

凝血酶与血管内皮细胞

王 敏* 王晓军¹ 崔连群¹

(山东科技大学信息与电气工程学院生物医学系, 济南 250031;

¹ 山东大学临床医学院省立医院心内科, 济南 250021)

摘要 凝血酶不仅在凝血过程中起主导作用, 还可以引发多种凝血酶受体介导的分子和细胞间相互作用, 在动脉粥样硬化和再狭窄形成中起着重要的作用。现就凝血酶及其受体的特性, 以及对血管内皮细胞的作用, 包括通透性改变、内皮生长因子、基质金属蛋白酶、黏附分子表达作一综述。

关键词 凝血酶; 血管内皮细胞; 血管病

启动凝血系统和损伤后修复过程是冠心病及介入治疗后再狭窄涉及的共同病理生理过程, 目前研究显示凝血酶除了参与凝血过程外, 还对血管壁的生物学产生重大影响, 包括调节血管紧张度、血管平滑肌细胞增殖、迁移和血管生长等^[1]。凝血酶刺激血小板释放 Von Willebrand 因子、细胞表面 P-选择素、E-选择素、黏附分子表达以及组织因子增加, 这一系列反应不仅推动凝血过程和血小板黏附, 而且促进中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞在内皮下聚集, 进一步使内皮细胞活化, 刺激内皮收缩、通透性增加、黏附分子表达增加、白细胞滚动和穿透力加强^[2]。因而凝血酶在冠心病及介入术后再狭窄形成过程中起着重要的作用。明确凝血酶广泛的生物学功能将对防治心血管疾病过程中合理的应用凝血酶抑制剂提供理论依据。

1 凝血酶及其受体

凝血酶是一种多功能丝氨酸蛋白酶, 除了激活血小板、催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白在血栓形成中发挥重要作用外, 还对血管壁平滑肌细胞、内皮细胞及单核细胞等有广泛的影响, 因此是血管壁细胞生物学重要的调节因子^[3]。近来还证明它还能促进血管壁非细胞成分的累积及血管内膜合成和释放炎症反应因子, 调节血浆白细胞及血管壁细胞的炎症反应。多种动物模型实验说明凝血酶介导损伤后血管动脉粥样硬化和再狭窄的信号应答过程。

X 线晶体研究发现, 凝血酶有 3 个相互独立的结合位点, 即催化位点、阴离子结合位点、肝素结合位点。凝血酶通过这些位点与其他分子或受体

相互作用。凝血酶的许多生物活性都是由受体介导的, 生物学效应的多样性及复杂性在于凝血酶受体的非单一性。凝血酶受体已被克隆, 是一种蛋白酶激活的受体(protease-activated receptor, PAR), 属 G-蛋白偶联受体家族中的重要成员。有 4 种亚型(PAR1, PAR2, PAR3, PAR4)^[4]。认识最早、研究最多的是 PAR1。PAR1 主要分布于内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞以及某些淋巴细胞。当凝血酶与 PAR1 结合后, 丝氨酸蛋白酶使其细胞外氨基酸 N 末端发生裂解, 形成一个新的氨基酸 N 末端序列, 这一序列是触发凝血酶受体的配位体活化, 使凝血酶受体激活并导致一系列细胞生物学效应。用人工合成的模拟氨基酸片段的方法证实了这种激活凝血酶的机制^[5]。目前已知 PAR1、PAR3 和 PAR4 可直接被凝血酶激活。激活 PAR4 需要高凝血酶浓度, 低凝血酶浓度时, 则必须由 PAR3 作为辅助因子, 推测可能和 PAR4 与凝血酶的亲和力低有关^[6]。PAR2 不能被凝血酶激活, 而是由胰岛素和凝血因子 VIIa 激活^[7,8]。不同细胞对凝血酶反应差异至少部分是由于不同亚型的受体而引起。

