

体外缺血缺氧条件下人主动脉平滑肌细胞中 1-磷酸鞘胺醇的表达变化

汤华, 陈少军, 赵东刚, 闫俊

摘要 **目的:**探讨缺血缺氧条件下1-磷酸鞘胺醇(S1P)在人主动脉血管平滑肌细胞(T/G HA-VSMC)收缩中的作用机制。**方法:**将传代培养的T/G HA-VSMC分为正常对照组和缺血缺氧组。缺血缺氧组采用低氧条件培养T/G HA-VSMC细胞来模拟蛛网膜下腔出血(SAH)所致的缺血缺氧环境;采用QT-PCR检测人鞘胺醇激酶1(SphK1)基因的mRNA表达;Western-blot法检测人SphK1基因的蛋白表达;ELISA法测定T/G HA-VSMC细胞上清液和细胞内S1P浓度;慢病毒载体shRNA介导的T/G HA-VSMC细胞内SphK1基因表达沉默;采用钙离子荧光探针Fluo-3/AM检测T/G HA-VSMC细胞内Ca²⁺浓度。**结果:**与正常对照组相比,缺血缺氧条件下人T/G HA-VSMC细胞内SphK1基因表达上调,且缺血缺氧组细胞培养液和细胞裂解液中S1P浓度均显著升高。缺血缺氧可诱导T/G HA-VSMC细胞内Ca²⁺离子浓度增加,并且外源性S1P显著上调T/G HA-VSMC细胞内Ca²⁺浓度;与正常对照组相比,shRNA干扰技术沉默SphK1基因表达和SphK1特异性抑制剂二甲基鞘胺醇(DMS)均显著抑制低氧诱导的T/G HA-VSMC细胞内S1P和Ca²⁺浓度上调。**结论:**缺血缺氧可导致T/G HA-VSMC细胞内SphK1基因表达上调,进而促进S1P的合成代谢,而高浓度的S1P通过某种机制导致细胞内Ca²⁺浓度水平增加导致血管收缩。

关键词 1-磷酸鞘胺醇;缺氧;人主动脉平滑肌细胞

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjsgncj.2020.03.002

汤华, 陈少军, 赵东刚, 等. 体外缺血缺氧条件下人主动脉平滑肌细胞中1-磷酸鞘胺醇的表达变化[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 129-133.

作者单位

三峡大学人民医院/宜昌市第一人民医院神经内科
湖北 宜昌 443000

收稿日期

2019-03-19

通讯作者

汤华

tlb173@163.com

Role of Sphingosine-1-Phosphate in Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells under Hypoxic-ischemic Stress *in Vitro* TANG Hua, CHEN Shao-jun, ZHAO Dong-gang, YAN Jun. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of The Three Gorges University, The First People's Hospital of Yichang, Hubei 443000, China

Abstract Objective: To investigate the mechanism of sphingosine-1-phosphate (S1P) in contraction of human aortic vascular smooth muscle cells (T/G HA-VSMC) under hypoxic/ischemic stress. **Methods:** The cultured T/G HA-VSMC were divided into normal control group and ischemia-hypoxia model group. In the ischemia-hypoxia group, T/G HA-VSMC cells were cultured under hypoxic conditions to simulate the ischemic-hypoxic environment induced by subarachnoid hemorrhage (SAH). The mRNA expression of sphingosine kinase 1 (SphK1) was detected by QT-PCR, and the protein levels of SphK1 were measured by western blot. The levels of S1P in the supernatant of the cell culture medium were measured by ELISA. Lentivirus vector shRNA mediated SphK1 gene silencing was applied as a reverse study. The calcium fluorescent probe Fluo-3/AM was used to measure intracellular Ca²⁺ concentration. **Results:** Compared with that of normal control group, the protein expression of SphK1 in T/G HA-VSMC was significantly increased in the ischemia-hypoxia group, and the concentration of S1P in the supernatant of the cell culture medium was increased significantly in the ischemia-hypoxia group. The concentration of intracellular Ca²⁺ increased significantly in T/G HA-VSMC under ischemia and hypoxia stress, and exogenous S1P significantly increased the intracellular Ca²⁺ concentration. Compared with normal control group, shRNA interference SphK1 gene expression and SphK1 specific inhibitors dimethylsphingosine (DMS) significantly inhibited the concentrations of both S1P and Ca²⁺ in T/G HA-VSMC in the ischemia-hypoxia group. **Conclusion:** SphK1 gene expression is up-regulated in T/G HA-VSMC cells under ischemic/hypoxic stress, which promotes the synthesis and metabolism of S1P. High concentration of S1P leads to vasoconstriction by increasing the level of intracellular Ca²⁺ in cells.

