

文章编号:1003-2754(2019)11-0998-06

受体介导的 1-磷酸鞘氨醇信号通路 在局灶性脑缺血损伤中作用

李洁琦^{1,2}, 李萌², 闵连秋¹

摘要: **目的** 探讨 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)受体亚型 S1P3 在局灶性脑缺血再灌注过程中的作用及其机制,为其作为药物靶点应用到脑缺血再灌注损伤的治疗提供理论依据。**方法** 大脑中动脉闭塞法制备局灶性脑缺血再灌注的小鼠模型。用特异性 S1P3 拮抗剂 CAY10444 干预来评测 S1P3 在脑缺血再灌注中的作用。通过计算药物干预前后脑梗死体积、神经组织学评分和神经退行性变指标评估各组脑损伤程度。采用 HE 染色以及通过 Iba1 和 BrdU / Iba1 免疫组织化学染色方法观察和分析小胶质细胞的活化、形态转化和增殖情况。**结果** CAY10444 抑制 S1P3 后显著降低 MCAO 诱导的脑梗死体积、神经功能缺损以及神经退行性变评分和程度。MCAO 术后当 S1P3 活性受到抑制时, Iba1 免疫阳性细胞的数量显著减少,脑缺血的核心区和周边区域活化的小胶质细胞数量均明显减少,同时,缺血核心区的小胶质细胞由阿米巴样形状恢复为分枝状形态。在 MCAO 后 MCAO 组脑缺血区小胶质细胞增殖明显,表现为 BrdU/Iba1 双免疫阳性细胞增多。与 MCAO 组相比,抑制 S1P3 后 BrdU/Iba1 双免疫阳性细胞的数量减少。**结论** S1P3 是缺血再灌注脑损伤的致病介质,其机制可能是其参与调节了小胶质细胞活化和炎症发生,这为把 S1P3 作为脑缺血再灌注损伤的治疗靶点提供了依据。

关键词: 1-磷酸鞘氨醇; 大脑中动脉闭塞; 信号通路; 脑缺血再灌注损伤

中图分类号:R743

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The function of receptor mediated sphingosine 1-phosphate signaling pathway in focal cerebral ischemia injury Li Jieqi, Li Meng, Min Lianqiu. (Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effect and its mechanism of receptor mediated sphingosine 1-phosphate(S1P) signaling pathway in focal cerebral ischemia reperfusion, for the application to provide theoretical basis for treatment as drug targets. **Methods** Cerebral ischemia reperfusion in mice was reported by cerebral middle artery occlusion. The specific S1P3 antagonist CAY10444 was used to evaluate the role of S1P3 in cerebral ischemia reperfusion. Cerebral infarction volume, neurohistological score and neurodegenerative index were calculated before and after drug intervention to evaluate the degree of brain injury. The activation, morphological transformation and proliferation of microglia were observed and analyzed by HE staining and immunohistochemical staining with Iba1 and BrdU/Iba1. **Results** Inhibition of S1P3 with CAY10444 immediately after reperfusion can significantly reduce MCAO induced cerebral infarction volume, neurological functional defects and neurodegeneration score. When S1P3 activity was inhibited, the number of Iba1 immuno-positive cells was significantly reduced at the two time points above, and the number of activated microglia in the core area and peripheral area of cerebral ischemia was significantly reduced. After MCAO, the microglia in the ischemic core area recovered from amoeba-like shape to branched shape after S1P3 inhibition. After MCAO, it was found that microglia cells in the cerebral ischemia area of the MCAO group had obvious proliferation, which was manifested as the increase of BrdU/Iba1 double-immune-positive cells. After MCAO, compared with MCAO group, the number of BrdU/Iba1 double immuno-positive cells decreased significantly after S1P3 inhibition. **Conclusions** S1P3 is the pathogenic agent of cerebral ischemia/reperfusion injury, and it may be involved in the regulation of microglial cell activation and inflammation, which provides a basis for further using S1P3 as a therapeutic target for cerebral ischemia/reperfusion injury in the future.

