

• 综述 •

前凝血微粒与血管内环境的平衡

殷冬梅 孙茜(综述) 李银平(审校)

【关键词】 前凝血微粒; 血管内环境

血管细胞活化和凋亡时可释放前凝血微粒。微粒是动脉粥样硬化血栓形成的有害因子,来自循环的血小板、单核细胞或内皮的微粒水平与大多数心血管疾病危险因素相关,其水平升高预示着临床预后较差。此外,作为一个有价值的血管细胞损伤标志,微粒通过直接影响血管内皮或血液细胞,在动脉粥样硬化血栓形成过程中起关键作用。在病理情况下,循环微粒可以通过各种方式介导细胞间的相互联系 (cellular cross-talk),导致血管炎症和组织重构、内皮功能障碍、白细胞黏附和应激反应。通过循环微粒暴露的膜磷脂和功能组织因子 (TF) 是两个凝血实体。在血管损伤的位置,活化的内皮细胞或血小板暴露 P-选择素 (P-selectin),与微粒轴承 (bearing) 的 P-选择素糖蛋白配体 1 (PSGL-1) 和血源性 TF 快速结合,触发凝血过程。在动脉粥样硬化斑块中,聚集的微粒表达 TF 活性,在斑块破裂后可促进凝血。

1 微粒的形成

细胞可通过细胞膜组织重构和囊泡化产生微粒。在细胞膜上,横向分布的氨基磷脂 (aminophospholipids) 由特定的酶来控制它们向内 (flip) 和向外 (flop) 移位。在静止的细胞膜,翻转酶 flippase 活性突出,氨基磷脂 [主要是磷脂酰丝氨酸 (PtdSer)] 和磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine) 被固定在内层小叶上。受到刺激后,氨基磷脂迅速移位到外层小叶,一方面使翻转酶 flippase 活性减少,另一方面使翻转酶 floppase 活性增加,导致细胞支架的不平衡。磷脂酰丝氨酸移位至细胞膜外层后,使外层张

力高于内层,因此在细胞膜上形成囊泡并脱落。细胞膜脱落释放微粒,暴露促凝血磷脂酰丝氨酸,而它在外层小叶的比例是不同的。微粒通常是指直径 0.1~1.0 μm,且暴露磷脂酰丝氨酸的膜碎片。

2 微粒表面的止血平衡及失衡原因

2.1 微粒表面:微粒是凝血系统的效应器。对于活化的血小板,循环微粒提供了一个附加的促凝血的磷脂表面,该磷脂表面对凝血级联反应的一系列酶复合物的组合起作用,其催化功能依赖促阴离子氨基磷脂,即磷脂酰丝氨酸,磷脂酰丝氨酸在细胞膜组织重构后移位到外层小叶。一旦接触到循环的血液因子,磷脂酰丝氨酸能够在局部达到有效浓度,以获得必要的动力学条件,达到最佳凝血酶生成和有效止血。事实上,屏蔽富含磷脂酰丝氨酸的表面,降低了 tenase 复合物 (因子Ⅹa、因子Ⅴa、Ca²⁺、磷脂复合物) 和前凝血酶复合物的催化效率,分别降低了 200~1 000 倍^[1]。此外,磷脂酰丝氨酸大大增强了 TF 的促凝血活性,而 TF 是凝血主要细胞的启动者。

2.2 循环微粒对止血平衡的调节:在许多病理情况下,由于细胞膜反应,血小板是循环前凝血微粒的主要来源^[2]。白细胞、红细胞或内皮细胞也是微粒的主要来源^[3-4]。微粒提供的功能性细胞膜或细胞质效应器 [选择素、整合蛋白 αⅡbβ3 (GPⅡb/Ⅲa)、膜糖蛋白Ⅰb、血管性血友病因子、花生四烯酸、血栓素 A₂ 等] 能够促进血栓形成。当微粒轴承有适当的反配体 (counterligands) 时,微粒可以将其前凝血潜能传递到靶细胞。例如,血小板微粒 (PMPs) 可以捆绑可溶性和固定化纤维蛋白原,通过聚合物 (aggregates) 的形成提供前凝血实体到血栓^[5]。在体外,内皮微粒和单核细胞之间的相互作用可以促进 TF mRNA 的表达和 TF 依赖性前凝血活性^[6]。微粒表面存在着血栓调节蛋白 (TM)、TF 途径抑制物 (TFPI)^[7] 和蛋白 C^[8],可能表明微粒的抗凝途径。然而,脂多糖刺激后可促进

TF 表达,单核细胞和单核细胞微粒 (MDMPs) 表面的 TM 活性被 TF 和凝血酶原活性抑制^[8]。心肌梗死的纤溶过程中,微粒表面 TFPI 的表达减少与 TF 诱导的凝血有关^[7]。在活性氧存在的情况下,细胞-微粒聚合物的高表达可能有助于 TFPI 失活和 TF 活性的加密^[9]。微粒表面表达的 TF 活性因为抗凝力量的不足而占优势。