Key words sphingosine-1-phosphate; hypoxia; human aortic vascular smooth muscle cells

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的发病机制主要是各种原因引起的血管平滑肌收缩的过程,既包括缩

血管物质的增加(如氧合血红蛋白、内皮素、蛋白激酶C),又包括血管扩张物的减少(如NO、前列环素2)^[1-4]。血管壁平滑肌的收缩始于细胞膜的去极化及细胞内Ca²⁺的增加,

进入细胞内 Ca^{2+} 与钙调蛋白相结合,激活蛋白激酶C,从而使肌球蛋白结合、收缩,最终引起血管平滑肌收缩,导致血管痉挛。因此,凡是能直接或间接引起细胞内 Ca^{2+} 浓度变化的物质都成为研究 CVS 的热点^[5,6]。

1-磷酸鞘胺醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是近年来发现的具有重要生理功能的一种膜磷脂类分解和代谢产物。它既可作为一种细胞内第二信使,又可作用于细胞表面特定的受体而发挥其重要的生物学功能^[7,8]。1990年, Ghosh 等^[9]首先观察到,这种鞘胺醇磷酸盐在培养的肌细胞中,可通过非 IP3 依赖性途径动员细胞内 Ca^{2+} 释放,从而掀起 S1P 功能研究的热潮,这为 SAH 后 CVS 的治疗提供了新思路。

在 SAH 后 CVS 病情发生发展的过程中,血管平滑肌细胞收缩发挥重要作用。研究证明, SAH 后发生 CVS 的兔 S1P 表达显著增强,并且 S1P 表达与第 3、5、7、9 天的基底动脉横截面积变化一致^[9]。S1P 可诱导犬基底动脉中的血管收缩,其机制可能和 Rho / Rho 激酶路径激活相关。S1P 可能是 SAH 后诱导 CVS 物质^[10]。尽管上述研究证明 S1P 与 SAH 后 CVS 关系密切,但其仅限于动物研究,而 S1P 是否参与人 SAH 后 CVS 血管平滑肌细胞收缩目前国内外未见相关报道。本研究创新性提出通过建立缺血缺氧平滑肌细胞模型,检测缺血缺氧条件下人主动脉平滑肌细胞内 SphK1 的蛋白表达水平、mRNA 表达水平和 S1P 浓度的动态表达变化规律、作用及其与细胞内 Ca^{2+} 浓度的关系,并应用 SphK1 抑制剂 DMS 和慢病毒载体 shRNA 介导的人 SphK1 基因表达沉默两种方式干预这一过程,分析 S1P 与缺血缺氧导致的血管平滑肌细胞收缩之间的关系,初步探讨 S1P 在平滑肌细胞收缩中的作用机制,在相关领域尚属首次。本研究取得的成果,将为 SAH 后 CVS 引起的继发性缺血性脑损伤临床治疗和基础研究提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

T/G 人主动脉血管平滑肌细胞(human aortal vascular smooth muscle cells, HA-VSMC)购于美国 ATCC 公司;抗人 S1P 抗体,购于美国 Abcam 公司;人鞘氨醇激酶 1 shRNA 慢病毒颗粒、对照 shRNA 慢病毒颗粒和 Polybrene,购于美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记二抗 IgG,购于北京中杉金桥生物技术有限公司;S1P,购于美国 Sigma 公司;S1P 浓度测定试剂盒,购于上海卡迈舒公司;DMS,购于美国 Cayman 公司;Fluo3/AM,

购于江苏碧云天公司;胰蛋白酶,购于华美生物工程公司;胎牛血清和 DMEM 培养基,购于美国 Gibco 公司;Trizol 试剂,购于美国 Solarbio 公司;ELISA 试剂盒,购于美国 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 T/G HA-VSMC 的培养与传代 将 T/G HA-VSMC 株转至培养瓶,加入胰蛋白酶孵育消化 3~5 min。用移液器反复轻轻吹打细胞制成单细胞悬液,加入细胞培养液吹打混匀。按 1:3 的比例传代至新的培养瓶中,放入 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,每天观察细胞培养液情况,待细胞生长至铺满约 80% 瓶底,接近融合状态时用胰蛋白酶消化进行传代,取 3~6 代细胞用于实验分组。