凝血酶生物学效应是多种多样的, 除了凝血酶受体的多样性外, 还在于凝血酶受体介导丰富的细胞间信号网络与其他信号转导通路的整合机会。已知在 PAR1 激活时有 3 种 G 蛋白参加(G12/13, Gq, Gi)并产生多样的信号转导。G13 可使细胞骨架蛋白改变, 影响血管细胞的迁移; 依赖 Gq 的转达信号

收稿日期: 2004-05-12 接受日期: 2004-08-25

山东省自然科学基金资助项目(No.Y2003C01)

* 通讯作者。Tel: 0531-5903366, E-mail: minwang859@hotmail.com

激活磷脂酶 C, 后者使细胞促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化和酪氨酸激酶活化, 促进细胞生长、增殖。

多个实验显示凝血酶受体还与其他受体间有交叉反应。已知 PAR1 与表皮生长因子 (EGF) 受体之间有交叉反应。凝血酶可以激活 EGF 受体, 并被 EGF 抑制受体所抑制^[9]。进一步的研究发现该过程还有肝素样表皮生长因子参与 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)^[10]。现已发现血管平滑肌细胞、动脉内皮细胞、血小板、巨噬细胞等多种细胞表面有凝血酶受体存在, 并证实是属 G 蛋白偶联家族。用免疫杂交和原位杂交证实, 在人的正常动脉表面仅内皮细胞有凝血酶受体蛋白和 mRNA 的存在; 而在动脉粥样硬化的动脉中, 除内皮细胞外, 平滑肌细胞及巨噬细胞均有大量的凝血酶受体蛋白和 mRNA 的存在。

2 凝血酶对血管内皮细胞的影响

2.1 凝血酶增加内皮细胞通透性

在体外培养的血管内皮细胞培养液中加入凝血酶后, 可以观察到内皮细胞发生收缩, 体积变小, 细胞核尚完整, 但细胞间隙明显加宽, 细胞皱缩, 透光度减低, 边缘模糊^[11]。测定标志细胞损伤的乳酸脱氢酶的浓度升高, 并呈现一定的凝血酶浓度及作用时间依赖性。凝血酶使血管内皮细胞通透性升高是导致内皮屏障功能减低的始动因素。用免疫荧光的方法监测了细胞间连接成分血管内皮钙黏着蛋白复合体 (vascular endothelial cadherin junctional complex, VE-cadherin) 及钙黏着蛋白 (α -cadherin, β -cadherin) 在单细胞层的分布, 发现在培养的人脐静脉内皮细胞中加入凝血酶后, 正常在细胞周边均匀排列的 VE-cadherin 及相关链接蛋白减少、断裂及排列混乱, 细胞间缝隙明显。同时显示内皮细胞通透性明显增强^[12]。

大量实验研究证实凝血酶对血管内皮细胞的作用是由凝血酶受体介导的。凝血酶受体激活使肌醇三磷酸 (IP_3) 大量生成, IP_3 使细胞内钙离子浓度迅速升高, 进而造成管壁内皮细胞通透性增强。细胞内钙离子浓度升高, 可使蛋白激酶 C (PKC) 激活。钙离子升高还可进一步激活钙调蛋白依赖的多种信号转导途径, 如 P^{21} Ras 途径和肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 途径^[13,14]。 P^{21} Ras 是一种小分子量的 GTP 结合蛋白, 仅有一条链构成, 又称小 G 蛋白, 本身

具有 GTP 酶活性。活化 P^{21} Ras 调节基因表达, 促使细胞生长增殖。另外, 钙离子依赖的 PKC- α 还能增加 VE-cadherin 的分解, 使血管通透性进一步增强^[15]。

Sandoval 等^[16]将凝血酶加入体外培养的人脐静脉内皮细胞, 测量了细胞电阻、内皮通透性、 IP_3 、钙离子浓度、肌球蛋白轻链 (MLC) 磷酸化及 VE-cadherin, 结果显示凝血酶使人脐静脉内皮细胞电阻降低 50%, 对 ^{125}I 标记白蛋白的通透性增加 2 倍, 以及 IP_3 、钙离子浓度、MLC 磷酸化、VE-cadherin 等的变化均有不同程度的升高。

