

P- 选择素及其细胞黏附与血栓形成

赵亚鹏 金佩佩¹ 周 同* 王学锋¹(上海交通大学医学院附属瑞金医院肾内科,¹临床输血科, 上海 200025)

摘要 P- 选择素是选择素家族的重要黏附分子, 作为血小板/内皮细胞活化标志和细胞黏附受体, 其可通过介导血小板、内皮细胞黏附及与白细胞的相互作用, 启动参与了包括炎症和血栓形成等多种病理生理起始过程, 是炎症/血栓的重要介质和靶分子。抑制 P- 选择素及其与配体的结合和作用, 可使病理状态下血栓局部白细胞聚集减少、细胞因子及组织因子表达降低、纤维蛋白生成减少, 从而有助于抑制血栓的形成。因此, 随着 P- 选择素及其细胞黏附与血栓形成研究的不断深入和阐明, 以 P- 选择素为靶标的血栓性疾病的诊断和抗黏附治疗, 也已引起人们关注并具有良好的临床应用价值和前景。

关键词 P- 选择素; 细胞黏附; 抗黏附治疗; 血栓形成

从某种意义上讲, 一切生理活动都可归纳为识别(recognition)与瀑布效应(cascades)两个步骤。细胞识别依赖其分子基础即细胞表面膜糖蛋白分子的相互作用, 是细胞黏附的前奏。黏附分子介导的细胞黏附是机体最基本的生物学现象, 也与体内各种病理生理过程密切相关^[1,2]。P- 选择素(P-selectin)是黏附分子选择素家族的重要成员, 它主要表达在活化的血小板/内皮细胞表面, 通过介导细胞初始黏附启动参与了包括白细胞的黏附迁移级联过程。研究表明, P- 选择素与机体免疫防御功能及多种疾病密切相关, 尤其在炎症反应、血栓形成及肿瘤转移等多种病理生理过程中发挥重要作用^[3]。本文就 P- 选择素及其介导细胞黏附与血栓形成的关系作一综述。

1 P- 选择素及其配体概况

1.1 P- 选择素结构及功能

P- 选择素是一种高糖基化的单链跨膜糖蛋白亦称颗粒膜蛋白, 相对分子质量为 14 000, 与 E-、L- 选择素同属于选择素家族^[1,3]。P- 选择素由胞外区的凝集素(lectin)、表皮生长因子(EGF)及补体调节蛋白重复序列(CRP), 以及跨膜区与胞质区组成。胞外区凝集素区域是 P- 选择素的 C 型凝集素糖识别域(CRD), 并与唾液酸糖蛋白受体、甘露糖结合蛋白及免疫球蛋白 Fc 受体等具有同源性。该糖识别域可识别糖蛋白如 P- 选择素糖蛋白配体 1(P-selectin glycoprotein ligand, PSGL-1)及糖脂分子上的糖配体如唾液酸化及岩藻糖化 N 乙酰氨基乳糖结构的 sLe^x 及

sLe^a。sLe^a 存在于髓系白细胞表面以及 L- 选择素中, 此外多种肿瘤细胞表面也存有 sLe^x 及 sLe^a。而凝集素和 EGF 共同区域又是 P- 选择素与配体结合的主要功能域^[1,3]。P- 选择素主要分布于胞内贮存颗粒即血小板 α 颗粒及内皮细胞的 Weibel-Palade 小体, 尤见于微静脉、小静脉的内皮细胞中。经凝血酶、组胺、补体及活性氧等刺激后, P- 选择素可随颗粒膜与浆膜迅速融合而在浆膜表面表达, 高峰在刺激后的 5~10 min, 约 20 min 后下调, 至少维持 1 h, 并有部分释放入血。高表达的 P- 选择素可通过细胞初始黏附, 介导血小板、内皮细胞黏附以及这些细胞与白细胞的相互作用, 启动炎症反应或血栓形成乃至肿瘤转移^[1~3]。

