/min 离心 (离心半径 6.5 cm) 15 min,取上清液并于  $-80 ^\circ\text{C}$  保存;用预冷的生理盐水心脏灌注,冰上分离脑组织,液氮速冻至  $-80 ^\circ\text{C}$  保存。

1.3.4 苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE) 多聚甲醛固定好脑组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋并切片 ( $7\sim 10 \mu\text{m}$ )。HE 染色后封片。

1.3.5 尼氏染色 脑片制备同 1.3.4。将脱蜡后的切片根据尼氏染色试剂盒进行操作,乙醇脱水,二甲苯透明后封片。200 倍显微镜下观察尼氏染色情况。

1.3.6 免疫组织化学染色 脑片制备同 1.3.4。冷却后 PBS (pH 7.4) 洗 3 次,0.1% Triton-X-100 通透 5 min,继续 PBS 漂洗 3 次,5% 山羊血清封闭 30 min,甩干多余液体,加入适量兔抗鼠 ZO-1 抗体 (1:200)、兔抗鼠 E-cadherin 抗体 (1:100)、兔抗鼠 NG2 抗体 (1:200)、兔抗鼠 CD31 抗体 (1:200),  $4 ^\circ\text{C}$  下孵育过夜。切片  $37 ^\circ\text{C}$  复温 1 h,倾倒入一抗,并用 0.1 mol/L PBS 清洗 3 次。吸干 PBS 液,避光条件下加入相应二抗,山羊抗兔 IgG Dylight488 (1:200),  $37 ^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 洗 3 次。加 DAB 显色,显微镜下控制显色时间,阳性显色为棕黄色颗粒,观察并拍照。

1.3.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 取脑组织并在 RIPA 裂解缓冲液中匀浆,并用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分高等量的蛋白质,并转移到 PVDF 膜上,在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h 后,抗体稀释液稀释一抗

(S1P、S1PR1、S1PR2、 $\beta$ -actin 均按照 1:1 000 稀释,ZO-1 按照 1:5 000 稀释),  $4 ^\circ\text{C}$  过夜。稀释二抗 (山羊抗小鼠 IgG HRP 1:5 000,山羊抗兔 IgG HRP 1:5 000 稀释),将膜置于稀释后的二抗中室温摇床低速孵育 1 h。然后用化学发光试剂盒对印迹进行显影,并通过 Image J 进行灰度和面积计算。

1.3.8 伊文思蓝测定 血脑屏障通透性根据伊文思蓝染料外渗进行评估。将 2% 伊文思蓝染料 (4 mL/kg) 注入尾静脉,使其循环 1~2 h。用生理盐水经心脏灌注小鼠。然后采集大脑,移除脑膜和脉络丛,解剖皮质并称重 (g)。将皮质在 2 mL PBS 中匀浆,然后在  $4 ^\circ\text{C}$  下加入 2 mL 50% 三氯乙酸后用涡旋混合 2 min,沉淀蛋白质。均质化的样品保持  $4 ^\circ\text{C}$  30 min,并在 18 000 g 在  $4 ^\circ\text{C}$  离心 10 min。将 250  $\mu\text{L}$  上清液放入微量培养板中,使用酶标仪在 610 nm 波长下进行检测。用标准曲线计算伊文思蓝的含量。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。经检验数据符合正态分布且方差齐性时,采用单因素方差分析比较组间差异;若数据不满足方差齐性,则组间多重比较采用 Dunnett's *t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