Key words: Sphingosine 1-phosphate; MCAO; Signal pathway; Cerebral ischemia reperfusion injury

1-磷酸鞘氨醇(Sphingosine 1 phosphate, S1P)在不同器官中生物学行为和功能主要由其 5 个特异性 G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptors, GPCRs)^[1,2]介导产生。基于 S1P 受体开发的药物

收稿日期:2019-07-15; 修订日期:2019-09-15

基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划项目(No. 20170540379)

作者单位:(1. 锦州医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁 锦州 121000; 2. 抚顺市中心医院, 辽宁 抚顺 113000)

通讯作者:闵连秋, E-mail: minlianqiu@163.com

芬戈莫德 (FTY720) 就是一种基于在磷酸化后非选择性的与 5 个 S1P 受体亚型中的 4 个绑定后形成的一种药物^[3]。目前该药物已经用于治疗多发性硬化症^[4]。然而,到目前为止 S1P 的受体亚型在每种疾病类型中的具体作用机制尚不清楚。S1P1 在脑缺血再灌注损伤中的致病作用表明,FTY720 在该病中是通过作为 S1P1 功能拮抗剂的来实现治疗作用的^[5]。此外,有研究发现在脑缺血再灌注损伤发作后 S1P3 的 mRNA 水平升高^[6],这说明 S1P3 可能是脑缺血再灌注损伤的另一致病因素,FTY720 对脑缺血再灌注损伤的疗效也有可能通过抑制 S1P3 来实现^[7]。然而,目前还没有明确 S1P3 在局灶性脑缺血再灌注损伤中是否参与了脑损伤过程,以及 S1P3 的致病或神经保护作用的报道^[8]。因此,本研究拟通过构建大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型,在小鼠脑缺血再灌注后给予 S1P3 拮抗剂 CAY10444 干预,评估各组动物脑损伤、脑梗死、神经功能缺损和神经细胞死亡等情况。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性成年昆明小鼠(32 g ± 3 g, 6 w)购置于锦州医科大学实验动物中心。在昼夜照明 07:00 - 19:00(光)、温度(22 ± 2)℃、相对湿度(60 ± 10)% 环境条件下饲养适应环境 1 w 后,进行后续实验。

1.1.2 主要试剂 CAY10444(赛默飞世尔中国);BrdU、rabbit anti-NF-κB(p65)、rabbit anti-Iba1、Donkey anti-BrdU、Mouse anti β-actin、DAB 购于北京博奥深生物技术有限公司;神经蛋白提取试剂及嵌合绿色荧光 PCR 试剂购于上海基康生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备及分组 小鼠用异氟烷进行麻醉,3% 浓度用来诱导,以 1.5% 浓度维持。通过腹侧颈部切口分离右颈总动脉。从颈动脉分叉

处向颈内动脉引入一根硅胶包裹的 6-0 手术线,结扎阻断大脑中动脉。大脑中动脉闭塞 30 min 后,解开结扎的手术线,使大脑区域完全恢复血流处于再灌注状态。在手术期间,采用保温措施将动物的体温维持在(37.0 ± 0.5)℃。手术后,将小鼠置于鼠笼子里饲养,自由进食,按期更换垫料,最后处死动物取脑标本。实验动物分为以下 3 组,每组 10 只: 1. 模型组(MCAO 组):按照上述方法制备 MCAO 小鼠模型; 2. 药物干预组(MCAO + CAY 组):制备 MCAO 模型动物,动物脑缺血再灌注时将 CAY10444 分别以 0.1 mg/kg、0.2 mg/kg 和 0.5 mg/kg 的浓度给小鼠腹腔注射; 3. 假手术组(正常对照组):小鼠除不进行大脑中动脉结扎闭塞外,其他手术操作与模型组相同。