一般认为, 血小板表面和血中 P- 选择素水平增高可反映体内血小板活化程度, 尤见于血栓性疾病的血栓前状态。此外这种瞬时表达亦与机体防御机制及炎症早期有关^[2]。损伤时活化的内皮细胞首先表达 P- 选择素, 随后表达 E- 选择素。它们与白细胞表面上 PSGL-1 和 L- 选择素中 sLe^a 的结合, 可趋集血液中快速流动的白细胞于炎症部位血管内皮表面滚动减缓, 并通过黏附、离脱、再黏附循环复始的黏附级联过程, 最后使得白细胞迁移并穿越血管进入炎症局部。已证明 P- 选择素与 PSGL-1 介导了白细胞的最初趋集; 随后 P- 选择素与 L- 选择素又介导了新

收稿日期: 2006-09-18 接受日期: 2006-10-18

国家自然科学基金(No.39970340, No.30570865), 上海市科委重点项目基金(No.05JC14039)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-64370045, E-mail: zhoutong_cn@hotmail.com

流经白细胞的复始黏附聚集,这对于白细胞顺利抵达炎症部位并发挥有效作用至关重要。此外上述多种炎症介质可通过不同机制刺激和增强内皮细胞 P-选择素 mRNA 和蛋白质持续性转录合成,这可能也是 P-选择素参与急慢性炎症反应的一个重要机制^[1~3]。因此 P-选择素被认为既是血小板/内皮细胞的活化标志,又是参与炎症和血栓形成等重要介质和靶分子。

1.2 P-选择素糖蛋白配体结构及功能

P-选择素病理生理效应发挥依赖于其与配体的有机结合和相互作用。作为 P-选择素主要配体,PSGL-1 是一种高度唾液酸化的跨膜黏蛋白,相对分子质量为 220 000,具有二硫键连接的同源二聚体结构,其蛋白质骨架携有 1~3 个 N-聚糖链和众多唾液酸化的 O-聚糖链^[1,3]。PSGL-1 表达于髓样细胞和白细胞表面,可与 P-、E-、L-选择素结合,介导髓样细胞与内皮细胞以及白细胞与血小板、内皮细胞之间的相互作用。一般认为,集簇在白细胞微绒毛末端的 PSGL-1,其是血流中白细胞和其他细胞最早接触部位之一。此外 PSGL-1 可通过细胞骨架变化,增强其与 P-选择素的结合黏附作用。这些对切应力下的细胞滚动黏附,以及血流中白细胞趋集到血管内皮表面尤为重要^[1,4]。

最近发现表达在血小板表面的硫脂类也是选择素的配体,硫脂类属硫酸化的糖脂鞘类,是一个稳固的选择素识别位点。利用硫脂类拮抗剂可明显抑制血小板黏附,提示硫脂类可能也是 P-选择素介导血小板黏附聚集的主要配体之一^[5]。

2 P-选择素及其细胞黏附与血栓形成

2.1 P-选择素介导白细胞与血小板/内皮细胞相互作用

适度的黏附分子表达及其细胞黏附是机体生命活动以及防御机制所必不可少。然而在病理状态下的细胞黏附及紊乱,则可能是导致机体异常或病理损伤的关键因素^[1~3]。如血管早期损伤事件可促使血小板和白细胞黏附至受损血管壁,与血管内皮细胞发生作用,与血栓形成及炎症病变密切相关。又如炎症状态下的内皮细胞与白细胞过度黏附和作用,可导致白细胞明显激活并释放大量炎性介质,引发和促进随后的一系列病理生理过程,这些均是造成包括血栓性疾病等脏器持续或复加损伤的重要原因。目前认为,血小板、内皮细胞与白细胞相互作用主要依赖于 P-选择素与配体 PSGL-1 的黏附介导,这一细胞间的相

