

凝血酶及其蛋白激酶受体在动脉粥样硬化中的作用

王 旻 王园园 徐东刚

【摘要】 动脉粥样硬化(AS)的发病机制存在多种学说,但任何一种学说均不能全面地解释其发生、发展。近年来研究表明,血管内皮损伤及凝血系统因子对血管内皮的作用在 AS 的发生、发展过程中发挥了重要作用。该文对近年来凝血酶介导的血管内皮损伤机制及其在 AS 中的作用进行了综述,为新型药物研究提供一定的线索。

【关键词】 凝血酶;动脉粥样硬化;血管内皮细胞;血小板

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.02.009

凝血酶是在血管损伤部位生成的具有多种功能的丝氨酸蛋白酶。它可将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,激活循环中的血小板,同时还可以对内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核细胞、T 淋巴细胞及成纤维细胞等多种细胞产生多样化的作用。凝血酶对细胞产生的这种作用是由蛋白激酶受体(PARs)介导的,PARs 属于 G 蛋白偶联受体超家族的成员。在正常的血管中主要表达于血管内皮细胞,少量表达于平滑肌细胞。内皮细胞的 PARs 主要参与血管张力的调节,血管通透性及内皮细胞分泌活性的调节;在平滑肌细胞中其主要参与调控细胞的收缩、移行、增殖、肥大及细胞外基质的分泌等过程。

在内皮细胞功能障碍中,PARs 可导致内皮细胞的前炎性状态,而其在血管平滑肌的高表达也被认为是动脉粥样硬化及狭窄中的关键因素。本文对 PARs 介导的凝血酶对血管的作用进行总结,更深入的认识凝血酶对血管的损伤作用。为新的治疗靶点,新型治疗药物的研究奠定基础。

1 凝血酶对 PARs 的激活

凝血酶激活 PARs 可以使其 N 端结构域发生断裂,生成一个新的氨基酸 N 末端序列,这一序列

可以触发凝血酶受体的配体位活化,使凝血酶受体激活并导致一系列细胞生物学效应。PARs 受体家族目前发现的 4 种亚型分别是 PAR1~4。其中 PAR1 研究最多,主要分布于内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、血小板以及某些淋巴细胞^[1]。PAR1、3、4 由凝血酶激活,PAR2 主要由胰蛋白酶激活。PAR3 主要作为 PAR4 的协同作用因子发挥作用,目前没有发现 PAR3 可单独引起细胞内信号的变化^[2,3]。研究表明,在血小板表面存在两种凝血酶受体 PAR1 和 PAR4,活化其中任何一个均可以引起血小板聚集与释放,抑制 PAR1 能阻断低浓度凝血酶的活化,抑制 PAR4 对凝血酶反应无影响,如果两种抑制剂相加则明显阻滞包括高浓度凝血酶所诱导的血小板活化。这说明低浓度凝血酶条件下,PAR1 介导血小板活化。PAR4 则在功能缺失时作为的替补,由高浓度凝血酶诱导活化。研究表明凝血酶激活 PAR1 和 PAR4 的半效应浓度(EC₅₀)分别为 50 pM 和 5 nM^[4]。PARs 的激活机制及信号转导过程非常复杂,主要在于凝血酶作为一个有催化活性的因子可以激活不只一种 PARs。另外,凝血酶对受体的这种蛋白水解作用是不可逆的过程,最后 PAR 受体激活后可以与不同的 G 蛋白偶联,激活不同的信号转导通路^[5,6]。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 的转导信号激活磷脂酶 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

基金项目:国家科技重大专项重大新药创制(2012zx09102301-017),国家科技重大专项综合性新药研发大平台(2009zx09301-002/05/05),国家自然科学基金(30901827)。

作者单位:100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所基因工程组研究室

通信作者:徐东刚,Email: xudg@nic.bmi.ac.cn

长、增殖^[7]。由于 PARs 的激活是一个不可逆的过程,因此这种作用受到了精确的调控。活化后的 PARs 快速进入细胞内,并被定位于溶酶体进行降解。这种作用的机制包括 PARs C 端的磷酸化,细胞膜的转换以及网格蛋白介导的细胞内吞作用^[8]。PARs 的恢复既需要从细胞内池的动员也需要新蛋白的从头合成。在内皮细胞和成纤维细胞中 PAR1 的再生是通过将细胞内池中储备的受体迁移到细胞膜上实现的^[9],在巨核细胞 PAR1 的再生主要通过从头合成的过程。在平滑肌细胞 Rac-1 在 PAR1 的再生及运输过程中发挥了重要的作用^[10]。