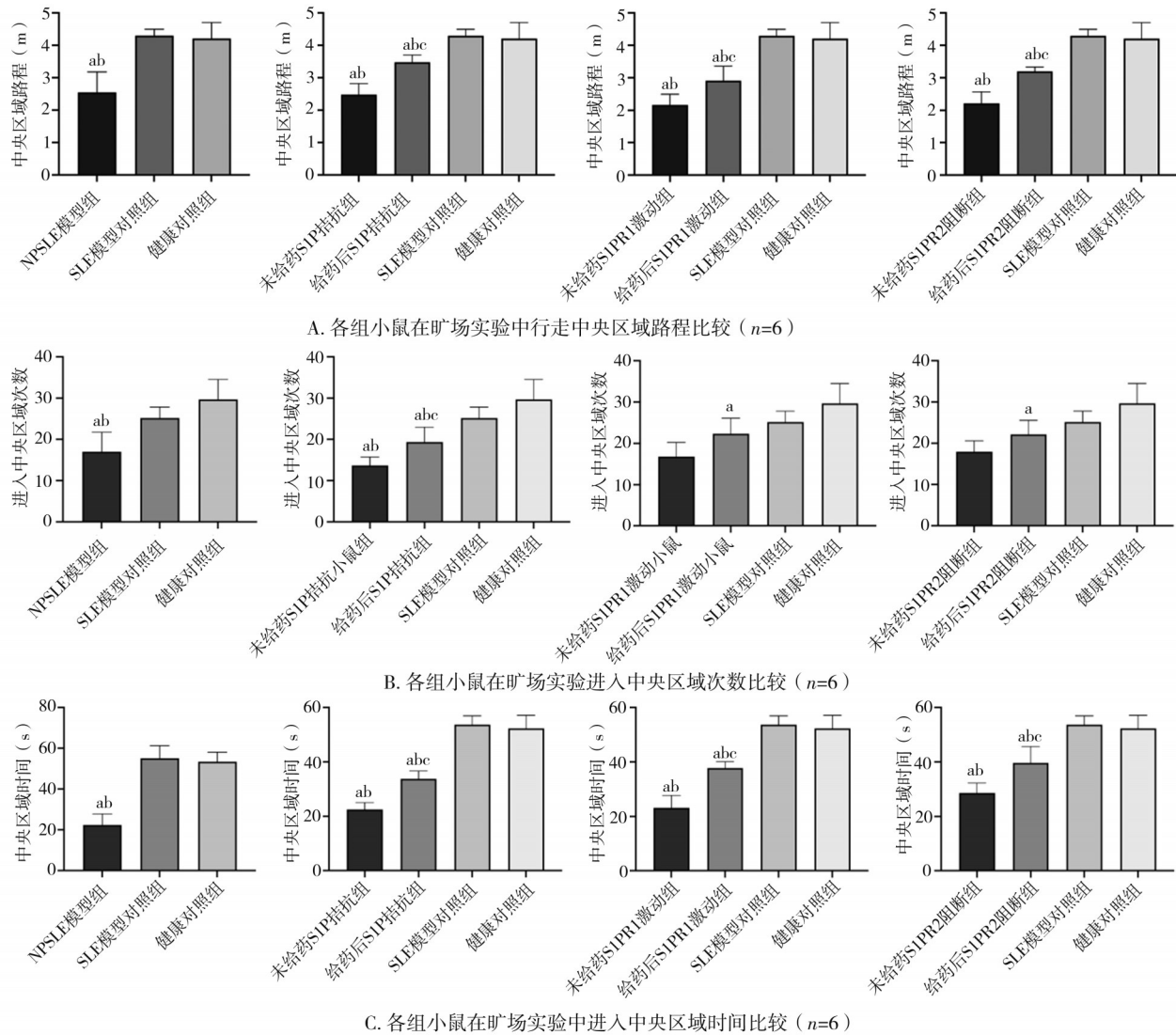
## 2 结果

### 2.1 调控 S1P/S1PRs 对 NPSLE 小鼠认知功能影响

本研究通过新物体识别、旷场及强迫游泳测试,评估了靶向 S1P/S1PRs 信号通路的治疗对 NPSLE 小鼠认知、焦虑及抑郁样病理行为的影响。在旷场测试中 (图 1),NPSLE 模型组小鼠表现出明显的焦虑样行为,其核心指标“中央区域停留时间”与对照组相比明显降低 ( $F=67.000, P<0.001$ )。所有药物治疗均能明显改善此项指标 (例如 S1P 拮抗剂治疗分析,  $F=112.200, P<0.001$ )。在强迫游泳测试中 (图 2),NPSLE 模型组的抑郁样行为加重,核心指标“静止不动时间”明显增加 ( $F=262.800, P<0.001$ )。3 种药物治疗均能有效减少静止时间 (例如 S1P 拮抗剂治疗分析,  $F=183.600, P<0.001$ )。在新物体识别测试中 (图 3),通过评估核心指标“分辨指数”,发现 NPSLE 模型组的认知功能显著受损 ( $F=12.800, P<0.001$ )。各治疗方案均能显著提升该指数,表明治疗有效恢复了小鼠的认知缺陷 (例如 S1P 拮抗剂治疗分析,  $F=17.420, P<0.001$ )。上述结果显示,靶向干预 S1P/S1PRs 信号通路能够有效改善 NPSLE 小鼠的认知障碍、焦虑和抑郁样行为。

### 2.2 抑制 S1P/S1PRs 对小鼠脑组织结构 HE 染色观察中神经元数量、形态和血管状态的影响

HE 染色结果显示,SLE 模型对照组小鼠脑组织结构完整,海马区神经元数量充足且排列有序,仅见轻度血管充血 (红箭头);而 NPSLE 模型组表现为明显病理改变,海马区神经元明显减少,大量神经元固缩深染坏死 (黄箭头),伴有炎



注:a,与健康对照组比较, $P<0.001$ ;b,与SLE模型对照组比较, $P<0.001$ ;c,与对应的未给药组比较, $P<0.001$

图1 S1P/S1PRs信号通路调控对NPSLE小鼠旷场实验中表现的影响

性细胞浸润(黑箭头);经S1P拮抗剂或S1PR2阻断剂处理后,脑组织病理改变明显减轻,海马区神经元数量及形态学基本保持,仅见少量神经元坏死(黄箭头),S1PR2阻断剂组可见轻微血管扩张(红箭头);S1PR1激动剂处理组虽较模型组有所改善,但神经元损伤仍较明显(黄箭头),提示S1P/S1PRs相关通路在NPSLE病理过程中发挥重要调控作用(图4)。

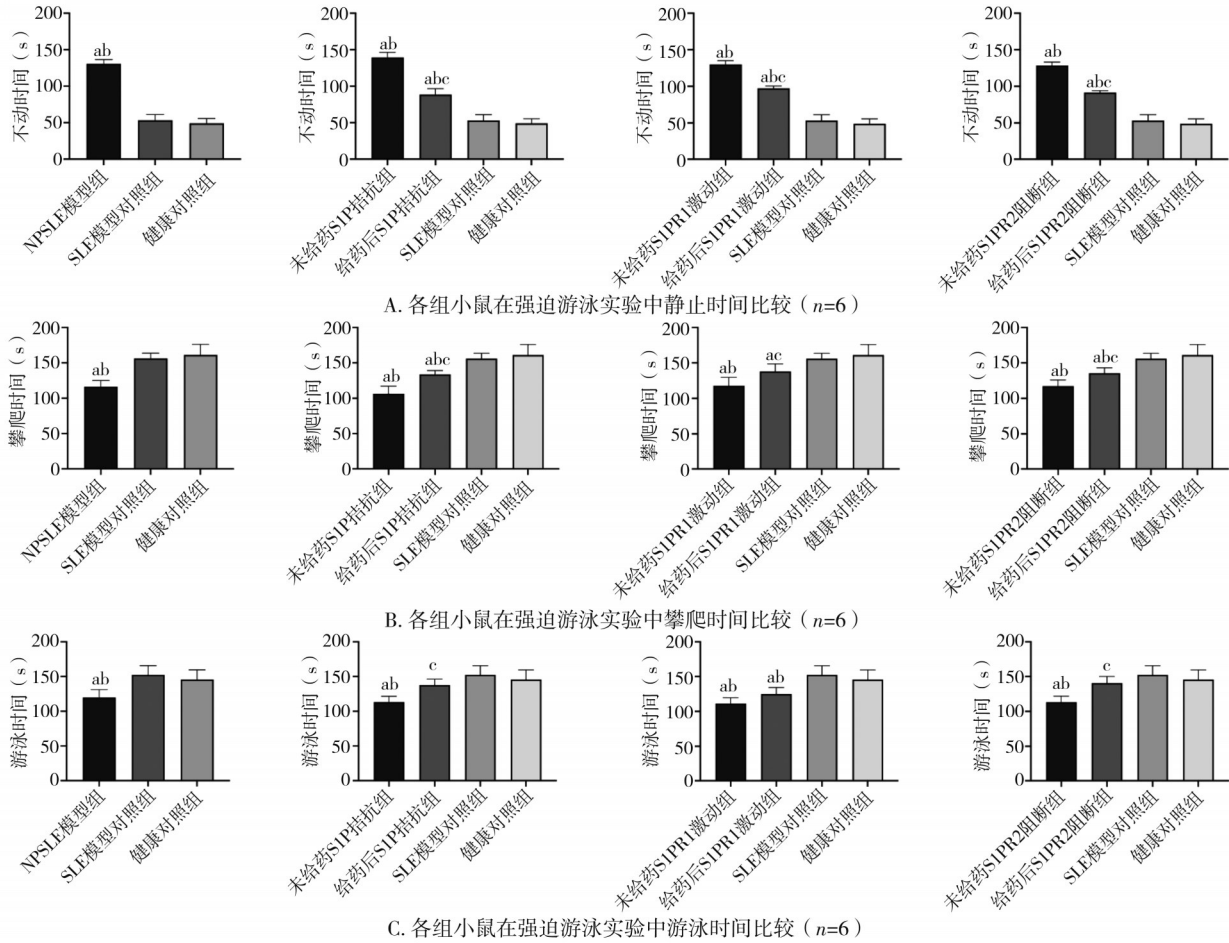
### 2.3 抑制S1P/S1PRs对小鼠海马区神经细胞损伤的尼氏染色观察中形态学和尼氏小体阳性面积的影响