1.2.2 神经功能评分和脑梗死评估 采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)量表评估功能神经受损程度,以确定 MCAO 后的运动、感觉、平衡和反射障碍等^[9]。在神经功能评分后,采用断颈法处死小鼠,迅速取出大脑,并在的小鼠大脑磨具刀组中切 2 mm 厚切片。大脑组织切片用含 2% TTC 的生理盐水在 37 °C 下孵化 20 min。拍摄 TTC 染色的脑切片图像,使用图像分析软件计算梗死体积。

1.2.3 组织学观察与分析 MCAO 术后 1 d 和 3 d 取脑组织标本进行组织学分析。小鼠采用异氟烷进行麻醉,通过心脏灌注冷的 PBS 和 4% 多聚甲醛混合液对脑组织进行固定。分离大脑组织,并在含 30% 蔗糖的灌流固定液中孵育,4 °C 冰箱过夜。将脑组织切成 20 μm 厚切片。在 MCAO 后 1 d 进行 TTC 组织化学染色。脑切片依次在梯度乙醇中水化(100% 浸泡 3 min, 70% 浸泡 1 min, 30% 浸泡 1 min),去离子水冲洗,0.06% KMnO₄ 氧化。切片在 0.1% 醋酸溶液中,用 0.01% 的 TTC 染色 30 min,去离子水漂洗,在载玻片烘片机中干燥,二甲苯浸泡透明处理,然后盖玻片。

1.2.4 Iba1 免疫组织化学染色 在 MCAO 术

后 1 d 和 3 d 行 Iba1 免疫组化染色。5 μm 厚切片,二甲苯脱蜡,酒精梯度入水,高压锅内枸橼酸盐进行抗原修复。切片在含 1% H₂O₂ 的 PBS 中氧化 15 min,含 1% 胎牛血清(FBS)的 0.3% Triton-X100 中阻断 1 h,阻断非特异性蛋白结合。然后,脑切片与兔抗 Iba1 抗体(1: 500),在 4℃ 孵育过夜。次日,切片与 HRP 标记的抗兔 Ig-G 二抗(1: 200)室温下孵育 1h。DAB 显色,镜下观察终止显色。用下行乙醇梯度浓度脱水,二甲苯透明,封片。

1.2.5 BrdU / Iba1 免疫荧光双染 在 MCAO 后 2 d 和 3 d,每隔 12 h 给予小鼠尾静脉 BrdU (50 mg/kg 溶于 PBS 中)注射。小鼠处死后,取 MCAO 后大脑组织切片,与 Tris 溶液在 100℃ 下孵育 30 min 进行抗原修复,Triton X-100 中封闭 1 h。然后与 BrdU (1: 200)抗体在 4℃ 孵育过夜。切片用 HRP 标记的二抗(1: 200)进行孵育。DAB 显色。染色的切片再次用 PBS 冲洗(3 × 5 min),再次进行阻断,与抗体 Iba1 (1: 500)在 4℃ 孵育过夜。然后用与 Cy3(1: 1000)标记的二抗孵育,用抗荧光猝灭试剂进行封片。

1.2.6 免疫阳性细胞定量分析 从每个区域的不同部分拍摄 3 张照片,使用 Adobe Photoshop CS3 软件进行图像分析。并计算免疫阳性细胞的数量。然后,以单位面积(mm²)的免疫阳性细胞的平均数量进行表示。

1.3 统计学处理 所有数据均使用 SPSS 20.0 软件进行分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较多个实验组之间的数据,两组之间的比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