1.2.2 T/G HA-VSMC 缺血缺氧模型的制备 将培养的 T/G HA-VSMC 分为正常对照组及缺血缺氧组。采用低氧条件培养 T/G HA-VSMC 细胞来模拟 SAH 所致的缺血缺氧环境:T/G HA-VSMC 细胞按常规细胞培养并传代 16 h 完全贴壁后,更换无血清培养基培养并转移到低氧细胞培养箱内培养 24 h。低氧细胞培养箱内的气体由 93% N_2 、2% O_2 和 5% CO_2 组成,细胞培养基中氧分压为 53 mmHg, 37 ℃ 恒温。

1.2.3 QT-PCR 检测人 SphK1 基因的 mRNA 表达 将培养的 T/G HA-VSMC 细胞消化后,用 Trizol 试剂裂解并提取总 RNA。取 5 μg 总 RNA 为模板,按照试剂盒所示步骤使用逆转录酶催化合成 cDNA。取 2 μL cDNA 为模板在 20 μL 体系中加入 SphK1 基因 mRNA 检测引物或内参照基因 β -Actin 引物,通过荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增、结果分析。本实验中 SphK1 基因的引物序列: FORWARD: CTTGGCTGACTGAGGAGGAG; REVERSE: TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG; 内参照引物为 β -actin,其序列为: FORWARD: GGCATCCTCA CCCTGAAGTA; REVERSE: TAATGTCACGCACGAT TTCC。

1.2.4 Western-blot 法检测人 SphK1 基因的蛋白表达 将培养细胞加入细胞裂解液裂解细胞离心后取上清。取 20 μL 蛋白样品(约 50 μg),按照每 4 μL 蛋白样品加入 1 μL 5×蛋白上样缓冲液的比例上样, 10% SDS-PAGE 电泳, 100 V 转移 1 h 至 PVDF 膜,放入封闭液中 37 ℃ 封闭 1 h; 去掉封闭液加入 SphK1 抗体 4 ℃ 摇床上孵育过夜。将膜与辣根过氧化酶(HRP)标记抗体孵育,室温摇床上孵育 1 h,用 Western blot 印迹观察,用图像分析测定各带吸光度(A)值作定量分析。

1.2.5 ELISA 法测定(T/G HA-VSMC)细胞上清液和细

胞内S1P浓度 按照说明书进行。检测时设置3个复孔,酶标仪(450 nm波长)读取的各孔实验结果取平均值。

1.2.6 慢病毒载体 shRNA 介导的 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基因表达沉默 人 T/G HA-VSMC 细胞传代接种 6 孔板培养 16 h 至细胞生长 60% 融合,于处理前 1 h 更换新的 2 mL 完全培养基。按照慢病毒感染操作说明,于细胞无菌操作台内将人 SphK1 shRNA 慢病毒颗粒、对照 shRNA 慢病毒颗粒和 Polybrene 混合后,加入 T/G HA-VSMC 细胞培养孔内轻柔混匀,持续培养 48 h 后,收集细胞进行 Western blot,分析细胞内人 SphK1 基因的蛋白表达以评价 shRNA 干扰效率。

1.2.7 细胞内 Ca²⁺ 浓度检测 T/G HA-VSMC 细胞内 Ca²⁺ 浓度检测采用 Ca²⁺ 荧光探针 Fluo-3/AM 标记细胞内 Ca²⁺ 后使用荧光酶标仪进行检测。各实验组设置 3 个复孔,实验组结果为各孔荧光强度值减去空白对照孔荧光强度值后取平均值,然后各处理组与正常组相比较,获得相对荧光强度变化值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间数据比较采用方差分析,均数间两两比较使用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血缺氧诱导人 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 表达水平上调

QT-PCR 和 Western blot 法发现,正常对照组的人 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基因的 mRNA 和蛋白水平较低;缺血缺氧组人 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基因的 mRNA 和蛋白水平均显著上升,2 组有显著性差异 (*P* < 0.01),见图 1。这表明,缺血缺氧条件下人 T/G HA-VSMC 细胞内存在 SphK1 基因表达上调,提示 S1P 合成代谢有可能增加。