互作用促进了血栓和炎症网络的形成。表现为凝血异常可诱发炎症^[6],炎症也可促进血栓形成,而 P-选择素依赖的上述细胞黏附机制可将二者紧密联系起来。

作为血小板/内皮细胞活化标志和细胞初始黏附的启动受体,P-选择素可藉蛋白质和基因转录两次表达方式,发挥病理生理效应。如上述,其可通过存在于白细胞表面 PSGL-1,介导血小板、内皮细胞及白细胞间的细胞黏附,以及白细胞沿血管壁于内皮滚动,启动和促进血栓形成及局部白细胞黏附聚集^[4,7~9]。已发现选择素及其配体缺陷的小鼠可出现明显的白细胞滚动障碍^[10]。而 P-选择素所具有的凝集素-EGF 功能结构域,可增加 P-选择素与循环中白细胞表面 PSGL-1 的接触面,充分调节血流中白细胞的起始黏附和炎症过程^[4]。研究进一步证明,P-选择素与 PSGL-1 对血小板/内皮细胞与白细胞相互作用至关重要^[3,7,10]。

2.2 P-选择素与血栓形成

已知体内血栓形成的凝血反应起始于血小板活化。活化后血小板明显表达 P-选择素,后者结合于白细胞可促使其表达组织因子(TF)。释放入血的 TF,即可与血中 FVIIa 结合形成 FVIIa/TF 复合物,始动血栓形成过程中的凝血反应^[11]。研究表明,P-选择素不仅与 PSGL-1 介导血小板与单核细胞/巨噬细胞等白细胞黏附作用,促使这些白细胞表达释放 TF 并形成含脂质微颗粒,然后与活化的血小板膜融合,启动凝血过程;并通过激活外源性凝血途径,产生纤维蛋白,引发血栓前高凝状态^[12]。亦可通过血小板桥调节白细胞间相互作用,并介导白细胞与内皮细胞的相互反应。活化的白细胞不仅能释放组织蛋白酶和弹性蛋白酶,水解组织因子途径抑制物,进一步激活血小板和凝血因子 V,还能释放活性氧,直接或间接地激活或损伤血管内皮,从而加速血栓形成过程^[12,13]。

对 P-选择素在血栓形成机制中作用的研究,最初人们利用狒狒血栓模型发现,在血栓部位可观察到 P-选择素的表达^[14],且采用针对 P-选择素的单抗可明显抑制血栓部位纤维蛋白的沉积^[15]。进一步通过小鼠血栓模型,利用 P-选择素或 PSGL-1 基因剔除等技术,发现经处理后小鼠的纤维蛋白形成和血栓块明显减少,证实了 P-选择素及其配体在血栓中的作用^[16,17]。继而利用抗 P-选择素单抗或 PSGL-1 蛋白嵌合体等干预手段,均发现产生了良好的防治效果^[18~20]。由上述研究显示,P-选择素过度表达可以导致体内血

栓前高凝状态^[18],且循环中表达PSGL-1微颗粒与血小板表面P-选择素结合可促进血栓形成^[20,21]。另发现,血栓小鼠循环中P-选择素水平增高,微颗粒增多,血栓形成明显增加,且受损血管壁炎症细胞浸润也明显增多,抑制P-选择素可明显减少血栓形成及炎症细胞浸润^[15,22]。进一步利用活体小鼠微循环血栓形成实时成像证实,P-选择素在血栓形成初始阶段即明显表达,并介导了白细胞黏附滚动及其血栓部位的聚集。研究还显示,P-选择素在TF集聚于血栓周围并导致随后纤维蛋白增多过程中起着十分重要作用,且这一过程发生在损伤后白细胞聚集之前最初的20 s。另发现,循环中微颗粒及其膜上相连的TF在诱导血栓形成后已融成为血栓部分^[20]。