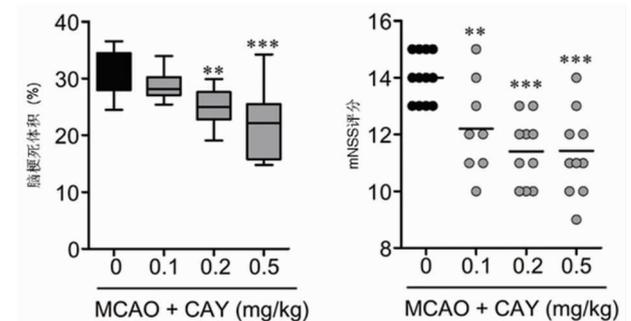
2.1 CAY10444 对 MCAO 小鼠脑损伤和神经功能影响 在 MCAO 24 h 后,MCAO 组小鼠在缺血的皮质和纹状体区出现严重的脑梗死。使用 S1P3 拮抗剂 CAY10444 的干预组小鼠脑梗死体积明显减少,且呈剂量依赖性(见表 1)。给予最低剂量 0.1 mg/kg 的 CAY10444 干预组动物表现为无效,而

给予 0.2 mg/kg 和 0.5 mg/kg 的 CAY10444 对减轻脑梗死有效,0.5 mg/kg 组对减轻脑梗死和神经功能损伤疗效最佳。通过 mNSS 分析发现,药物干预组小鼠在运动、感觉、反射和平衡障碍等神经功能参数与 MCAO 组相比有显著改善(见表 1、图 1)。通过 TTC 染色分析缺血后 24 h 神经损伤程度,与 MCAO 组相比 CAY10444 药物干预组减轻了神经损伤的程度(见表 1、图 1)。

表 1 各组动物脑梗死和 mNSS 评分表($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | mNSS 评分 | 脑梗死体积(%) |
|-----------------|------------------|------------------|
| 假手术组 | 1.34 ± 0.22 *** | - |
| MCAO 组 | 14.02 ± 1.14 | 30.16 ± 1.54 |
| CAY 干预组(0.1 mg) | 12.15 ± 3.03 ** | 28.51 ± 0.86 |
| CAY 干预组(0.2 mg) | 11.42 ± 2.12 *** | 24.91 ± 1.03 ** |
| CAY 干预组(0.5 mg) | 11.41 ± 3.21 *** | 22.02 ± 1.41 *** |

注:MCAO 24 h 后测定不同剂量 CAY10444 对梗死体积和神经功能的影响;与 MCAO 组比较 ***P* < 0.01, ****P* < 0.001



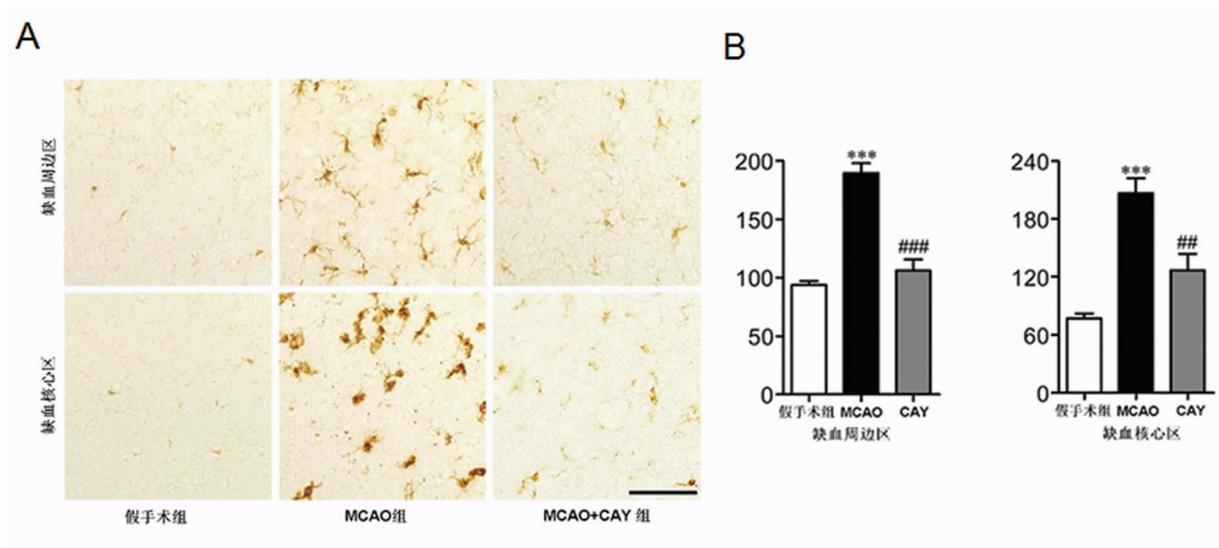
注:MCAO 24 h 后不同剂量 CAY10444 对梗死体积和神经功能的影响。与 MCAO 组比较 ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