2 凝血酶/PARs 介导的血小板反应

人的血小板表达 PAR1 和 PAR4,两者激活后均可引起血小板的聚集和炎性物质的分泌^[1,11]。在凝血酶较低浓度时,PAR1 即可引起血小板的激活,这主要是由于 PAR1 具有水蛭素样位点,可以与凝血酶结合从而降低整个催化反应的催化能^[1]。PAR4 由于缺少该位点,只在凝血酶高浓度时可以被激活并进一步使血小板活化^[12]。除了激活 PARs 外,凝血酶还可以与血小板表面的糖蛋白(GP) I b α 相互作用,GP I b α 作为协同分子可以使凝血酶定位于血小板表面,促进凝血酶对 PAR 的激活^[13]。血小板被凝血酶激活后发生一系列反应,包括形态改变,P-选择素及 CD40L 定位于血小板膜表面,血小板释放自身的激活剂 ADP、血栓素 A₂、血清素以及生长因子等^[13,14]。

在小鼠体内凝血酶激活血小板主要通过 PAR3 和 PAR4^[11]。在对基因敲除小鼠的研究中显示,PAR3 受体在低浓度凝血酶激活血小板的过程中发挥了重要的作用。研究显示,尽管 PAR3 并不引起细胞内的信号转导过程,但是 PAR3 基因敲除小鼠和 PAR4 基因敲除小鼠显示出相似的抗动脉粥样硬化和抗血栓作用,这种作用与 PAR3 作为 PAR4 的协同作用因子的功能是一致的^[15]。

3 凝血酶/PARs 介导的内皮细胞作用

正常血管主要由内皮细胞通过 PARs 调节血管生理功能。PAR1 是内皮细胞表达的主要受体,其表达水平还受到凝血酶的正反馈调节,这种作用主要通过转录因子 KLF2 介导^[16]。内皮细胞同时表达 PAR2、3、4。

基于血管类型及种属的不同,凝血酶的作用也不尽相同。在正常的动脉中凝血酶可引起内皮依

赖的血管舒张,血管收缩以及直接对平滑肌细胞的收缩作用。研究显示,PAR1 介导的内皮依赖的血管收缩或舒张作用,根据血管的不同有所不同。NO 在 PAR 介导的血管舒张中发挥了重要的作用^[17]。凝血酶可以通过 Ca²⁺ 依赖和 Ca²⁺ 非依赖途径促进内皮细胞表达 NO 合成酶,从而促进 NO 的产生。除了对血管张力的调节及凝血系统功能外,凝血酶对内皮细胞具有更广泛的作用。凝血酶可以对血管壁通透性及内皮细胞分泌表达产生重要的影响^[18]。凝血酶可上调凝血相关基因的表达包括组织因子、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1),凝血酶可上调细胞生长因子、血管新生相关基因(促血管生成素、血管内皮生长因子受体、血小板源性生长因子)的表达,上调细胞因子、趋化因子(白细胞介素-6、8、单核细胞趋化蛋白-1)水平以及细胞黏附分子(细胞间黏附分子、血管内皮细胞黏附分子-1、E-选择素)^[4,5]。这些基因的调控主要由 PAR1 介导,通过不同的信号转导通路和多种转录因子实现的。

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,凝血酶对内皮细胞的作用很可能在动脉粥样硬化的发展过程中发挥了重要作用。

4 凝血酶/PARs 介导的血管平滑肌细胞作用

凝血酶对平滑肌细胞的收缩作用和对血管张力的调节主要通过内皮细胞依赖的机制,目前凝血酶对平滑肌细胞直接的收缩作用也有报道。在正常的血管平滑肌细胞表达 PARs 非常有限,但是在血管损伤和动脉粥样斑块处 PAR1、2 被诱导表达。体内研究发现,凝血酶受体在冠状动脉粥样斑块处的过表达可以导致血管的恶性收缩^[19]。凝血酶对平滑肌细胞的作用类似于促细胞分裂原,可以引起平滑肌细胞的增殖、移行及蛋白合成。PAR1 在这些过程中发挥了重要的作用,而 PAR4 具有一定的协同作用^[20]。凝血酶的这种促分裂原作用与多条信号转导通路和转录因子相关。凝血酶引起的平滑肌细胞移行和增殖作用主要通过 Ca²⁺ 和 PKC 信号通路,同时与早期上调的 egr1、c-fos、c-jun、junB、FosB 等基因密切相关。