2.2 凝血酶上调血管内皮生长因子受体

血管内皮生长因子 (VEGF) 对内皮细胞的作用十分广泛, 能够改变内皮细胞对多种蛋白酶、整合素、葡萄糖转运蛋白的表达, 还能促进内皮细胞的迁移和增殖, 并能防止内皮细胞凋亡与衰老^[17]。VEGF 是目前所知作用最强的一种促血管生长因子, 同时又是一个最强有力的血管通透因子, 其通透效应相当于组织胺作用的 5 万倍, 这种双重作用决定 VEGF 对血管内皮细胞作用的双向性, 既有保护内皮的一面, 又有损伤的一面, 其决定因素在于 VEGF 的作用剂量、作用时间、以及周围其他条件的协同作用。而且一种生长因子的改变往往通过自分泌和旁分泌引起其他许多生长因子的改变, 这些生长因子协同作用导致 VEGF 对血管的损伤作用与促进血管生存作用表现复杂化^[18]。

Tsopanoglou 等^[19]观察到凝血酶与体外培养的人脐静脉内皮细胞共同温育促进细胞增殖; 用定量 RT-PCR 技术证明凝血酶以时间及剂量依赖模式上调 VEGF 的两个酪氨酸激酶受体 KDR 和 flt-1 mRNA 的表达; 经免疫沉淀及免疫印记技术显示 KDR 蛋白合成水平升高; 由于 KDR、flt-1 mRNA 表达受 PKC 和 MAPK 激活剂和拮抗剂调控, 作者认为凝血酶上调 VEGF 受体表达是经 PKC 和 MAPK 信号途径转导的。相反, VEGF 还可以进一步活化尿激酶型纤溶酶原激活物受体^[20]、组织因子^[21]等与凝血酶密切相关的因子, 使凝血酶原转化为凝血酶, 进一步加强对内皮细胞的发挥作用。

2.3 凝血酶促进血管内皮释放细胞外基质降解酶

细胞外基质合成或降解代谢失衡与许多心血管疾病的发生有关, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组具有共同功能域的、含有锌离子依赖肽链内切酶, 特征是能分解细胞外基质

[22]。MMPs 以酶原的形式被分泌到细胞外基质中, 在适当的条件下被激活而参与生理性组织重塑、肿瘤浸润、关节炎等多种生理和病理过程。近年来研究表明, MMPs 的表达及活性增强参与许多心血管的发展过程, 其中关系最为密切的是 MMP-2。Lafleur 等[23] 证明凝血酶使脐静脉内皮细胞的前 MMP-2 活化, 同时证明 MMP-2 活化是由膜型基质金属蛋白酶(MT-MMPs)介导而不是通过经典的凝血酶受体途径。这与 Zucker 等[24]的研究结果一致。Pekovich 等[25]认为凝血酶对内皮细胞 MMP-2 的释放是由 PKC 介导, 血栓调节素加强对凝血酶使内皮细胞 MMP-2 的释放作用。由于血栓调节素及 PKC 的参与, 使凝血酶对凝血因子及细胞外基质两类不同体系的作用结合起来。