临床研究发现,血小板表面和血中P-选择素增高确可反映体内血小板活化程度,尤见于血栓性疾病的早期阶段,这为动脉粥样硬化、心脑血管血栓性疾病及各种伴有血栓倾向疾病的早期诊断与病情判断提供了有力依据和指标。已发现,急性冠状动脉综合征(ACS)等患者血中P-选择素水平明显增高^[23];这一状况也同样见于短暂性脑缺血发作和急性脑梗死等缺血性脑血管疾病患者^[24]。我科研究发现,慢性肾脏病尤其肾病综合征患者血中P-选择素水平明显增高,与患者肾功能损害程度密切相关。表明慢性肾脏病患者易伴有高凝、微血管病变和血栓形成。而肾内微血栓形成又是促使疾病进展乃至肾小球硬化,直至发展为终末期肾功能衰竭的一个重要因素,另也预示着增加患者随后心血管事件发生的危险性^[25]。进一步表明,P-选择素对上述血栓性疾病的发生发展过程具有重要意义。

2.3 P-选择素与血栓/炎症关系

研究表明,P-选择素介导参与的血小板/内皮细胞黏附及血管壁炎症状态,是导致包括动静脉血栓形成新的发病机制^[12,22]。最近从深静脉血栓(DVT)中也证实,伴随着患者内皮细胞、血小板和白细胞活化及含TF微颗粒等产物增加,P-选择素介导了它们的黏附结合及相互作用^[26]。因此随着血小板/内皮细胞与白细胞相互作用,以及由此促进形成的血栓和炎症网络新认识在血栓性疾病中的重要意义引起关注,因而对于P-选择素及其依赖的黏附机制亦越给予重视。

如上述,在血栓形成的血小板、内皮细胞与白细胞相互作用中,活化的血小板可通过与循环中单核细胞黏附引起NF- κ B的核转位,从而促使一系列由其

编码的黏附分子和促炎介质等表达,诱发和促进血管壁炎症反应。此外受损血管内皮细胞也可明显表达P-选择素,并通过与单核细胞等白细胞作用,有利于血小板活化因子(PAF)激活白细胞。而作为配体的PSGL-1此时还可作为信号受体转导胞外信号,进一步引起白细胞活化,使之增加释放细胞因子、趋化因子以及增强磷脂酰丝氨酸等丝氨酸蛋白酶表达分泌^[27-29],后者与参与凝血和炎症的凝血酶生成及作用密切相关^[30]。继而通过上调表达活化的整合素与受损内皮细胞黏附分子等作用^[31],使白细胞稳定黏附于血管壁,进一步促进局部炎症反应,从而也加剧了血栓形成和组织受损^[22]。由上述证明,P-选择素/PSGL-1参与了血栓形成过程的一系列炎症反应,而针对P-选择素及配体的抗黏附干预,可有效抑制血栓形成及白细胞的炎症浸润^[32]。

结合临床研究证明,在血栓性疾病如动脉粥样硬化病变发生发展至血栓形成的各个阶段,炎症反应是关键因素。且认为由P-选择素/PSGL-1等介导参与的血小板、内皮细胞及白细胞间相互作用是这一炎症过程的始动因素,而众多黏附分子和促炎介质又参与了这一过程。此外患者动脉粥样硬化斑块形成又促使黏附分子和细胞因子等促炎介质表达释放增加,促进局部炎症反应,引起斑块破裂至血栓形成,直致临床急性心血管事件的发生。由此进一步表明,P-选择素是血栓起始形成的重要启动参与者,并可作为血栓早期的一个分子标志物或干预靶标。

3 抑制P-选择素与血栓病治疗

鉴于P-选择素及其细胞黏附与血栓形成关系十分密切,故以P-选择素为靶标干预血小板/内皮细胞与白细胞相互作用得以抗栓目的抗黏附治疗,已成为包括心脑血管等血栓性疾病治疗及提高疗效的新思路^[12]。而利用抗P-选择素抗体和重组PSGL-1等主要治疗手段,通过抑制和干预P-选择素/PSGL-1的相互作用,已经或正在产生抗栓的抗黏附效应,因而也已受到人们关注。