图 1 各组动物脑梗死组织学评估

2.2 CAY10444 对 MCAO 脑内小胶质细胞活化和增殖的影响 MCAO 后 1 d 和 3 d 通过 Iba1 免疫组化分析,发现 MCAO 组小胶质细胞的活化情况增强,表现为缺血半球的 Iba1 阳性细胞数量较假手术组增多。与 MCAO 组相比,CAY10444 药物干预组在上述两个时间点上 Iba1 免疫阳性细胞的数量

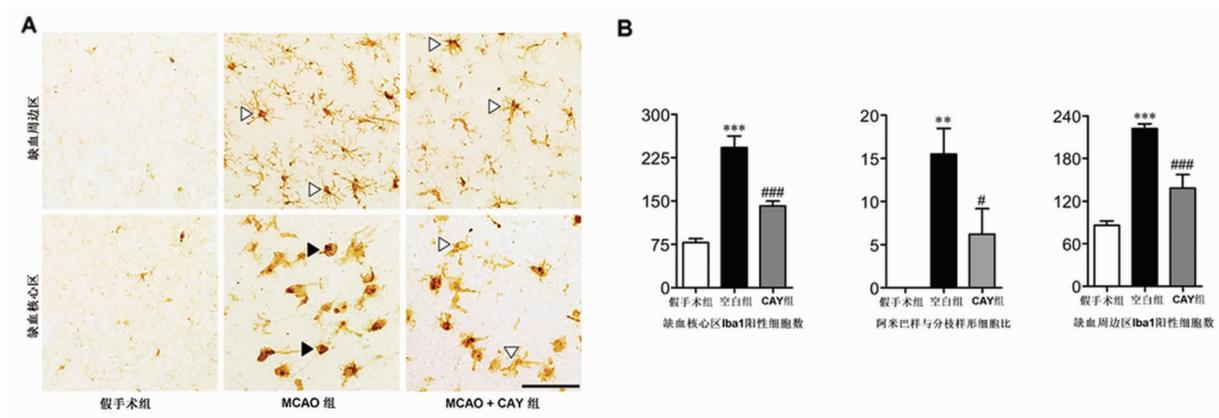
显著减少,且呈时间和区域依赖性,表现为药物干预组小鼠大脑缺血周围和缺血核心区活化的小胶质细胞数量均明显减少(见图2、图3)。此外,CAY10444 药物干预组小鼠大脑缺血核心区阿米巴

样形态的小胶质细胞数量显著减少,即阿米巴形态小胶质细胞/分枝样形态小胶质细胞比例降低(见图3)。



A: CAY 干扰对 MCAO 后 1 d 小胶质细胞活化的 Iba1 免疫组织化学染色。P 为缺血周围区, C 为缺血核区域。标尺 = 200 μm。B: 缺血核心区和周边区 Iba1 免疫阳性细胞数量的定量分析。与假手术组比 * * * $P < 0.001$ 。与 MCAO 组比 ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