5 结语

综上所述,目前对凝血酶的研究已经超出了其

作为凝血因子的范围。多方面的研究提示,凝血酶作为一个凝血系统的关键酶参与了动脉粥样硬化的病理过程,其作用仍有待于深入研究。以凝血酶及 PARs 为治疗靶点的药物研究显示了其巨大的临床应用价值。其他凝血纤溶系统的蛋白酶,也可以在组织损伤、炎症、血栓等病理状态下被激活,同时在很多病理条件下 PARs 的表达上调,这些结果揭示凝血及纤溶系统蛋白很可能参与了多种病理过程,与多个系统存在交互作用,而 PARs 在其中很可能发挥了关键的介导作用。因此,对 PARs 的深入研究不仅可以全面认识疾病的发病机制,而且具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases[J]. *Circulation*, 2006, 114(10): 1070-1077.
- [2] Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. PAR3 is a second thrombin receptor in humans[J]. *Nature*, 1997, 386(6694): 502-506.
- [3] Koukos G, Sevigny L, Zhang P, et al. Serine and metalloprotease signaling through PAR1 in arterial thrombosis and vascular injury[J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(6):412-418.
- [4] Hirano K. The roles of PARs in the vascular physiology and pathophysiology[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 27-36.
- [5] Yamashita T, Abe K. Therapeutic approaches to vascular protection in ischemic stroke[J]. *Acta Med Okayama*, 2011, 65(4):219-223.
- [6] Chintala M, Shimizu K, Ogawa M, et al. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: antagonism of the proteinase-activated receptor 1 for thrombin, a novel approach to antiplatelet therapy for atherothrombotic disease[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(4):433-438.
- [7] Reséndiz JC, Kroll MH, Lassila R. Protease-activated receptor-induced Akt activation—regulation and possible function[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(12):2484-2493.
- [8] Wiisanen ME, Moliterno DJ. Platelet protease-activated receptor antagonism in cardiovascular medicine[J]. *Coron Artery Dis*, 2012, 23(6):375-379.
- [9] Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, et al. Protease-activated receptors differentially regulate human platelet activation through a phosphatidic acid-dependent pathway[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(3):686-694.
- [10] Leonardi S, Becker RC. PAR-1 inhibitors: a novel class of antiplatelet agents for the treatment of patients with atherothrombosis[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, (210): 239-260.
- [11] Yufu T, Hirano K, Bi D, et al. Rac1 regulation of surface expression of Protease-activated receptor-1 and responsiveness to thrombin in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(7): 1506-1511.
- [12] Stalker TJ, Newman DK, Ma P, et al. Platelet signaling[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, (210):59-85.
- [13] Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, et al. Protease-activated receptor-1 and Protease-activated receptor-4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25216-25221.
- [14] Yakushkin VV, Zyuryaev IT, Khaspekova SG, et al. Glycoprotein IIb-IIIa content and platelet aggregation in healthy volunteers and patients with acute coronary syndrome[J]. *Platelets*, 2011, 22(4):243-251.
- [15] Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model[J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(1): 152-161.
- [16] Han N, Jin K, He K, et al. Protease-activated receptors in cancer: a systematic review[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(4): 599-608.
- [17] Lin Z, Hamik A, Jain R, et al. Kruppel-like factor 2 inhibits protease activated receptor-1 expression and thrombin-mediated endothelial activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5):1185-1189.
- [18] Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, et al. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein e-deficient mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343(2):253-257.
- [19] Gudmundsdottir IJ, Lang NN, Boon NA, et al. Role of the endothelium in the vascular effects of the thrombin receptor in humans[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(18): 1749-1756.
- [20] Abdallah RT, Keum JS, El-Shewy HM, et al. Plasma kallikrein promotes epidermal growth factor receptor transactivation and signaling in vascular smooth muscle through direct activation of protease-activated receptors[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(45):35206-35215.

(收稿:2012-12-10 修回:2013-01-31)

(本文编辑:金谷英)