2.2 缺血缺氧诱导人 T/G HA-VSMC 细胞内 S1P 的浓度显著增加

由于已发现缺血缺氧组 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基因表达上调,本实验中采用 ELISA 法分析 T/G HA-VSMC 细胞内(细胞裂解液)S1P 的浓度变化,以鉴定低氧诱导的 SphK1 高表达对 S1P 浓度的影响。与正常对照组相比,缺血缺氧组 T/G HA-VSMC 细胞培养液和细胞裂解液中 S1P 浓度均有显著升高,见图 2。这表明,缺血缺氧诱导的 T/G HA-VSMC 细胞中 SphK1 高表达导致 S1P 合成增加。

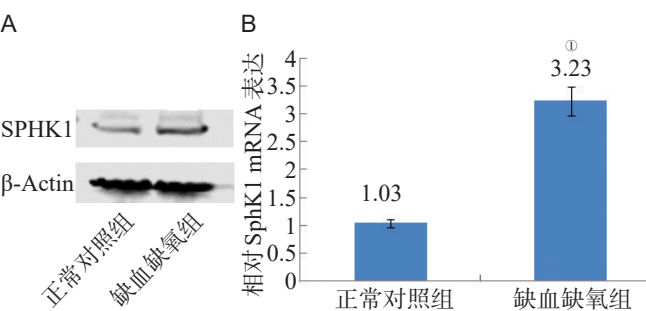
2.3 缺血缺氧诱导人 T/G HA-VSMC 细胞内 Ca²⁺ 离子

浓度增加

为进一步分析 24 h 的低氧条件培养是否导致人 T/G HA-VSMC 细胞内发生 Ca²⁺ 浓度改变,实验中使用荧光酶标仪检测正常组和缺血缺氧组 T/G HA-VSMC 细胞内 Fluo-3/AM 荧光探针标记的 Ca²⁺ 浓度水平的相对荧光强度值。结果显示,与正常对照组相比较,缺血缺氧组细胞内 Ca²⁺ 浓度增加,差异有统计学意义,见图 3。此结果与文献报道一致,同时也证明本实验中设置的 24 h 低氧培养条件能有效建立细胞缺血缺氧模型、导致人 T/G HA-VSMC 细胞内发生 Ca²⁺ 浓度改变。

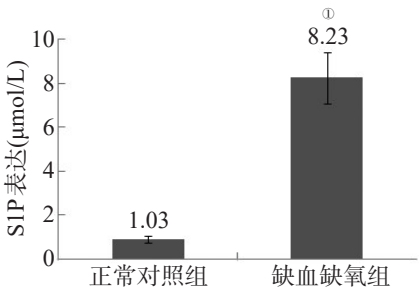
2.4 S1P 上调人 T/G HA-VSMC 细胞内 Ca²⁺ 离子浓度

以上实验结果表明:与正常对照组相比,低氧细胞培养条件能够诱导人 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基



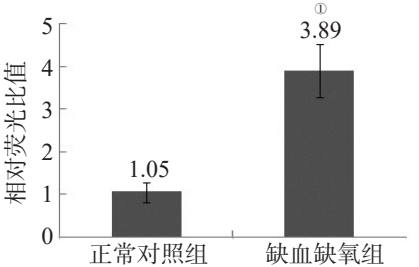
注: A. Western blot 检测 2 组 SphK1 的蛋白表达; B. QT-PCR 检测 2 组 SphK1 mRNA 表达 (*t* 检验, ^① *P* < 0.01)

图 1 低氧诱导人 T/G HA-VSMC 细胞内 SphK1 基因的 mRNA 和蛋白表达变化



注: 实验中设置正常对照组和缺血缺氧组, 分别 3 个复孔, 实验结果取平均值后进行比较 (*t* 检验, ^① *P* < 0.01)

图 2 低氧培养对人 T/G HA-VSMC 细胞内 S1P 浓度的影响



注: 荧光探针标记法分析 2 组 T/G HA-VSMC 细胞内 Ca²⁺ 浓度的相对变化, 分别设置 3 个复孔, 缺血缺氧组实验结果取荧光值平均后与正常组荧光平均值进行比较, 显示为相对荧光强度值 (*t* 检验, ^① *P* < 0.05, ^② *P* < 0.01)