图2 脑缺血后 1 d, CAY10444 降低小胶质细胞活化情况

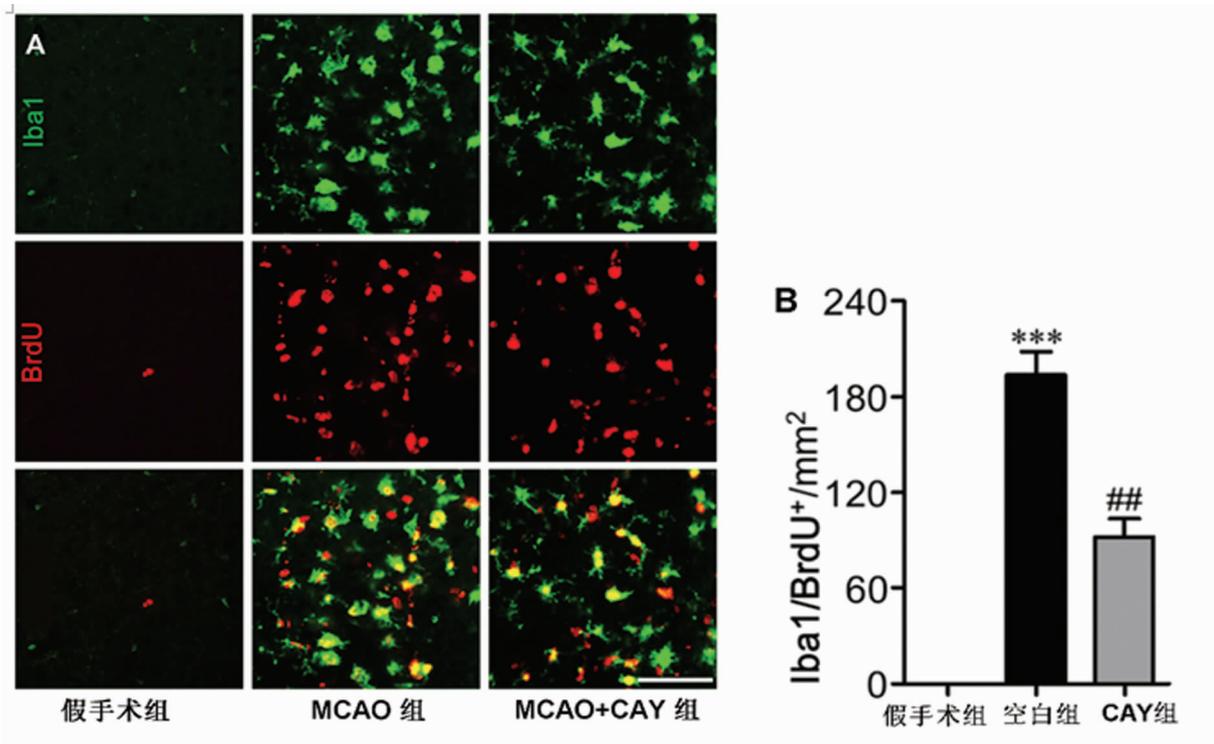


A: 缺血周边(P)和缺血核心(C)区域 Iba1 免疫阳性细胞图。标尺 = 200 μm。B: 缺血核心和周边区 Iba1 免疫阳性细胞数量、Iba1 阳性细胞的形态学改变(阿米巴样/分枝样小胶质细胞)。与假手术组比较 * * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$; 与 MCAO 组比较 # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

图3 脑缺血后 3 d 小胶质细胞的活化情况

在 MCAO 3 d 后对脑内 BrdU 和 Iba1 进行双重免疫荧光染色,发现 MCAO 组大脑缺血区小胶质细胞增殖明显,表现为 BrdU/Iba1 双免疫阳性细胞较

假手术组增多。与 MCAO 组相比,CAY10444 药物干预组 BrdU/Iba1 双免疫阳性细胞的数量明显减少(见图4)。



A: BrdU/Iba1 双免疫荧光法测定脑缺血后 3 d, 边缘区 BrdU/Iba1 免疫双阳性细胞图。标尺 = 50 μm。B: BrdU/Iba1 免疫阳性细胞定量分析。与假手术组比较 * * * $P < 0.001$ 。与 MCAO 组比较 ## $P < 0.01$