2.4 凝血酶促进血管内皮表达黏附分子

黏附分子(adhesion molecules, AMs)是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间相互接触和结合的膜表面糖蛋白。在胚胎的发育和分化、正常组织结构的维持、炎症反应与免疫应答、凝血与血栓形成、创伤的愈合、肿瘤浸润与转移等许多生理和病理过程中黏附分子发挥着重要的生物学功能。许多研究表明凝血酶上调血管内皮细胞多种黏附分子的表达, 如白介素、TNF- α 、E-选择素、P-选择素、ICAM-1、VCAM-1 等[26,27]。这些黏附分子参与调节炎症反应, 促进白细胞的活化及与内皮细胞间的相互作用, 对血管而言, 最终导致基底膜胶原蛋白降解, 心血管系统损伤。Kaplan 等[27]用 RT-PCR 和免疫荧光染色技术证明凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞上调 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达, 于加入凝血酶后 6 h 出现, 12 h 达高峰, 24 h 降至较低水平, 其作用效果类似于 TNF- α 对内皮细胞的作用。Minami 等[28]首先用 RT-PCR 技术证明凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞上调 VCAM-1 mRNA 表达, 为判定是否 VCAM-1 mRNA 表达上调是由凝血酶诱导 VCAM-1 基因的启动子所启动, 进一步的工作是用基因重组的方法构建含有两个基因片段的载体质粒(含荧光素酶), 一是 VCAM-1 启动子基因片段(含 1835 碱基对), 二是核转录因子(NF- κ B)基因片段, 然后转染人脐静脉内皮细胞。比较有无凝血酶条件下转染细胞的荧光素释放来判断 VCAM-1 启动子的活性, 发现凝血酶使转染细胞 VCAM-1 启动子表达升高 3.3 倍, 同时实验证明凝血酶刺激 VCAM-1 启动子是通过 NF- κ B 实现的。NF- κ B 是广泛存在于真

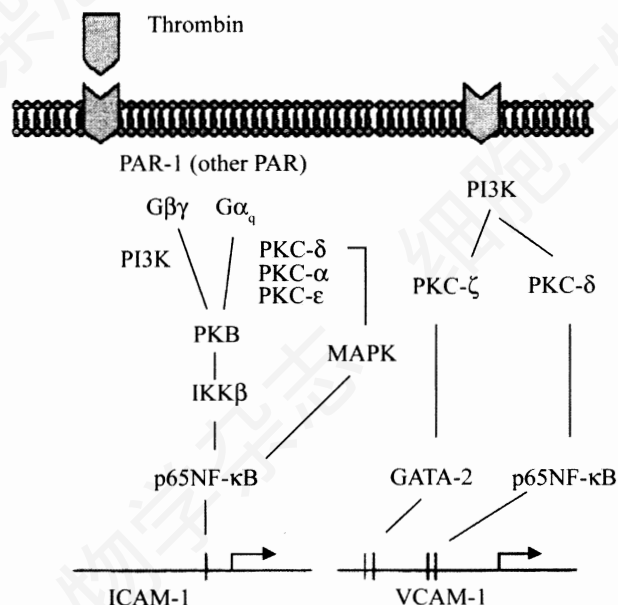


图1 凝血酶作用内皮细胞表达 ICAM-1、VCAM-1 信号转导网络图(根据文献[1]改绘)

PAR: 蛋白酶激活的受体; G: GTP 结合蛋白; PI3K: 三磷酸肌醇激酶; GATA: 转录因子成分; ICAM: 细胞黏附分子, VCAM: 血管黏附分子。

核细胞内的一个重要的细胞核转录因子, 它能影响和控制多种基因的表达调控, 由 5 个不同的 DNA 结合蛋白组成, 包括 p50、p52、p65(RelA)、c-Rel 和 RelB。在静止细胞 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B 结合以非活性复合物形式被锚定于细胞浆, 一旦活化 NF- κ B 将进入细胞核, 与其靶基因的启动区域结合而发挥生理和病理功能。内皮细胞与凝血酶作用后可以看到胞浆内 NF- κ B 迅速向细胞核转移。实验显示凝血酶介导内皮细胞表达 ICAM-1 过程中, p65NF- κ B 同形二聚体进入细胞核与其靶基因上游启动区域结合[29]。类似的过程还见于凝血酶诱导内皮细胞表达 VCAM-1, 同时显示 p65NF- κ B 同形二聚体与靶基因结合经 PKC- δ -NF- κ B 和 PKC- ζ -GATA 以及 PI3K 激酶信号途径[30]。GATA- 结合蛋白最早作为构成活化转录因子的成分被发现, 后来的研究证实还有重要的基因调节作用。总之, 有理由认为, 凝血酶诱导内皮细胞表达 ICAM-1、VCAM-1 过程中, 经细胞表面 PARs 介导, 有 PKC- δ 、PKC- ζ 、NF- κ B 和 GATA 表达或活化[30, 31]。凝血酶促进血管内皮表达 ICAM-1、VCAM-1 的可能机制如图 1 所示。