最近研究发现,采用多普勒血管超声通过观察P-选择素并结合血中D-二聚体(D-dimer)水平,可对早期DVT患者检测灵敏度和特异性分别提高至73%和81%,这一方法体现了P-选择素在早期血栓诊断中的价值^[33]。我们也正尝试利用P-选择素靶标进行磁共振分子成像对DVT早期诊断的研究。此外根据实验与临床资料显示,P-选择素单抗不仅可以降低灵长类

动物模型中静脉壁炎症和血栓形成^[34],且可促进血栓溶解;重组PSGL-1也有促使猪血栓模型溶栓的效果^[35],且可减少犬模型心肌缺血再灌注的损伤面积和程度^[36]。实验也证实了P-选择素拮抗剂可减少静脉血栓中的胶原含量,以及降低血栓后静脉功能不全的发生^[32]。另发现,采用口服P-选择素拮抗剂可降低模型鼠的血栓形成及循环中微颗粒水平,且不影响小鼠的凝血功能^[37],并可减少血管壁的炎症损伤^[38]。最近研究表明,利用P-选择素拮抗剂、重组PSGL-1免疫球蛋白(PSGL-1-Ig)等抑制剂,均对动脉和深静脉血栓、脑卒中及血栓性肾小球肾炎等模型有疗效,且选择素拮抗剂可减少血栓和增加血管自发再通,并呈剂量依赖性。进一步观察到,使用P-选择素单抗治疗的动物模型并未出现明显感染,表明针对P-选择素的抗黏附干预治疗对机体防御功能无明显影响,因而具有良好的临床应用前景^[39]。最近开发的一种可与P-/E-选择素结合的糖复合物,已用于预防心肌梗死再灌注损伤的临床实验。而研制的PSGL-1-Ig已进入静脉血栓治疗的I期临床研究,且约逾500名患者经使用后被证明安全有效。另发现PSGL-1-Ig可减少心脏患者球囊损伤后所致的血管内膜过度增生,以及心脏瓣膜术后的再狭窄,也可明显抑制血栓形成及炎症反应。

另据临床发现,阿司匹林等环氧合酶抑制剂抑制血小板活化作用,与其降低P-选择素有关;而ADP受体阻断剂氯吡格雷较阿司匹林效果可能更佳。也有报道,他汀类药物能明显抑制心脑血管疾病患者P-选择素等表达,对动脉粥样硬化斑块具稳定作用。表明他汀类调脂药物除具有调节血脂作用,也起抗炎抑栓的效应。目前中药的上述治疗作用也已引起关注,如发现川芎嗪可抑制血小板与单核细胞的黏附。此外最近报道没食子酸(GA)具有体内外拮抗P-选择素的黏附作用以及抑制炎症反应效果^[40]。

4 小结

大量研究表明,血栓形成是动静脉血栓栓塞等血栓性疾病发生的早期事件,由此产生的血液凝集和炎症贯穿于血栓性疾病发展的始终。因此早期诊断并采取合适抗栓治疗,可减少血栓性疾病的死亡率和致残率。P-选择素等黏附分子介导的血小板与内皮细胞以及这些细胞与白细胞之间的细胞黏附,是血栓/炎症病理生理过程中的基本现象和共同过程。从这

个意义上说,针对P-选择素靶标的抗栓/抗炎的抗黏附治疗手段,可能也是较理想的血栓形成早期防治措施。因此,随着人们对血小板/内皮细胞与白细胞相互作用的血栓形成机制新学说不断加深认识,以及对P-选择素及其细胞黏附与上述机制研究的不断深入和阐明,相信以P-选择素为靶标的血栓性疾病的诊断和抗黏附治疗,必将具有良好的临床应用价值和前景,以造福于众多患者。

参考文献(References)