图 4 CAY10444 对 MCAO 后 3 d 的小胶质细胞增殖的影响

3 讨论

在本研究中,我们探讨了 S1P 受体的亚型 S1P3 在局灶性脑缺血中的致病机制,尤其是对小胶质细胞生物学的影响。MCAO 后,通过特异性拮抗剂抑制 S1P3 活性可减轻脑损伤。S1P3 在缺血性脑中的致病作用与小胶质细胞的活化密切相关,包括活化的小胶质细胞数量增多、形态转化为阿米巴样和小胶质细胞增殖。

人们通过 FTY720 的作用发现受体介导的 S1P 信号通路是脑缺血损伤的一种可行的治疗方案,因为磷酸化后的 FTY720 是 5 个 S1P 受体亚型中的 4 个亚型的非选择性调控子,在啮齿动物中具有神经保护作用。尽管 FTY720 治疗缺血性脑损伤取得了一定的成功,但究竟哪个或哪几个 S1P 受体亚型是 FTY720 的实际介导的因子仍不确定。有研究者采用局灶性脑缺血大鼠模型证明 S1P1 是局灶性脑缺血的致病因素^[10]。本研究中,我们发现 S1P3 可能是介导脑缺血损伤的另一种 S1P 受体亚型。另外,最近有报道认为 FTY720 的磷酸盐可作为 S1P1 的功能拮抗剂发挥神经保护作用^[11],这启发我们猜测 S1P3 也可能对脑缺血损伤起作用。尽管到目前为止没有直

接证据能证明这个猜测,但是一些研究发现了 FTY720 磷酸盐可拮抗 S1P3 信号通路。考虑到 FTY720 磷酸盐对 S1P1 和 S1P3 的抑制作用以及既往研究结果,因此,我们猜测 FTY720 对脑缺血损伤的疗效可能是通过抑制 S1P1 和 S1P3 活性实现的。有研究证实 S1P2 不是 FTY720-磷酸盐的靶点,但是 S1P2 可通过破坏缺血脑中的血管完整性介导脑缺血损伤。因此,目前为止,人们已经确定三种 S1P 受体亚型为脑缺血的致病因素。然而,目前尚不清楚 S1P 受体亚型对脑缺血损伤的介导作用是否存在差异,是否还有其他 S1P 受体亚型如 S1P4 或 S1P5 参与了脑缺血损伤机制^[12]。

S1P3 在大脑中有明确的致病作用,但它在缺血条件下的作用是具有组织选择性的。早期的关于 S1P3 在非神经缺血模型中的作用的研究报道存在着一些争议。如在心脏中,S1P2 和 S1P3 的缺失均可加重小鼠心肌梗死,支持 S1P3 的心脏保护作用^[13]。然而,在肾脏中 S1P3 又与缺血后的组织损伤有关^[14]。骨髓组织 S1P3 的缺失可减轻肾缺血/再灌注后的组织损伤,其表达缺失可降低促炎细胞因子的表达水平,增加抗炎细胞因子的表达水

平^[15]。S1P 受體的這些不同作用在 S1P1 中也存在。S1P1 受體激動劑或內皮細胞 S1P1 缺失可減少或加重缺血後的腎損傷^[16]。然而,在大腦中,S1P1 的下調減輕了腦缺血後的腦損傷^[17]。無論受體介導的 S1P 信號在非神經組織中的作用如何,S1P1、S1P2 和 S1P3 均參與了腦缺血後的腦損傷發病過程。

在本研究中,由於 CAY10444 是廣泛應用的 S1P3 特异性拮抗劑,因此我們使用 CAY10444 作為 S1P3 拮抗劑來研究其在腦缺血中的作用^[18]。有報道證明 S1P2 是腦缺血再灌注損傷的致病因素之一,因此 S1P2 不太可能介導 CAY10444 在腦缺血中的神經保護作用^[19]。最後,腦缺血中 CAY10444 的療效有可能僅通過 S1P3 介導。