图 3 缺血缺氧培养对人 T/G HA-VSMC 细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响

因表达上调、S1P和Ca²⁺浓度增加。但是否SphK1基因表达上调及促进的S1P大量合成导致Ca²⁺浓度增加则需要实验证实。本实验分别以SphK1基因沉默、SphK1特异性抑制剂DMS处理和加入外源性S1P来验证低氧诱导的T/G HA-VSMC细胞内S1P合成增加导致细胞内Ca²⁺浓度上调这一假设。①通过Western blot分析SphK1基因的shRNA干扰效率：SphK1基因的shRNA干扰慢病毒颗粒感染48 h后，T/G HA-VSMC细胞内SphK1蛋白表达水平显著下调，见图4A。②外源性S1P显著上调T/G HA-VSMC细胞内Ca²⁺浓度，见图4B。③shRNA干扰SphK1基因表达和SphK1特异性抑制剂DMS均显著抑制低氧诱导的T/G HA-VSMC细胞内S1P和Ca²⁺浓度上调，见图4C、D。这些实验结果证实，低氧诱导的T/G HA-VSMC细胞内S1P合成增加是细胞内Ca²⁺浓度上调的原因之一。

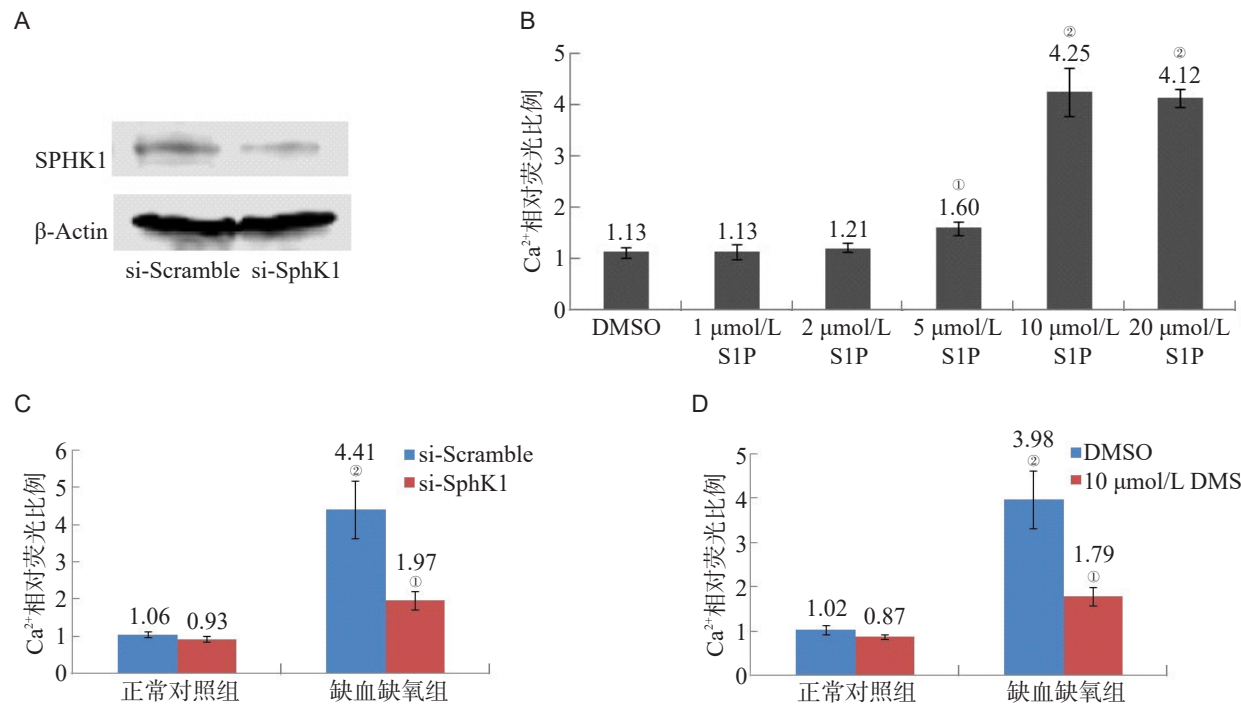
3 讨论

目前针对SAH后CVS的研究机制较多,动物实验表明,SAH后局部高血凝块可直接刺激动脉引起痉挛,其机制可能与血凝块中的红细胞分解后释放许多血管

收缩成分有关^[11,12];SAH患者血管内皮凋亡导致内皮细胞功能障碍也是CVS的一个重要机制,血管内皮细胞凋亡后,引起缩血管活性物质如内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)等分泌增加^[13,14],舒血管活性物质如一氧化氮(nitric oxide, NO)等合成减少,激活相应激酶,开放钙通道,引起平滑肌细胞内Ca²⁺浓度升高和血管平滑肌收缩,进而导致CVS^[15,16]。