3 小结

凝血酶通过其受体或非受体途径介导了多种分

子和细胞间的相互作用而形成复杂的信号转导网络。迄今为止,已发表的文献中凝血酶对内皮细胞的作用的分子机制尚无较系统、完整的描述。上述有限的实验研究足以表明,人们对凝血酶的认识已经远远超出了以往作为凝血因子的范围。对于血管屏障的内皮细胞,凝血酶的作用表现在血管通透性、内皮生长因子、黏附分子及基质金属蛋白酶方面,而这些因素与心血管疾病的发生与发展息息相关。对于凝血酶的深入研究,为心血管疾病的防治开阔了视野,提供了新思路。

参考文献 (References)

- [1] Minami T *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 41
- [2] 王 敏等。中国动脉硬化杂志, 2003, **11**: 609
- [3] Yang Z *et al. Circulation*, 1997, **95**: 1870
- [4] Patterson C *et al. Circ Res*, 2001, **88**: 987
- [5] Vu TK *et al. Cell*, 1991, **64**: 1057
- [6] Nakanish-Matsui M, *et al. Nature*, 2000, **404**: 609
- [7] Camerer E *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 5255
- [8] O'Brien PJ *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 13502
- [9] Daub H *et al. Nature*, 1996, **379**: 557
- [10] Kalmes A *et al. Circ Res*, 2000, **87**: 92
- [11] 王 敏等。中国新药杂志, 2004, **13**: 226
- [12] Rabiet MJ *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 488
- [13] Yynch J J *et al. J Clin Invest*, 1990, **85**: 1991
- [14] Moore TM *et al. J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**: L691
- [15] Sandoval R *et al. J Physiol*, 2001, **533**: 433
- [16] Sandoval R *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, **280**: 239
- [17] Ferrara N *et al. Endocr Rev*, 1997, **18**: 4
- [18] Zeng H *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 26969
- [19] Tsopanoglou N E *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 23969
- [20] Behzadian MA *et al. FASEB J*, 2003, **17**: 752
- [21] Zucker S *et al. Int J Cancer*, 1998, **75**: 780
- [22] Coussens LM *et al. Chem Biol*, 1996, **3**: 895
- [23] Lafleur MA *et al. Biochem J*, 2001, **357**: 107
- [24] Zucker S *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 23730
- [25] Pekovich SR *et al. FEBS Lett*, 2001, **494**: 129
- [26] Kaplanski G *et al. J Immunol*, 1997, **158**: 5435
- [27] Kaplanski G *et al. Blood*, 1998, **92**: 1259
- [28] Minami T *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 47632
- [29] Rahman A *et al. J Immunol*, 1999, **162**: 5466
- [30] Minami T *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 6976
- [31] Rahman A *et al. Circ Res*, 2002, **91**: 398
- [32] Hajra L *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 9052

Thrombin and Vascular Endothelial Cell

Min Wang*, Xiao-Jun Wang¹, Lian-Qun Cui¹

(Department of Biomedicine, College of Informational and Electrical Engineering, Shandong University of Science and Technology, Jinan 250031, China; ¹Department of Cardiology, Shangdong Provincial Hospital, the Clinical Medical College of Shangdong University, Jinan 250021, China)

Abstract Thrombin plays an important role in blood coagulation. Thrombin also exerts direct effects on vascular cells, which interacts with members of the protease-activated receptor family. Evidences implicate thrombin-mediated signaling events in the response to injury that typifies vascular lesion formation in atherosclerosis and restenosis. In this review, we focus on that thrombin signaling in the endothelium is linked to multiple changes, including alterations in permeability, expression of matrix metalloproteinases, vascular endothelial growth factor and adhesion molecules.

Key words thrombin; vascular endothelial cell; vascular disease

Received: May 12, 2004 Accepted: August 25, 2004

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No.Y2003C01)

*Corresponding author. Tel: 86-531-5903198, E-mail: minwang859@hotmail.com