尼氏染色结果的定性观察显示,SLE模型对照组小鼠海马区神经细胞结构完整,胞质内尼氏小体丰富;而NPSLE模型组神经细胞损伤明显,表现为细胞数量减少、出现空泡化以及尼氏小体不明显。为了对神经细胞损伤进行定量评估,本课题组分析了尼氏小体的阳性面积百分比。在3种不同的治疗方案中,各实验组(对照组、模型组、治疗组)的尼氏小

体阳性面积差异有统计学意义(S1P拮抗剂: $F=245.600, P<0.001$ ;S1PR1激动组: $F=247.800, P<0.001$ ;S1PR2阻断组: $F=344.100, P<0.001$ )。事后多重比较分析进一步确认,经S1P拮抗剂、S1PR1激动剂或S1PR2阻断剂处理后,海马区神经细胞损伤程度均明显减轻,各处理组的尼氏小体阳性面积较NPSLE模型组均明显升高( $P<0.001$ ),但仍低于SLE模型对照组( $P<0.001$ )。这些结果进一步证实S1P信号通路在NPSLE神经细胞损伤中的重要作用,以及调控该通路对神经保护的潜在价值(图5)。

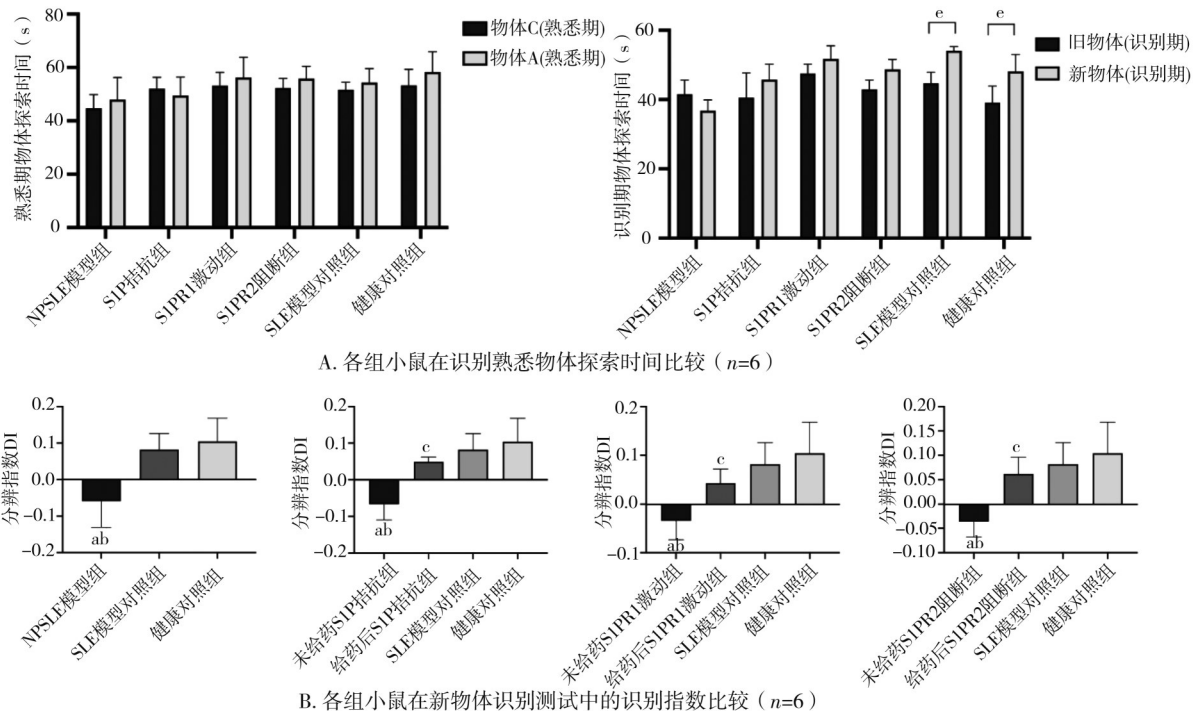
### 2.4 抑制S1P/S1PRs对NPSLE小鼠血脑屏障通透性的影响

通过对尾静脉注射2% EB溶液的小鼠进行心脏灌注,并用酶标仪测定脑组织EB渗透率( $\mu\text{g/g}$ ),以评估各组小鼠血脑屏障的通透性。各组间的EB渗透水平存在显著的总体差异( $F=156.600, P<0.001$ )。事后多重比较分析显示,与对照组相比,模型组的血脑屏障通透性明显增加( $P<0.001$ );而