S1P3 在腦缺血後的神經損傷作用似乎與腦內小胶质細胞的激活有關,因為腦卒中等幾種中樞神經系統(CNS)疾病都會發生類似的致病作用^[20]。此前,通過體外和體內的研究發現,受體介導的 S1P 信號通路參與小胶质細胞的激活^[21]。最近發現 S1P3 介導的局灶性腦缺血腦損傷主要通過小胶质細胞激活介導^[22]。在本研究中,我們發現 S1P3 也與小胶质細胞的激活有關:使用 S1P3 特异性拮抗劑抑制 S1P3 活性,腦中活化的小胶质細胞的數量以時間和區域依賴的方式減少。此外,抑制 S1P3 活性降低了小胶质細胞的增殖。腦缺血組織中 S1P3 除了造成活化小胶质細胞數量增加外,還與活化的小胶质細胞的形態學轉化密切相關。在缺血再灌注後 3 d 時,缺血核心區域活化的小胶质細胞大多呈阿米巴樣,並主要通過釋放多種促炎介質導致缺血腦神經元損傷。我們的研究表明,抑制 S1P3 可顯著降低活化小胶质細胞向阿米巴樣形態轉化。

[參考文獻]

- [1] Ji WC, Chun J. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831(1): 20-32.
- [2] O' Sullivan S, Dev KK. Sphingosine-1-phosphate receptor therapies: advances in clinical trials for CNS-related diseases[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 113: 597-607.
- [3] Czech B, Pfeilschifter W, Mazaheri-Omrani N, et al. The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389: 251-256.
- [4] Kraft P, Gob E, Schuhmann MK, et al. FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection[J]. *Stroke*, 2013, 44: 3202-3210.
- [5] Quancard J, Bollbuck B, Janser P, et al. A potent and selective S1P (1) antagonist with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Chem Biol*, 2012, 19: 1142-1151.
- [6] Gaire BP, Kwon OW, Park SH, et al. Neuroprotective effect of 6-paradol in focal cerebral ischemia involves the attenuation of neuroinflammatory responses in activated microglia[J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0120203.
- [7] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32: 2682-2688.
- [8] Han JE, Lee EJ, Moon E, et al. Matrix metalloproteinase-8 is a novel pathogenetic factor in focal cerebral ischemia[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 231-239.
- [9] Sapkota A, Gaire BP, Cho KS, et al. Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation[J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0171479.
- [10] Li T, Pang S, Yu Y, et al. Proliferation of parenchymal microglia is the main source of microgliosis after ischaemic stroke[J]. *Brain*, 2013, 136: 3578-3588.
- [11] Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, et al. Astrocytes and ischemic injury[J]. *Stroke*, 2009, 40: 8-12.
- [12] Dusaban SS, Chun J, Rosen H, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14: 111.
- [13] Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 32: 70-85.
- [14] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 649-665.
- [15] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization[J]. *J Immunol*, 2017, 198: 1006-1014.
- [16] Sensken SC, Staubert C, Keul P, et al. Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate[J]. *Cell Signal*, 2008, 20: 1125-1133.
- [17] Bajwa A, Huang L, Kurmaeva E, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 3-deficient dendritic cells modulate splenic responses to ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27: 1076-1090.
- [18] Ham A, Kim M, Kim JY, et al. Selective deletion of the endothelial sphingosine-1-phosphate 1 receptor exacerbates kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2013, 85: 807-823.
- [19] Shirakawa H, Katsumoto R, Iida S, et al. Sphingosine-1-phosphate induces Ca(2+) signaling and CXCL1 release via TRPC6 channel in astrocytes[J]. *Glia*, 2017, 65: 1005-1016.
- [20] Li C, Li JN, Kays J, et al. Sphingosine 1-phosphate enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of sphingosine 1-phosphate receptors 1 and/or 3[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 70.
- [21] Tang HB, Jiang XJ, Wang C, et al. S1P/S1PR3 signaling mediated proliferation of pericytes via Ras/pERK pathway and CAY10444 had beneficial effects on spinal cord injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498: 830-836.
- [22] Pedata F, Dettori I, Coppi E, et al. Purinergic signalling in brain ischemia[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 104: 105-130.