

凝血接触系统对人血管内皮细胞炎症活性的影响

刘伟*¹ 汤耀卿¹ 李磊¹ 陈雪华² 纪玉宝² 周同³

(上海交通大学医学院附属瑞金医院,¹ 外科ICU,² 上海消化外科研究所,³ 肾内科, 上海 200025)

摘要 内源性凝血途径的起始部分称为接触系统, 包括高分子量激肽原、前激肽释放酶、XII因子和XI因子。以接触系统成分及激活产物分别刺激人血管内皮细胞, 检测了其NF- κ B活性、细胞间黏附分子1(ICAM-1)表达和炎性细胞因子分泌的变化。结果显示: 与对照组相比较, 只有游离XI因子和激活的XI因子可以使内皮细胞NF- κ B活性升高, 并具有统计学差异($P < 0.01$), 而激活的XI因子能够进一步使内皮细胞的ICAM-1和细胞因子分泌显著增加($P < 0.01$)。其余各组与对照组相比没有统计学差异。这些观察结果提示接触系统可以直接活化血管内皮细胞, 说明内源性凝血途径也参与了炎症的发展过程。

关键词 XI因子; 炎性细胞因子; 血管内皮细胞; NF- κ B; 细胞间黏附分子1

临床上许多危重病病人往往伴有凝血异常, 而近年来炎症与凝血过程相互作用的机制也得到初步阐明^[1,2]。目前认为, 主要是外源性凝血途径参与了炎症的发生和发展, 但内源性凝血途径是否对炎症也有类似作用仍不清楚。

内源性凝血途径的起始部分被称为接触系统, 由高分子量激肽原(high-molecular weight kininogen, HMK)、前激肽释放酶(prekallikrein, PK)、XII因子(factor XII, FXII)和XI因子(FXI)组成, 在某些刺激因素如内毒素的作用下在血管内皮细胞膜上发生接触激活, 最后产生激活的XI因子(FXIa)、激肽释放酶和缓激肽^[3,4]。

接触系统与补体、纤溶、血管紧张素等血浆级联反应酶原系统之间存在着复杂的联系, 而后者又和炎症相互作用; 同时, 从进化的角度而言, 凝血和固有免疫系统是同源的。因此, 我们推测接触系统应该和炎症之间也有直接联系和互动。

为了证明上述假说, 本研究希望通过观察接触系统对血管内皮细胞NF- κ B活性、炎性细胞因子和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响, 探讨内源性凝血系统对炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞采用人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926, 由美国北卡罗来纳大学病理系 Cora-Jean Edgell 博士赠

送; DMEM 培养液购自吉诺生物公司; 胎牛血清购自 Biochrome AG 公司; 细胞培养板和培养瓶购自 Corning 公司; 接触系统的成分 HMK、PK、FXI、FXIa、FXII、FXIIa 购自 Enzyme Research Laboratories 公司; 激肽释放酶、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(Pipes)和内毒素(O55: B5 脂多糖, 大肠杆菌)购自 Sigma 公司; Triton X-100 购自上海化学试剂站; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自上海金璐公司; 碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自 Molecular Probes 公司; 鼠抗人 p65 单克隆抗体(sc-8008)购自 Santa Cruz 公司; FITC 标记山羊抗鼠 IgG Fab'2 购自 DAKO Cytomation 公司; CY5 标记的单克隆小鼠 IgG₁(555750)和 CY5 标记的抗人 CD54 单克隆抗体(55512)购自 Bioscience Pharmigen 公司; TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购自 Bender MedSystem 公司。其余生化试剂为国产。

Pipes-Triton 缓冲液配方: 10 mmol/L Pipes, 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 EA.hy926 用加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养在 75 cm² 培养瓶中(培养条件为 37 °C, 5% CO₂), 1:2 传代后 5 天备用。实验前 48 h 将 EA.hy926 转移到 12 孔细胞培养板每孔约 2×10⁵ 个细胞, 每一孔为一组。