另一个值得考虑的机制是在血栓栓塞症 (thromboresistance)、内皮细胞微粒 (EMPs) 和 MDMPs 表面包含活化蛋白 C (APC) 途径。据报道,APC 能通过蛋白酶激活受体-1 和内皮细胞蛋白 C 受体依赖机制促进 EMPs 和 MDMPs 脱落,这种微粒可表达功能性的内皮细胞蛋白 C 受体,保护其不被金属蛋白酶分裂,并能使因子Ⅴa 失活,从而显示其抗凝活性^[10]。

3 循环微粒和血源性 TF

长期以来一直认为,TF 是表达量微小的结构性蛋白质,当表达量上调时,可将内皮细胞的前凝血功能转换到 TF 驱动的凝血过程的启动。这一观点最近遭到了质疑,原因是循环 TF 中的储蓄池散布在微粒中 (称为血源性 TF),其通过 CD15、CD18 和 TF 依赖的相互作用,可以和发展中的血栓一起被捕获^[11]。关于血源性 TF 的细胞来源仍然有争议,在不同的病理生理条件下其来源不同。在静止的条件下,血源性 TF 主要是由 PMPs 表达^[2],而 MDMP 被认为可能是脂多糖刺激后血源性 TF 的主要供应者^[12]。TF mRNA 在巨噬细胞的缺乏情况下促使 TF 转移到血小板。有关单核细胞、内皮细胞和血小板的血浆或微粒膜之间复杂的交换及融合问题一直被探讨^[13-15]。多形核白细胞是血源性 TF 争议的另一问题,微粒标识证明,这并不排除细胞之间的融合或吞噬^[16-17]。

EMPs 在缺乏刺激的情况下,对血源性 TF 的诱导作用似乎是有限的,但在剧烈的内皮细胞活化情况下可被诱

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.08.022

基金项目:天津市医药卫生中西医结合科研项目(2005088)

作者单位:300193 天津中医药大学(殷冬梅);300050 天津市天和医院(孙茜、李银平)

通信作者:李银平,Email:cccmm.23042150@yahoo.com.cn

发^[6,18-19]。白细胞微粒和 EMPs 也可以诱导 TF 表达^[6,20-21]。

最近仍然质疑 TF 暴露在微粒表面是否为微粒影响血栓形成的一个主要因素^[22-23], TF 的加密/解密 (encryption/de-encryption) 可能是关键的一步。现已有人提出,一种循环的、可替代的、剪接的 TF 形式与血栓形成有关^[24]。但是因其仅代表血源性 TF 的一部分,故临床意义仍有待确定^[25]。

4 微粒与选择素在血栓形成中的相互作用

在过去 10 年中,选择素、微粒和 TF 被认为是血栓形成的三要素^[26-27]。P-选择素是在血小板和内皮细胞表面表达的黏附分子,内皮损伤后其对 TF 聚集和白细胞嵌入血栓是必要的^[28]。PSGL-1 和血小板 P-选择素之间的相互作用能激发 TF 活性,这在血栓形成中很关键。在血栓形成中,造血细胞衍生的 TF 增加与微粒形成的动力学相关^[29]。有研究已经表明,在血友病 A 型小鼠模型中,可溶性 P-选择素 (sP-选择素) 可以促进白细胞源性 TF 阳性微粒的脱落,该微粒大多数来源于单核细胞,能够调整凝血功能^[30]。除了缺乏 PSGL-1 的小鼠外,血浆中的微粒水平会随着年龄的增长而增加,这体现了 P-选择素/PSGL-1 途径的作用。

此外,P-选择素引起的其他机制可能有助于增加血栓形成的倾向。P-选择素被证明有利于将 TF 转移到 MDMPs,且作为血小板的一个功能实体^[31]。P-选择素还可通过单核细胞和 TF 表达促进磷脂酰丝氨酸暴露^[1,32]。

5 微粒和血栓的稳定

TF 阳性的微粒通过与 P-选择素相互作用诱导纤维蛋白形成,稳定血栓^[33]。由于 P-选择素与 PSGL-1 的相互作用通常调节不稳定滚动,在白细胞 TF 阳性的微粒上附加的黏附分子如 $\beta 2$ -整合素 (MAC-1)、B-整合蛋白有助于血栓的稳定^[34]。EMPs 暴露非常大的 von Willebrand 多聚体 (ULvWf) 将促进血小板聚集体的形成,并增加其稳定性^[35]。血源性 TF 对血栓形成过程至关重要,淤血会限制聚集的微粒稀释,即使在有限的损伤部位,血源性 TF 也可以发挥重要作用。在模型小鼠上发现,存在高水平的白细胞源性微粒与局部缺血有关,在血管内皮细胞表面,P-选择素水平

升高,这说明增加微粒聚集可导致深静脉大血栓形成^[36-37]。在静脉血栓患者,通过联合检测 EMPs (表达 E-选择素和 CD31)、EMPs-单核细胞结合物、P-选择素表达量及血小板-白细胞聚合物,可证明患者体内含有明显激活的内皮细胞、血小板和白细胞^[38]。