- [1] Mcever RP. In: Beckerle MC. *Cell Adhesion*, Oxford: Oxford University Press, 2001, 30
- [2] 周 同等。见: 汤雪明主编。《医学细胞生物学》, 北京: 科学出版社, 2004, 226
- [3] 宋 巍等。《生命科学》, 2001, 13: 82
- [4] Vandendries ER et al. *Thromb Haemost*, 2004, 92: 459
- [5] Merten M et al. *Circulation*, 2001, 104: 2955
- [6] 刘 伟等。《细胞生物学杂志》, 2006, 28: 879
- [7] Andre P et al. *Br J Haematol*, 2004, 126: 298
- [8] Li N et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 2702
- [9] Lutters BC et al. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15: 545
- [10] Yang J et al. *J Exp Med*, 1999, 190: 1769
- [11] Andre P et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13835
- [12] 周 同等。见: 王鸿利主编, 《血栓病临床新技术》, 北京: 人民军医出版社, 2002, 67
- [13] Vandendries ER et al. *Thromb Haemost*, 2004, 92: 459
- [14] Palabrica T et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 1036
- [15] Palabrica T et al. *Nature*, 1992, 359: 848
- [16] Sullivan VV et al. *J Surg Res*, 2003, 109: 1
- [17] Myers DD et al. *J Surg Res*, 2002, 108: 212
- [18] Andre P et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13835
- [19] Sullivan VV et al. *J Surg Res*, 2003, 109: 1
- [20] Falati S et al. *J Exp Med*, 2003, 197: 1585
- [21] Hrachovinova I et al. *Nat Med*, 2003, 9: 1020
- [22] Myers DD et al. *J Vasc Surg*, 2003, 38: 1075
- [23] Newby AC et al. *Physiol Rev*, 2005, 85: 1
- [24] Tanguay JF et al. *Thromb Haemost*, 2004, 91: 1186
- [25] 周 同等。《中国微循环》, 2004, 8: 375
- [26] Chirinos JA et al. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1472
- [27] Koike J et al. *FEBS Lett*, 2000, 477: 84
- [28] Weyrich AS et al. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1525
- [29] del Conde I et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1065
- [30] Shebuski RJ et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300: 729
- [31] Piccardoni P et al. *Blood*, 2001, 98: 108
- [32] Thanaporn P et al. *Surgery*, 2003, 134: 365
- [33] Rectenwald JE et al. *Thromb Haemost*, 2005, 94: 1312
- [34] Downing LJ et al. *J Vasc Surg*, 1997, 25: 816
- [35] Kumar A et al. *Circulation*, 1999, 99: 1363
- [36] Wang K et al. *Thromb Haemost*, 2002, 88: 149
- [37] Myers DD et al. *J Vasc Surg*, 2005, 42: 329
- [38] Myers DD et al. *J Vasc Surg*, 2006, 44: 625
- [39] Sharar SR et al. *J Immunol*, 1993, 151: 4982
- [40] Appeldoorn CC et al. *Circulation*, 2005, 111: 106

Role of P-selectin in Cell Adhesion and Thrombosis

Ya-Peng Zhao, Pei-Pei Jin¹, Tong Zhou*, Xue-Feng Wang¹

(Department of Nephrology, ¹Department of Blood Transfusion, Ruijin Hospital,
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract P-selectin is critical cell molecule of selectin family, which plays a significant role in inflammatory response, blood coagulation and thrombosis by regulating the initial interactions between leukocytes and the blood vessel wall as well as between activated platelets and leukocytes. Multiple studies have shown that these adhesion molecules are not only required for the normal recruitment of leukocytes during an inflammatory reaction but also are important in recruitment of leukocytes and leukocyte microparticles to thrombi and for normal tissue factor accumulation and fibrin generation in thrombi. The inhibition of interaction of P-selectin with the ligand could down regulate cytokine and tissue factor expression and repress recruitment of leukocytes. All of these lead to new targets for antithrombotic therapy.

Key words P-selectin; cell adhesion; anti-adhesion therapy; thrombosis

Received: September 18, 2006

Accepted: October 18, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39970340, No.30570865,) and the Key Program of Shanghai Municipal Science & Technology Commission (No.05JC14039)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045, E-mail: zhoutong_cn@hotmail.com