1.2.2 NF- κ B 活性的检测 将 EA.hy926 细胞分为

11 组, 分别为空白对照组、PI 对照组、阴性对照组、HMK 组(100 $\mu\text{g/ml}$)、PK 组(50 $\mu\text{g/ml}$)、FXI 组(5 $\mu\text{g/ml}$)、FXIa 组(5 $\mu\text{g/ml}$)、FXII 组(35 $\mu\text{g/ml}$)、FXIIa 组(35 $\mu\text{g/ml}$)^[3,4]、激肽释放酶(K 组, 5 $\mu\text{g/ml}$)^[5]和氯化锌对照组。由于锌离子是接触系统激活过程中必须的, 故每组中都加入 50 nmol/ml 氯化锌^[6], 并设立氯化锌对照组。分组后的细胞按文献[7]的方法检测 NF- κB 活性。按以上浓度分别加入试剂, 加毕将细胞培养板置培养箱 30 min, 然后弃去培养液, 用温 PBS 轻轻洗涤细胞 2 次。每组细胞加入 300 μl Pipes-Triton 缓冲液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 后弃去上清液, 用含 1% BSA 的 PBS(PBS-BSA)将细胞核洗下, 再用 PBS-BSA 洗涤 2 次。每组细胞核加入 1 μg 鼠抗人 p65 单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后用 PBS-BSA 洗涤 2 次。每组加入 300 μl 1:300 稀释的 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG, 室温下静置 30 min, 再用 PBS-BSA 洗涤 2 次。加入 1 $\mu\text{g/ml}$ PI, 并加入 400 μl 含 1% 多聚甲醛的 PBS 固定。标本用 FACS Calibur 流式细胞仪分析, 比较各标本 FITC 的荧光强度。

1.2.3 TNF- α 和 IL-6 的检测 细胞分为对照组、内毒素组(LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$)、FXI 组(5 $\mu\text{g/ml}$)、FXIa (5 $\mu\text{g/ml}$), 分别加入试剂后置恒温箱 24 h, 收集上清液。每组设 2 个平行孔, 实验重复 5 次。按照 ELISA 试剂盒说明进行细胞因子检测。

1.2.4 CD54(即 ICAM-1)的检测 细胞分为同型对照组、阴性对照组、内毒素组(10 $\mu\text{g/ml}$)、FXI 组(5 $\mu\text{g/ml}$)、FXIa(5 $\mu\text{g/ml}$)、高浓度 FXI 组(7.5 $\mu\text{g/ml}$)和高浓度 FXIa 组(7.5 $\mu\text{g/ml}$)等 7 组, 分别加入上述试剂, 细胞置恒温箱 6 h; 用 0.25% 胰蛋白酶分别收集细胞, 同型对照组加入 20 μl CY5 标记的单克隆小鼠 IgG₁, 其余各组分别加入 20 μl CY5 标记的抗人 CD54 单克隆抗体, 避光静置 30 min。加入 400 μl 含 1% 多聚甲醛的 PBS 固定, 流式细胞仪检测其表达 CD54 的细胞比值。实验重复 15 次。

1.3 统计分析

使用 SAS 8.1 软件(美国 SAS institute Inc.)进行统计。所有变量均以均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析(ANOVA), 各实验组与阴性对照组间比较采用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 接触系统各成分对人内皮细胞 NF- κB 活性的影响

实验重复 6 次, 各组 EA.hy926 细胞经刺激后, 细胞核 FITC 荧光强度见表 1。方差分析显示各组数据有明显差异, $F=3.13$, $P=0.007$; 各组与阴性对照组的比较则显示只有 FXI 组和 FXIa 组的荧光强度明显升高, $P=0.002$ 。这说明在以正常血浆浓度的接触系统各成分刺激后, 与阴性对照相比较, 人内皮细胞株 EA.hy926 可以被 FXI 或 FXIa 激活, 导致其 p65 转移到细胞核内(细胞核内荧光强度明显升高)。而其他接触系统的成分或其产物, 如 FXIIa、激肽释放酶则不能直接激活内皮细胞。氯化锌对照组的设立也显示锌离子对本试验的结果不产生影响。