注: a, 与健康对照组比较,  $P < 0.001$ ; b, 与 SLE 模型对照组比较,  $P < 0.001$ ; c, 与对应的未给药组比较,  $P < 0.001$

图 2 S1P/S1PRs 信号通路调控对 NPSLE 小鼠强迫游泳实验中表现的影响



注: a, 与健康对照组比较,  $P < 0.001$ ; b, 与 SLE 模型对照组比较,  $P < 0.001$ ; c, 与对应的未给药组比较,  $P < 0.001$

图 3 S1P/S1PRs 信号通路调控对 NPSLE 小鼠新物体识别测试中表现的影响

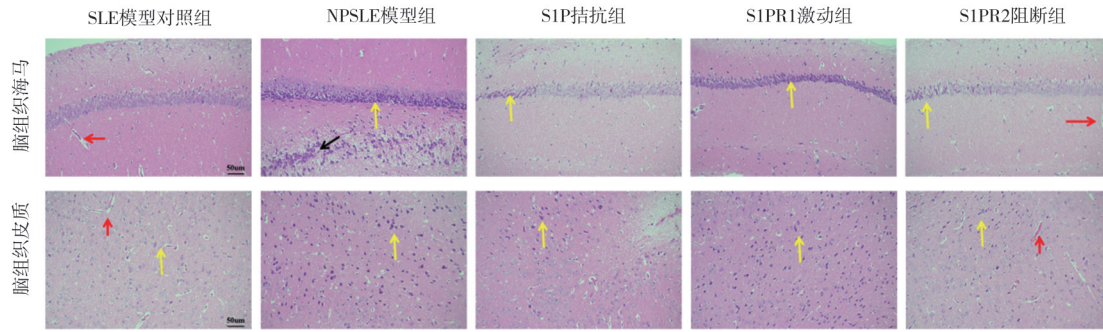
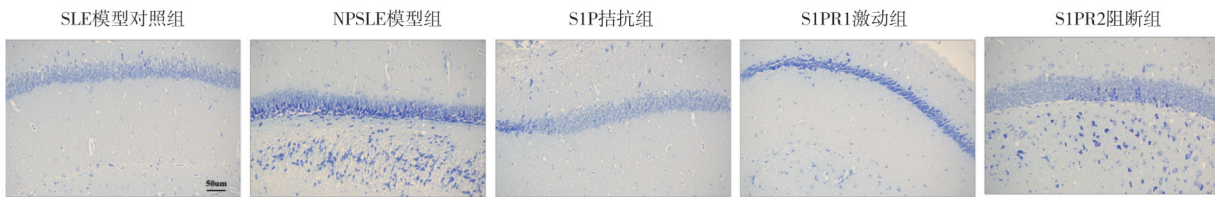
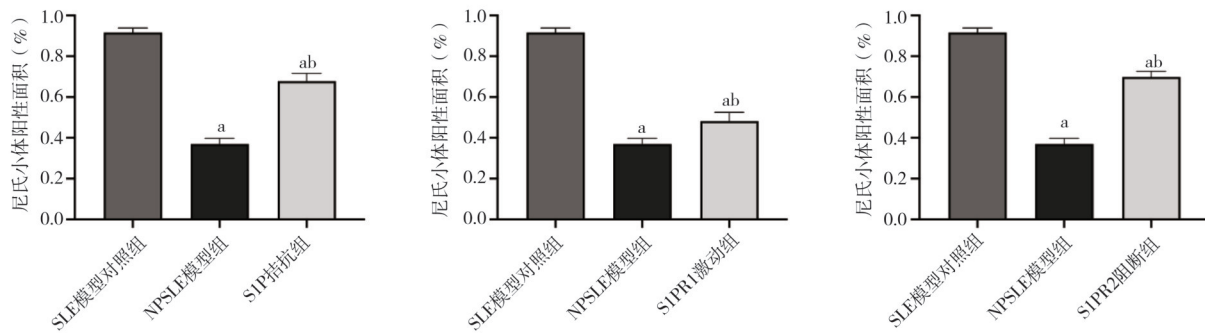


图 4 抑制 S1P/S1PRs 对 NPSLE 小鼠脑组织海马和皮质区的影响 (HE, 200x)



A. 各组小鼠海马区神经细胞的尼氏染色显微图像 (200 ×)

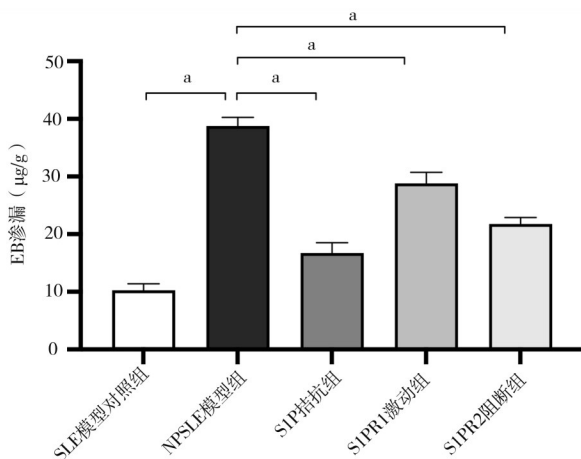


B. 各组小鼠海马区尼氏小体阳性面积的定量分析

注: a, 与 SLE 模型对照组比较,  $P < 0.001$ ; b, 与 NPSLE 模型组比较,  $P < 0.001$

图 5 S1P/S1PRs 信号通路对 NPSLE 小鼠海马区神经细胞损伤的保护作用

与模型组相比, S1P 拮抗组 ( $P < 0.001$ )、S1PR1 激动组 ( $P < 0.001$ ) 和 S1PR2 阻断组 ( $P < 0.001$ ) 的血脑屏障渗透性均减少, 见图 6。