6 微粒在动脉粥样硬化血栓发展中的作用

一些研究指出,各种来源的微粒均可作为血管壁炎症的效应器^[3-4]。MDMPs 和 EMPs 可以上调细胞因子的表达^[21,39],通过 P-选择素促进白细胞-白细胞聚集和募集^[40]。相反,白细胞源性微粒可以刺激白细胞介素-6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 在内皮的释放,并通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK1) 信号通路上调 TF 表达^[20-21]。在氧化应激条件下,EMPs 包含氧化磷脂,可促进单核细胞与内皮细胞间相互作用^[41]。在单核细胞和血管内皮细胞中,PMPs 能通过提供花生四烯酸上调细胞黏附分子的表达,从而加强细胞的黏附作用^[42]。PMPs 作为促炎症反应因子 IL-1 β 的提供者^[43],也可促进内皮细胞炎症。

综上所述,微粒作为在细胞活化或凋亡过程中形成的具有生物学活性的小囊泡,在止血和炎症反应、血管重构和血管生成、细胞存活与细胞凋亡方面都有重要的作用。微粒构成具有生物学活性的血管效应器参与血栓性反应、血管壁炎症反应和血管重构。循环前凝血微粒的出现与血管相关指标的总体情况有关,微粒在恢复血管稳态方面具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] del Conde I, Nabi F, Tonda R, et al. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5):1065-1070.
- [2] Müller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*, 2003, 17(3):476-478.
- [3] Van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, et al. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(2): 277-287.
- [4] Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Cellular

microparticles; a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*, 2004, 11(3):156-164.

- [5] Holme PA, Solum NO, Brosstad F, et al. Microvesicles bind soluble fibrinogen, adhere to immobilized fibrinogen and coaggregate with platelets. *Thromb Haemost*, 1998, 79(2):389-394.
- [6] Sabatier F, Roux V, Anfosso F, et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*, 2002, 99(11): 3962-3970.
- [7] Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, et al. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 2005, 93(1):35-39.
- [8] Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol*, 1997, 96(3):534-542.
- [9] Pénn MS, Patel CV, Cui MZ, et al. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces; hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation*, 1999, 99(13):1753-1759.
- [10] Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*, 2005, 105(4):1515-1522.
- [11] Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood borne tissue factor; another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5):2311-2315.
- [12] Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 1994, 153(7):3245-3255.
- [13] Scholz T, Temmler U, Krause S, et al. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes; role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost*, 2002, 88(6):1033-1038.
- [14] Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*, 2002, 51(9):

2840-2845.

[15] Breimo ES, Østerud B. Generation of tissue factor-rich microparticles in an ex vivo whole blood model. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2005, 16(6): 399-405.

[16] Østerud B. Tissue factor in neutrophils; no. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(2): 218-220.

[17] Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils; yes. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(2): 214-217.

[18] Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles; a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 2004, 91(4): 667-673.

[19] Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 1999, 104(1): 93-102.

[20] Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 23111-23118.

[21] Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 1998, 161(8): 4382-4387.

[22] Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(12): 2561-2568.

[23] Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, et al. Elevated numbers of tissue factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2002, 106(19): 2442-2447.

[24] Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, et al. Alternatively spliced human tissue factor; a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med*, 2003, 9(4): 458-462.

[25] Yu JL, Rak JW. Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(11): 2065-2067.

[26] Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(8): 1590-1596.

[27] Mackman N. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(11): 2273-2281.

[28] Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med*, 2004, 10(4): 171-178.

[29] Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*, 2003, 197(11): 1585-1598.

[30] Hrachovinová I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med*, 2003, 9(8): 1020-1025.

[31] Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 2005, 106(5): 1604-1611.

[32] Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8767-8771.

[33] Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(7): 1321-1324.

[34] Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med*, 2004, 10(4): 179-186.

[35] Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, et al. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(6): 1301-1308.

[36] Myers D Jr, Farris D, Hawley A, et al. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *J Surg Res*, 2002, 108(2): 212-221.

[37] Myers DD, Hawley AE, Farris DM, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg*, 2003, 38(5): 1075-1089.

[38] Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(9): 1467-1471.

[39] Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, et al. High shear stress induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2001, 158(2): 277-287.

[40] Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000, 95(4): 1317-1323.

[41] Huber J, Vales A, Mitulovic G, et al. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(1): 101-107.

[42] Barry OP, Praticò D, Savani RC, et al. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*, 1998, 102(1): 136-144.

[43] Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*, 2001, 154(3): 485-490.

(收稿日期: 2009-06-08
 修回日期: 2009-07-20)
 (本文编辑: 保健媛)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》
 中国科协主管, 中国中西医结合学会主办, 国家级核心期刊
 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-93, 定价: 每期 9 元, 全年 54 元
 2009 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买, 电话: 022-23042150
 刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号 邮编: 300050