2.2 TNF- α 和 IL-6 分泌的变化

FXI 与 FXIa 刺激 EA.hy926 后炎性细胞因子分泌的变化见图 1。相对于对照组, FXIa 组细胞培养液中 TNF- α (10.7 \pm 0.6 vs 3.7 \pm 0.3 pg/ml)和 IL-6(120.1 \pm 7.2 vs 69.1 \pm 2.4 pg/ml)的浓度均显著上升, $P < 0.001$;

表 1 不同刺激后 EA.hy926 细胞核的 FITC 荧光强度

组别	FITC 荧光强度	与阴性对照组比较 <i>F</i> 值	与阴性对照组比较 <i>P</i> 值
阴性对照	31.84 \pm 2.82	-	-
HMK	32.46 \pm 3.86	0.05	0.816
PK	34.94 \pm 5.14	1.37	0.247
FXI	40.51 \pm 4.17	10.77	0.002
FXIa	40.65 \pm 4.48	11.12	0.002
FXII	33.63 \pm 6.12	0.46	0.501
FXIIa	33.29 \pm 4.38	0.30	0.587
K	33.50 \pm 5.81	0.39	0.533
氯化锌	33.77 \pm 3.36	0.54	0.468

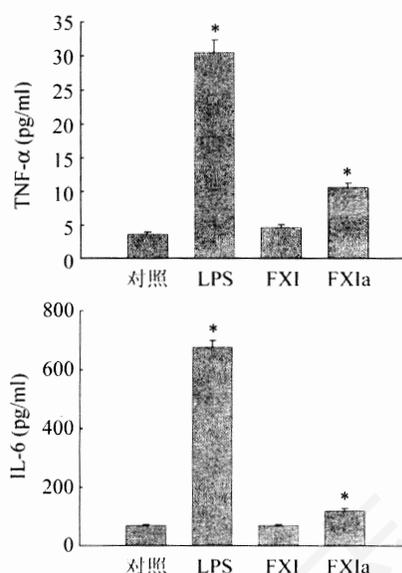


图 1 EA.hy926 细胞炎性细胞因子分泌的变化
与对照组相比, * $P < 0.001$ 。

表2 FXI和FXIa刺激后EA.hy926细胞表达CD54的比例

组别	表达CD54的细胞比例	与阴性对照组比较F值	与阴性对照组比较P值
阴性对照组	21.83±4.76	-	-
内毒素组	54.46±10.73	118.46	<0.001
FXI组(5 μg/ml)	24.03±6.24	0.61	0.439
FXI高浓度组(7.5 μg/ml)	23.83±6.29	0.50	0.482
FXIa组(5 μg/ml)	29.69±8.61	7.72	0.007
FXIa高浓度组(7.5 μg/ml)	31.31±9.00	11.24	0.001