注: a,  $P < 0.001$

图 6 EB 测定各组小鼠血脑屏障渗透性

### 2.5 抑制 S1P/S1PR2 对不同给药组的小鼠脑组织中蛋白表达情况

为了探究 S1P/S1PRs 信号通路相关蛋白的表达变化, 本课题组采用 Western blot 技术对脑组织样本进行检测。结果显示, 各实验组在 S1P ( $F = 155.200, P < 0.001$ )、S1PR1 ( $F = 74.760, P < 0.001$ )、S1PR2 ( $F = 123.900, P < 0.001$ ) 以及紧密连接蛋白 E-cadherin ( $F = 119.100, P < 0.001$ ) 和 ZO-1 ( $F = 129.900, P < 0.001$ ) 的表达水平上均有统计学意义。事后多重比较分析显示, 与 SLE 模型对照组相比, NPSLE 模型组的 S1P 和 S1PR2 蛋白表达明显升高, 而 S1PR1 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。同时, NPSLE 模型组的 E-cadherin 和 ZO-1 蛋白表达亦减少 ( $P < 0.01$ )。经过治疗干预后, 与 NPSLE 模型组相比, S1P 拮抗组和 S1PR2 阻断组的 S1P 和 S1PR2 蛋白表达减少 ( $P < 0.01$ )。S1PR1 激动组的 S1PR1 蛋白表达则明显增加 ( $P < 0.01$ )。此外, 所有治疗组的 E-cadherin 和 ZO-1 蛋白表达水平均较 NPSLE 模型组明显增加 ( $P < 0.01$ ), 表明治疗有效恢复了紧密连接蛋白的表达, 见图 7。

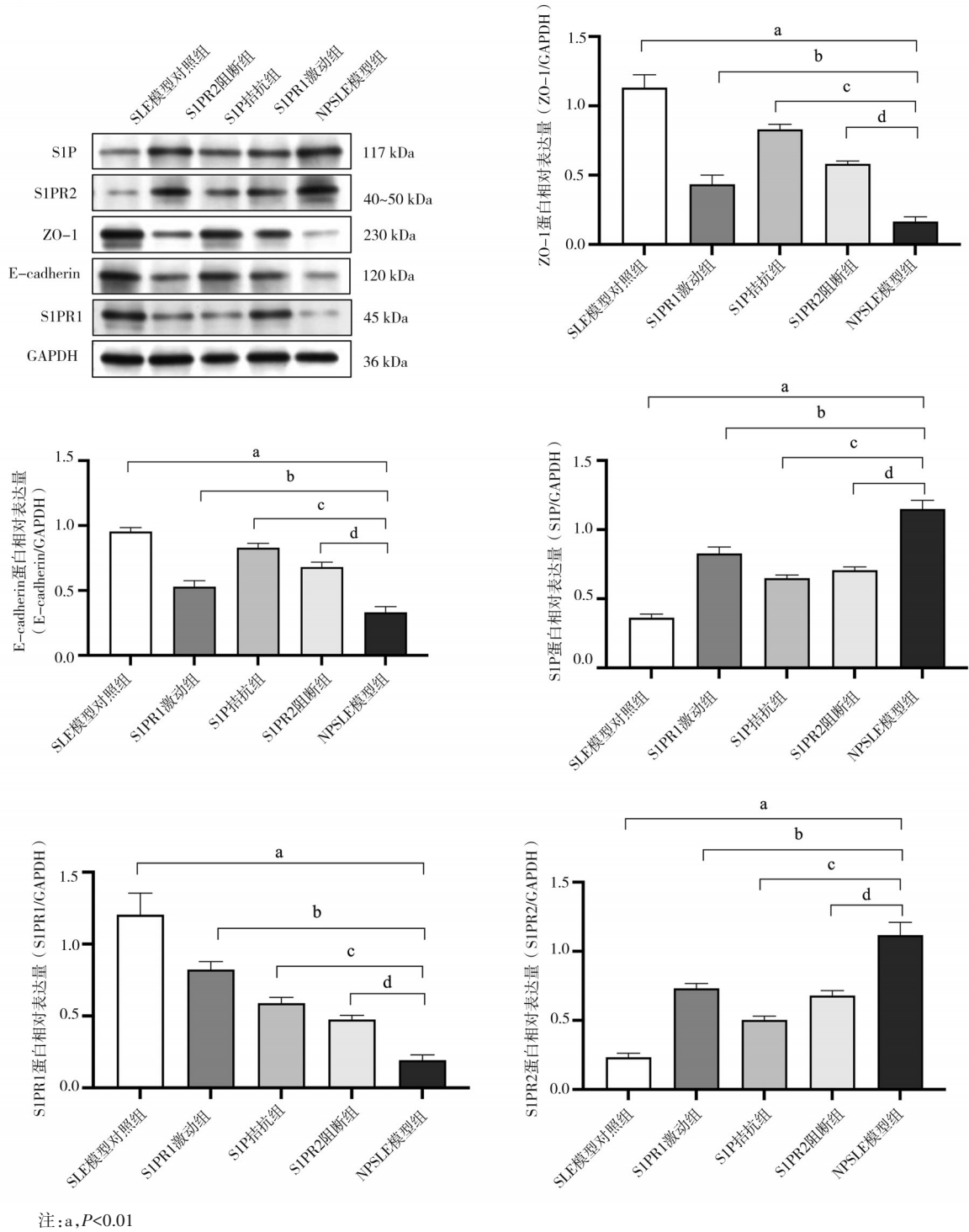
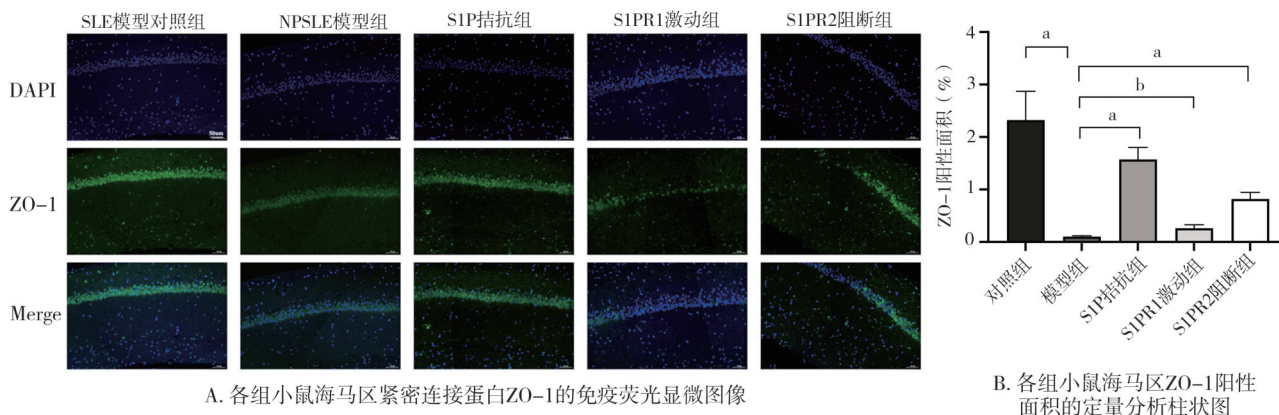