鞘胺醇磷酸盐在培养的肌细胞中,可通过非IP3依赖性途径动员细胞内Ca²⁺释放,进入细胞内Ca²⁺与钙调蛋白相结合,激活蛋白激酶C,从而使肌球蛋白结合、收缩,最终引起血管平滑肌收缩,导致血管痉挛。后期研究又发现S1P和鞘氨醇可以刺激、促进Ca²⁺释放^[17],有学者发现S1P可以引起脑动脉的收缩^[18]。Jain等认为血管平滑肌细胞中Ca²⁺浓度增加,激活一系列生物效应引起平滑肌收缩,最终导致CVS的发生。应用Ca²⁺拮抗剂尼莫地平治疗后,由CVS引起的神经功能缺失率明显降低,预后良好者显著增多,进一步证明Ca²⁺与CVS密切相关^[19,20]。

本实验研究部分采用低氧条件诱导的人T/G



注:A. T/G HA-VSMC细胞分别经 Scramble-shRNA 和 SphK1-shRNA 的慢病毒颗粒感染 48 h 后,进行 Western blot 分析。B. T/G HA-VSMC 细胞分别经 1、2、5、10、20 μmol/L 的 DMS 处理 12 h,等体积二甲亚砜(DMSO)处理作为对照组。每组分别设置 3 个复孔。实验结果取平均值后和对照组平均值比较(t 检验,①P<0.05,②P<0.01)。C. SphK1 基因沉默的 T/G HA-VSMC 细胞和对照 T/G HA-VSMC 细胞分别分为正常对照组和缺血缺氧组进行处理、荧光探针标记法分析分析细胞内 Ca²⁺ 浓度变化。每组分别设置 3 个复孔。实验结果取平均值后和对照组平均值比较(t 检验,①P<0.05,②P<0.01)。D. DMS 处理前后的 T/G HA-VSMC 细胞分别分为正常对照组和缺血缺氧组进行处理、荧光探针标记法分析分析细胞内 Ca²⁺ 浓度变化。每组分别设置 3 个复孔。实验结果取平均值后和对照组平均值比较(t 检验,①P<0.05,②P<0.01)

图4 S1P浓度变化对人T/G HA-VSMC细胞内Ca²⁺浓度的影响

HA-VSMC细胞缺血缺氧模型来模拟SAH导致的血管内皮细胞缺血缺氧环境,以研究SAH引起CVS的发病机制。结合大量文献报道的研究背景,本实验的假说首先检测缺血缺氧对人T/G HA-VSMC细胞内S1P代谢及其浓度水平的影响。结果表明,缺血缺氧处理24 h可诱导人T/G HA-VSMC细胞内S1P合成代谢的限速酶SphK1表达显著上调并伴随S1P浓度增加。鉴于SphK1与S1P的直接关系,有理由推断缺血缺氧诱导的S1P浓度增加是由于SphK1表达上调所致,但本实验对缺血缺氧诱导SphK1高表达的机制没有研究。已有大量文献报道缺血缺氧可通过多种途径诱导人血管平滑肌内皮细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,进而导致血管痉挛发生^[21]。本实验检测表明人T/G HA-VSMC细胞缺血缺氧模型中 Ca^{2+} 浓度水平显著增加,与文献报道一致,同时也证实本研究中T/G HA-VSMC细胞缺血缺氧模型的成功建立。为阐明T/G HA-VSMC细胞内SphK1表达显著上调、S1P浓度增加与 Ca^{2+} 浓度水平显著增加的关系,本实验采用shRNA干扰技术沉默SphK1基因表达和SphK1特异性抑制剂DMS处理两种途径来抑制S1P合成代谢,下调其浓度水平;在此条件干预下观察S1P浓度对缺血缺氧诱导的T/G HA-VSMC细胞中 Ca^{2+} 浓度上调的影响。实验中采用商品化的SphK1-shRNA慢病毒及其对照(Scramble-shRNA)以提高shRNA干扰效率。实验中采用的S1P的工作浓度参照文献设定^[22-24]。结果发现,沉默SphK1基因表达或使用SphK1抑制剂DMS均能够显著抑制缺血缺氧诱导的T/G HA-VSMC细胞中 Ca^{2+} 浓度上调,但不能完全阻断。与正常对照组相比,即使SphK1基因沉默或DMS处理,缺血缺氧组T/G HA-VSMC细胞中SphK1浓度仍有上调,差异有统计学意义。这一实验结果表明,T/G HA-VSMC细胞内S1P浓度水平不是决定 Ca^{2+} 浓度的唯一因素。