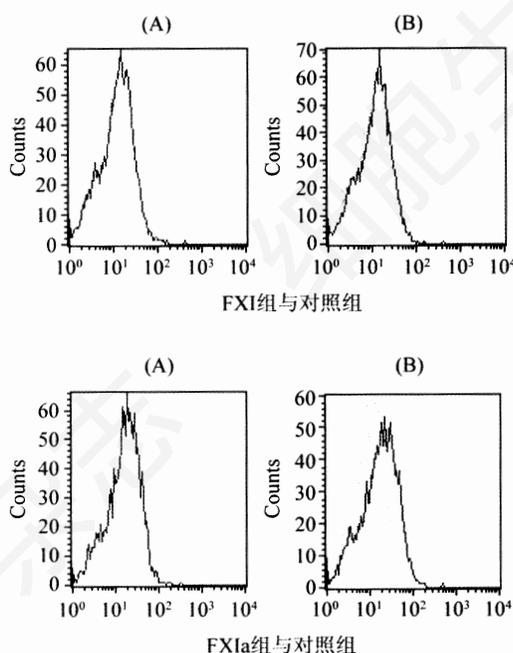


图2 CD54表达的流式细胞术检测结果

绿色虚线为阴性对照组, 红色实线为实验组。A: 正常浓度(5 μg/ml)刺激组; B: 高浓度(7.5 μg/ml)刺激组。

而FXI组与对照组相比则无统计学差异。

2.3 CD54表达的变化

CD54表达的变化见表2和图2。从结果可以看出, 各实验组之间有着显著差异, $F=31.09$, $P<0.001$ 。与阴性对照比较, 10 μg/ml内毒素可以强烈刺激内皮细胞ICAM-1的表达。正常浓度血清浓度(5 μg/ml)或1.5倍血清浓度(7.5 μg/ml)的FXI因子都不能刺激内皮细胞表达ICAM-1; 而上述两种浓度的FXIa都能够使更多的内皮细胞表达ICAM-1, 上升比率约为50%。

3 讨论

凝血过程分为外源性途径(组织因子途径)和内源性途径(接触激活)。目前认为在脓毒血症或多脏器功能衰竭(multiple organ failure, MOF)时, 外源性途径是导致凝血异常的主要因素^[8], 但我们从炎症

的扁平网状结果推测内源性凝血系统对炎症也存在直接作用。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)是炎症过程中的关键细胞。当VEC被激活后, 通过NF-κB的活化, 可以表达大量细胞因子和黏附分子, 使炎症进一步加强, 因此我们选择了人脐静脉内皮细胞来源的EA.hy926细胞株作为实验的靶细胞。

NF-κB活性的增高意味着VEC的激活。NF-κB是一种转录因子, 可以调节许多细胞因子、黏附分子和干扰素的合成。多数情况下NF-κB以p50/p65的二聚体形式存在于细胞浆中, 并与其抑制物IκB形成复合物。当细胞受到刺激, 通过一系列信号传导, 导致IκB的磷酸化和水解, p65即可转移到细胞核内与靶基因启动子的特定序列结合, 导致转录过程的激活^[9]。从我们的实验结果可以看出, 在接触系统的各个组成成分中, FXI或其活化形式FXIa刺激EA.hy926细胞株30分钟就可以使后者细胞核内p65的数量明显增加(表现为细胞核内的FITC荧光强度上升), 表明其NF-κB活性增高。但是, 由于NF-κB的活化有着广泛的作用, 因此仅仅内皮细胞NF-κB活化不能直接说明接触系统对炎症的促进作用。VEC转为活化促炎状态, 表现为促进凝血、促进黏附和分泌炎症性细胞因子, 因此VEC分泌炎症性细胞因子和表达大量黏附分子可以看作其活化的信号^[10]。我们的实验说明, 以FXI和FXIa刺激EA.hy926后, 与对照组相比, FXIa刺激组TNF-α和IL-6的分泌显著增加, 并且表达更多ICAM-1。

因此, 我们实验的结果说明: FXIa可以导致血管内皮细胞的激活。接触系统也即内源性凝血途径和外源性凝血途径一样可以直接地影响炎症过程的进展。与其在凝血过程中仅起辅助作用相比, 内源性凝血途径在炎症中的作用似乎更为重要。这一发现有助于我们对凝血系统和炎症之间关联的全面理解。

同时, 我们的实验结果表明, 接触系统可以从两个层面影响炎症。第一个层面是其产物。FXIa

和缓激肽一样,是接触系统激活的产物之一。缓激肽有着广泛的炎症效应,如舒张血管、产生痛觉,与其受体结合后也可导致炎症介质的进一步释放。我们的实验结果表明,在接触系统的产物中不仅仅是缓激肽,FXIa 同样也可以激活 VECs,导致炎症的放大。另一个层面是接触系统的正常成分 FXI。虽然 FXI 未能直接引起 VECs 表达 ICAM-1 和分泌细胞因子,但是它可以导致 VECs NF- κ B 活性的增高。正常情况下 FXI 与 HMK 按 1:1 比例结合,并以复合体的形式存在于血液循环中,因此血浆中游离 FXI 很少^[4]。下述情况血浆中可能会出现比较多的游离 FXI:接触系统激活的产生激肽释放酶,后者水解 HMK 释放出缓激肽。在这种情况下,由于 HMK 被水解,游离形式的 FXI 就有可能被释放出来,从而导致炎症。Kahn 等^[11]的研究发现,小儿血管炎的病人其血浆中的 HMK 被大量水解,缓激肽的水平也高于正常儿童。这一研究可以和我们的结果相互补充。