图7 各组小鼠S1P/S1PRs信号通路相关蛋白表达水平的比较

### 2.6 NPSLE小鼠海马区内皮细胞和周细胞表达情况

通过对脑组织进行免疫荧光染色,本课题组观察了皮质微血管中内皮细胞(CD31)、周细胞(NG2)以及E-cadherin和ZO-1的分布和表达情况。各实验组在所有检测指标的蛋白表达水平上差异有统计学意义。对于内皮细胞标志物CD31的阳性面积,组间差异明显( $F=83.650, P < 0.001$ )。同样,周细胞标志物NG2的表达也显示出显著的组间差异( $F=$

$43.270, P < 0.001$ )。在紧密连接蛋白方面,E-cadherin的表达在各组间存在显著差异( $F=125.700, P < 0.001$ ),ZO-1的表达同样如此( $F=34.380, P < 0.001$ )。定性观察显示,相较于NPSLE模型组,S1P拮抗组、S1PR1激动组和S1PR2阻断剂组的小鼠E-cadherin和ZO-1表达有所增加,表明紧密连接得到增强。并且,这些治疗组的小鼠在周细胞脱落方面较NPSLE模型组有明显改善(图8~10)。

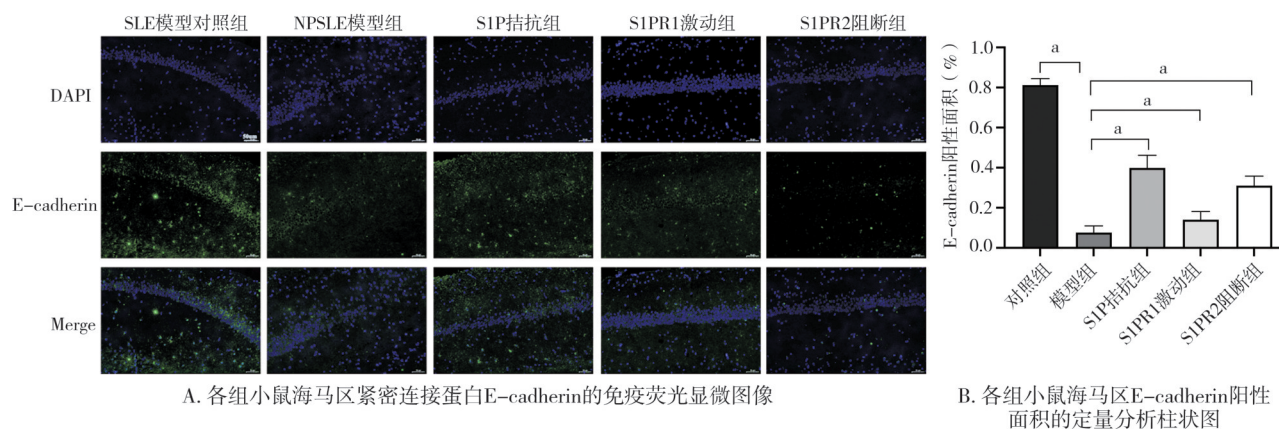


A. 各组小鼠海马区紧密连接蛋白ZO-1的免疫荧光显微图像

B. 各组小鼠海马区ZO-1阳性面积的定量分析柱状图

注:a, $P<0.01$ ;b, $P<0.05$

图8 调控S1P/S1PRs信号通路对不同给药组小鼠脑组织ZO-1分布的影响(免疫荧光染色,200×)



A. 各组小鼠海马区紧密连接蛋白E-cadherin的免疫荧光显微图像

B. 各组小鼠海马区E-cadherin阳性面积的定量分析柱状图

注:a, $P<0.01$

图9 调控S1P/S1PRs信号通路对不同给药组小鼠脑组织E-cadherin分布的影响(免疫荧光染色,200×)