综上所述,我们推测,缺血缺氧导致人血管平滑肌细胞内SphK1基因表达上调,进而促进S1P的合成代谢,而高浓度的S1P通过某种机制导致细胞内 Ca^{2+} 浓度水平增加,进而导致血管收缩发生。这一血管收缩途径的具体作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 康瑜, 杨小芳. TCD监测下定量预测蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛预后的最佳界值研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13: 257-259.
- [2] Rothoerl RD, Axmann C, Pina AL, et al. Possible role of the C-reactive protein and white blood cell count in the pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2006, 18: 68-72.
- [3] Zheng B, Zheng T, Wang L, et al. Aminoguanidine inhibition of iNOS

activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits via restoration of dysfunctional endothelial cells[J]. J Neurolog Sci, 2010, 295: 97-103.

[4] McNeish AJ, Altayo FJ, Garland CJ. Evidence both L-type and non-L-type voltage-dependent calcium channels contribute to cerebral artery vasospasm following loss of NO in the rat[J]. Vasc Pharmacol, 2010, 53: 151-159.

[5] Przybycien-Szymanska MM, Ashley WW, Jr. Biomarker Discovery in Cerebral Vasospasm after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24: 1453-1464.

[6] Zubkov AY, Ogihara K, Bernanke DH, et al. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm[J]. Surg Neurol, 2000, 53: 260-266.

[7] Hansen D, Hannemann L, Specht M, et al. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Therapeutic value of treatment with calcium antagonists, hypervolemic hemodilution and induced arterial hypertension[J]. Der Anaesthetist, 1995, 44: 219-229.

[8] Brandt L, Ljunggren B, Saveland H, et al. Cerebral vasospasm and calcium channel blockade. Nimodipine treatment in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Pharmacol Toxicol, 1986, 58: 151-155.

[9] Tang H, Zhao D, Chen S, et al. Expression of Sphingosine-1-phosphate (S1P) on the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits[J]. Acta Cir Bras, 2015, 30: 654-659.

[10] Tosaka M, Okajima F, Hashiba Y, et al. Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo: possible role in pathogenesis of cerebral vasospasm[J]. Stroke, 2001, 32: 2913-2919.

[11] Ghosh TK, Bian J, Gill DL. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 22628-22635.

[12] 潘广艳, 王悦洋, 任光阳. 促红细胞生成素在自发性蛛网膜下腔出血中的治疗作用[J]. 海南医学, 2020, 31: 98-102.

[13] Ding D. Molecular insights into aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm from analysis of coated-platelets[J]. J Neuro Sci, 2014, 338: 236-239.

[14] Kelman C, Reavey-Cantwell J. Endovascular management of cerebral vasospasm[J]. Neurosurg Focus, 2014, 37: 1-5.

[15] Siuta M, Zuckerman SL, Mocco J. Nitric oxide in cerebral vasospasm: theories, measurement, and treatment[J]. Neurol Res Int, 2013, 20: 972-977.

[16] Nishizawa S. The roles of early brain injury in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: from clinical and scientific aspects[J]. Acta Neurochir Suppl, 2013, 11: 207-211.

[17] Ghosh TK, Bian J, Gill DL. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells[J]. Science, 1990, 248: 1653-1666.

[18] Ghosh TK, Bian J, Gill DL. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 226-235.

[19] Coussin F, Scott RH, Wise A, et al. Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction[J]. Circ Res, 2002, 91: 151-157.

[20] Jain KK. Nicaraven for the treatment of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9: 859-870.

[21] Alexander SA, Kerr ME, Balzer J, et al. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E, calcium and cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Biol Res Nurs, 2008, 10: 102-112.

[22] Dorsch NW. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part III: Mechanisms of action of calcium antagonists[J]. J Clin Neurosci, 1994, 11: 151-160.

[23] McGuinness B, Gandhi D. Endovascular management of cerebral vasospasm[J]. Neurosurg Clin N Am, 2010, 21: 281-290.

[24] 于欢, 谷翔, 张普华, 等. S1P对缺氧/复氧诱导的共培养心肌细胞和成肌细胞损伤的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42: 637-641.

(本文编辑:王晶)