接触系统虽然有四种组成成分,但其激活过程实际可以分成两个独立又互相影响的部分。一部分由 HMK、PK、FXII 组成,激活的结果是产生缓激肽和 FXIIa,从而导致炎症和凝血。另一部分由 HMK、FXI、FXII 组成,FXI 的氨基酸序列与 PK 非常相似。这部分激活的结果产生 FXIa 和 FXIIa,

我们发现 FXIa 也可以产生炎症效应,说明接触系统激活的两个部分都分别具有了凝血和炎症效应。在此机制中,激肽释放酶对游离 FXI 的释放似乎也起到正反馈的作用。

FXI 通过何种途径引起内皮细胞 NF- κ B 的活化目前尚不得而知。已经知道的是 HMK 可以与内皮细胞的细胞骨架成分细胞角蛋白结合,也可以与血小板结合^[12]。由于 FXI 和 HMK 以复合物的形式结合,FXI 可能通过 HMK 的中介与内皮细胞结合,这是一种可能;另一种可能是 FXI 有自己单独受体。有研究证实,FXI 可以与被凝血酶激活的血小板细胞膜上的糖蛋白复合物 GPIb-IX-V 结合^[13],VEC 是否有类似结构还不清楚。

参考文献 (References)

- [1] Opal SM. *Scand J Infect Dis*, 2003, **35**: 545
- [2] Levi M *et al. Cardiovasc Res*, 2003, **60**: 26
- [3] Yarovaya GA *et al. Biochemistry (Mosc)*, 2002, **67**: 13
- [4] Colman RW *et al. Blood*, 1997, **90**: 3819
- [5] Veloso D. *Scand J Clin Lab Invest*, 2003, **63**: 279
- [6] Joseph K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 8552
- [7] Blaecke A *et al. Cytometry*, 2002, **48**: 71
- [8] Hack CE. *Crit Care Med*, 2000, **28**: S25
- [9] Karin M *et al. Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 621
- [10] Arid WC. *Crit Care Med*, 2002, **30**: S180
- [11] Kahn R *et al. Lancet*, 2002, **360**: 535
- [12] Gustafson EJ *et al. J Clin Invest*, 1986, **78**: 310
- [13] Baglia FA *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 45470

The Effects of Coagulation Contact System on Human Vascular Endothelial Cells

Wei Liu^{1*}, Yao-Qing Tang¹, Lei Li¹, Xue-Hua Chen², Yu-Bao Ji², Tong Zhou³

(¹Surgical Intensive Care Unit, ²Shanghai Institute of Digestive Surgery, ³Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Contact system is the beginning of intrinsic coagulation pathway and comprises four components: high molecular weight kininogen, prekallikrein, factor XII (FXII) and factor XI (FXI). We detected the NF- κ B activity, expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and secretion of TNF- α , IL-2, IL-6 of EA.hy926 (derived from human umbilical vein endothelium) which was stimulated by the components and products of contact system to reveal the impact of intrinsic coagulation pathway on inflammation. We found that compared with the control group, only free factor XI and activated FXI (FXIa) could up-regulate NF- κ B activity ($P < 0.01$); FXIa could further up-regulate expression of ICAM-1 on cells membrane ($P < 0.01$) and secretion of inflammatory cytokines. There is no statistic difference between other groups. These findings indicate that FXI and FXIa have directly influences on endothelium status, which means that intrinsic coagulation pathway contributes the development of inflammation like extrinsic pathway does.

Key words factor XI; inflammatory cytokines; vascular endothelial cells; NF- κ B; intercellular adhesion molecule-1