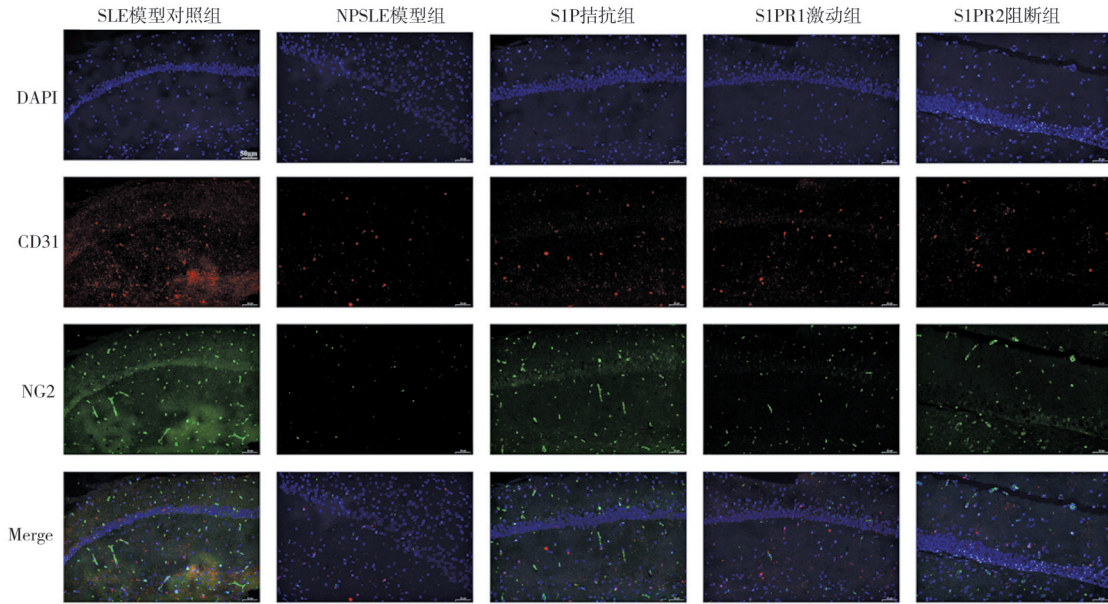
### 3 讨论

本研究系统探讨了NPSLE小鼠模型中周细胞脱失的病理意义及S1P/S1PRs信号通路对血脑屏障的调控机制。结果显示,周细胞脱失是NPSLE血脑屏障功能障碍的关键早期事件,S1P/S1PRs信号失衡在病理过程中发挥核心作用。

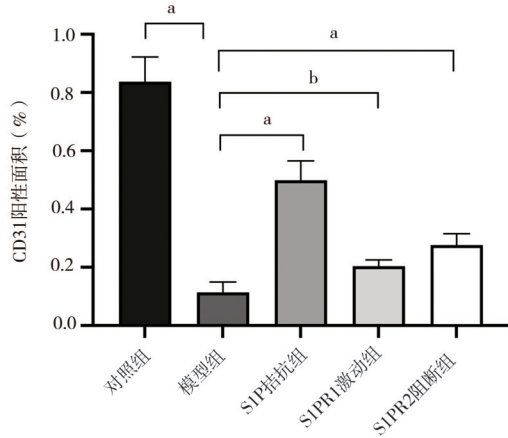
NPSLE小鼠表现出典型的认知障碍、焦虑和抑郁样行为,与人类患者临床表现高度一致<sup>[16]</sup>。病理学检查显示海马区神经元大量丢失,存活神经元固缩坏死,伴有炎性细胞浸润。尼氏染色证实神经细胞严重损伤,支持NPSLE神经精神症状源于中枢神经系统实质性损伤<sup>[17]</sup>。这种神经损伤与血脑屏障破坏密切相关,提示两者间可能存在相互关系。分子水平上,NPSLE小鼠S1P和S1PR2表达上调,S1PR1及紧密连接蛋白ZO-1、E-cadherin表达下降<sup>[18]</sup>。

S1PR1通过Gi-PI3K通路促进血管稳定,而S1PR2通过G12/13-Rho-ROCK轴增加血管通透性<sup>[9-10]</sup>。正常状态下两者平衡维持血管屏障完整性,但NPSLE中S1PR2过度表达和S1PR1相对不足打破了这种平衡,导致血脑屏障受损。

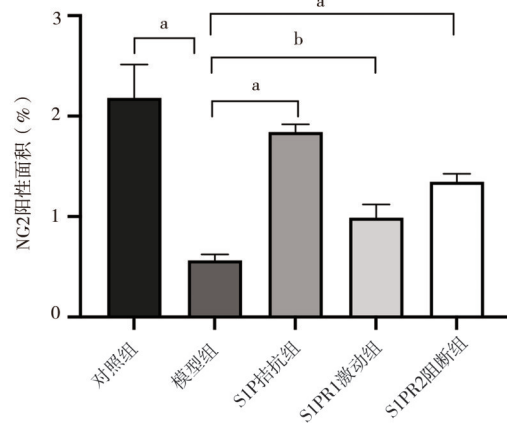
靶向干预S1P/S1PRs通路显示良好治疗效果。FTY720、SYL927和JTE-013均能改善病理表现,但S1P拮抗剂和S1PR2阻断剂效果优于S1PR1激动剂。这种差异反映了疾病状态下的信号失衡特点,由于S1PR2过度激活是血脑屏障损伤的主要驱动力,直接阻断上调的S1PR2比激活下调的S1PR1更有效。S1PR2还能激活SAPK和NF-κB等炎症通路,放大炎症反应<sup>[19]</sup>,因此阻断S1PR2能同时抑制多条致病通路。关于S1P/S1PRs与周细胞的相互作用,Armulik A等<sup>[7]</sup>证明周细胞是血脑屏障完整性的必需组分。Yanagida K等<sup>[20]</sup>发现S1P通过S1PR1调节周细胞增殖和迁移,Kono M等<sup>[21]</sup>证实周细胞



A. 各组小鼠海马区紧密连接蛋白CD31和NG2的免疫荧光显微图像



B. 各组小鼠海马区CD31阳性面积的定量分析柱状图



C. 各组小鼠海马区NG2阳性面积的定量分析柱状图

注: a,  $P < 0.01$ ; b,  $P < 0.05$

图 10 调控 S1P/S1PRs 信号通路对不同给药组小鼠脑组织周细胞(内皮细胞)和周细胞(NG2)分布的影响(免疫荧光染色, 200 ×)

S1PR2参与血管紧张度调控。本研究的免疫荧光显示 NPSLE 小鼠 NG2 阳性周细胞覆盖率明显降低,这种脱失与 S1P/S1PRs 失衡高度相关。药物干预后周细胞覆盖率恢复伴随血脑屏障功能改善,提示该通路在周细胞功能调控中的关键作用。伊文思蓝实验直接证实血脑屏障功能改变。NPSLE 模型组通透性明显增加,3种药物均能有效降低染料渗漏。这与分子变化一致,药物不仅恢复了紧密连接蛋白表达,还改善了周细胞覆盖率。血脑屏障恢复伴随神经病理损伤减轻,包括海马神经元增加和尼氏小体恢复。这揭示了保护周细胞和血脑屏障可阻断外周炎症因子进入中枢,减轻神经炎症和损伤,改善神经精神症状。为 NPSLE 治疗提供了新策略,即

通过靶向血管系统保护神经系统。

不同给药途径基于药理学考虑和临床转化潜力。FTY720作为FDA批准的口服药物,安全性已被验证,可直接用于临床研究。SYL927具有高选择性和低不良反应。JTE-013虽采用腹腔注射,但其优异疗效提示 S1PR2 阻断策略的潜力<sup>[22-23]</sup>。3种药物均能有效穿透血脑屏障,为比较研究提供了基础。尽管取得一些进展,本研究仍有局限。MRL/lpr 模型与人类 NPSLE 存在差异,对全身免疫调控研究不足, S1P/S1PRs 通路精确机制仍需阐明。未来应深入探索周细胞脱失的触发机制、评估联合治疗策略、开发基于周细胞功能的生物标志物。考虑到视网膜与脑微血管的相似性,探索视网膜评估作

为无创监测工具具有重要前景。

综上所述,本研究揭示了周细胞脱失在 NPSLE 发病机制中的关键作用,深入阐明了 S1P/S1PRs 信号通路在调控周细胞功能和血脑屏障完整性中的重要意义。本研究显示,靶向干预 S1P/S1PRs 信号通路可以有效保护周细胞功能,维持血脑屏障完整性,从而在分子、细胞、组织和行为学多个层面明显减轻 NPSLE 相关的神经精神损害。这些发现不仅为理解 NPSLE 的发病机制提供了新的视角,更为 NPSLE 的病情评估和治疗提供了具有重要临床转化价值的新理论基础和潜在治疗靶点。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 李建斌:负责实施研究、数据收集与分析及论文初稿撰写;吴锐:负责研究方案设计、实验指导及论文审阅与修改

## 参 考 文 献

- [1] 陈丹丹,黄文瀚,任飞凤,等. 20 例神经精神性狼疮患者的临床分析[J]. 重庆医科大学学报,2022,47(1):16-20.  
Chen DD, Huang WH, Ren FF, et al. Clinical study of 20 patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus[J]. J Chongqing Med Univ, 2022, 47(1): 16-20.
- [2] Bertsias GK, Ioannidis JA, Aringer M, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations; report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(12): 2074-2082.
- [3] Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers[J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(10): 579-596.
- [4] Nikolopoulos D, Manolakou T, Polissidis A, et al. Microglia activation in the presence of intact blood-brain barrier and disruption of hippocampal neurogenesis *via* IL-6 and IL-18 mediate early diffuse neuropsychiatric lupus[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(5): 646-657.
- [5] Shimizu F, Nakamori M. Blood - brain barrier disruption in neuro-immunological disease[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(19): 10625.
- [6] Engelhardt S, Patkar S, Ogunshola OO. Cell-specific blood - brain barrier regulation in health and disease: a focus on hypoxia[J]. British J Pharmacology, 2014, 171(5): 1210-1230.
- [7] Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood - brain barrier[J]. Nature, 2010, 468(7323): 557-561.
- [8] Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, et al. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases[J]. BioFactors, 2012, 38(5): 329-337.
- [9] Cantalupo A, Gargiulo A, Dautaj E, et al. S1PR1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1) signaling regulates blood flow and pressure[J]. Hypertension, 2017, 70(2): 426-434.
- [10] Zhang GQ, Yang L, Kim GS, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2(S1PR2) in acute vascular inflammation[J]. Blood, 2013, 122(3): 443-455.
- [11] Gulinello M, Putterman C. The MRL/lpr mouse strain as a model for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 207504.
- [12] Wu CY, Yang LD, Li Y, et al. Effects of exercise training on anxious-depressive-like behavior in Alzheimer rat[J]. Med Sci Phys Exerc, 2020, 52(7): 1456-1469.
- [13] Okazaki H, Hirata D, Kamimura T, et al. Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: therapeutic potential in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2002, 29(4): 707-716.
- [14] 高歌,金钰莹,刘卫东,等. JTE-013 通过肥大细胞抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(12): 1071-1076.  
Gao G, Jin YY, Liu WD, et al. JTE-013 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis *via* mast cells in mice[J]. Immunol J, 2020, 36(12): 1071-1076.
- [15] 肖琼,李彤,汪小润,等. 治疗银屑病药物 SYL927 原料药中有关物质的合成[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(15): 1708-1715.  
Xiao Q, Li T, Wang XJ, et al. Synthesis of related substances of SYL927 used for treatment of psoriasis[J]. Chin J New Drugs, 2016, 25(15): 1708-1715.
- [16] Bendorius M, Po C, Muller S, et al. From systemic inflammation to neuroinflammation: the case of neurolupus[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3588.
- [17] Lu L, Wang HL, Liu X, et al. Pyruvate kinase isoform M2 impairs cognition in systemic lupus erythematosus by promoting microglial synaptic pruning *via* the  $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 229.
- [18] Finley A, Chen ZM, Esposito E, et al. Sphingosine 1-phosphate mediates hyperalgesia *via* a neutrophil-dependent mechanism[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55255.
- [19] Skoura A, Hla T. Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype[J]. Cardiovasc Res, 2008, 82(2): 221-228.
- [20] Yanagida K, Liu CH, Faraco G, et al. Size-selective opening of the blood - brain barrier by targeting endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(17): 4531-4536.
- [21] 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.
- [22] Cruz-Orengo L, Daniels BP, Dorsey D, et al. Enhanced sphingosine-1-phosphate receptor 2 expression underlies female CNS autoimmunity susceptibility[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2571-2584.
- [23] Skoura A, Michaud J, Im DS, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 81-85.

(收稿:2025-05-06;修回:2025-06-17;录用:2025-07-08)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

李建斌,吴锐. S1P/S1PRs 信号通路调控周细胞功能和血脑屏障完整性在 NPSLE 小鼠中的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(2): 222-231.