

## 脓毒症中凝血酶-蛋白酶活化受体 1-1-磷酸鞘氨醇信号通路的研究进展

李岩(综述) 俞康龙(审校)

【关键词】 凝血酶; 蛋白酶活化受体 1; 1-磷酸鞘氨醇; 脓毒症

脓毒症是重症监护病房患者最常见的致死原因,其特征表现为促炎、抗炎和凝血反应的失控。尽管应用了新的更有效的抗生素和血管活性药物进行治疗,脓毒症的病死率仍然保持在一个很高的水平上<sup>[1]</sup>。脓毒症造成的组织损害和器官功能障碍不仅是由于微生物的侵入,也是由于机体对感染的防御反应释放了过多的炎症介质所致<sup>[2]</sup>。凝血系统对脓毒症中内皮细胞的炎症反应有显著的调节作用,因此,抑制凝血系统的反应可能是脓毒症治疗更有希望的方向。凝血酶是大家熟知参与凝血反应的物质之一,目前的研究表明,凝血酶除了参与凝血反应外,还可以通过直接激活蛋白酶活化受体 1 (PAR1)或通过活化蛋白 C (APC)间接激活 PAR1,并由此在脓毒症中发挥更广泛的作用。下面就这个情况进行综述。

### 1 作用机制

凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,在凝血级联反应的最后阶段被激活,将纤维蛋白原转化成纤维蛋白。生理上凝血酶能通过蛋白 C(PC)系统自我限制活性,使损伤血管的邻近部位具有防止凝血反应发生和蔓延的抗栓作用<sup>[3]</sup>。PARs 家族是一个 G 蛋白耦联的有 7 个跨膜结构的受体家族,是凝血酶的主要受体<sup>[4]</sup>。PARs 有 4 种亚型 (PAR1~4),凝血酶激活其中的 PAR1、PAR3 和 PAR4,胰蛋白酶激活 PAR2<sup>[5]</sup>。1-磷酸鞘氨醇 (S1P) 为生物活性的鞘脂,位于 PAR1 信号通路的下游。其受体是一种 G 蛋白耦联受体,属于内皮细胞分化基因家族,共有 5 种 (S1P1~5)。凝血酶作为 PAR1 配体与之结合后并不引起信号传递,只

有当凝血酶发挥水解作用在特定部位剪切受体的 N-末端,使其作为配体结合于自身的特定部位,才能引起受体活化并传递信号。PAR1 再通过活化 S1P 来激活 G 蛋白,触发钙动员及一系列第二信使上调,引发下游级联反应<sup>[6]</sup>。

### 2 对内皮细胞屏障的作用

**2.1 屏障破坏作用:** Vogel 等<sup>[7]</sup>观察到在脓毒症中存在内皮细胞屏障功能障碍的情况。在一个灌注鼠肺实验中定量测量了液体和白蛋白的通透性,显示凝血酶增加了肺毛细血管对液体和蛋白的通透性,并且在培养的内皮细胞中也观察到相似的结果。PAR1 激动剂可诱导正常小鼠肺组织增加对液体和白蛋白的通透性,从而导致肺水肿的发生。这些研究表明 PAR1 是凝血酶增加肺微血管通透性和血管舒缩节律作用的主要受体。

内皮细胞主要表达两种 S1P 受体,即 S1P1 和 S1P3,其中 S1P3 是内皮屏障破坏的关键,它与细胞骨架肌动蛋白 A (RhoA) 介导的信号通路有联系。研究表明,凝血酶与内皮细胞表面的 PAR1 结合,通过 RhoA/Rho 激酶 (ROCK) 激活 S1P3,再通过 Rho 信号作用于 Gα12 和 Gα13 重构细胞骨架蛋白,使肌动蛋白减少导致屏障功能的破坏<sup>[8]</sup>。实验研究表明,S1P 通过 S1P3 受体可以破坏肺上皮细胞的紧密连接,引起肺上皮细胞紧密连接处的 claudin-18 分布减少,导致紧密连接蛋白 (ZO-1) 从紧密连接下的胞质中消失,紧密连接发生降解,这是急性肺水肿肺上皮屏障功能受损的一个重要机制<sup>[9]</sup>。

**2.2 屏障保护作用:**凝血酶活化 PC 生成 APC<sup>[10]</sup>,APC 增强内皮细胞的屏障保护作用需要 PAR1 的参与。凝血酶激活 PAR1 导致内皮细胞屏障不稳定,而 APC 作用于 PAR1 却使屏障保持稳定。凝血酶和 APC 介导的不同屏障作用依赖于诱导的 S1P 水平,S1P 受体介导的第二信使 S1P 浓度依赖的选择性<sup>[11]</sup>。

被 S1P 活化的 S1P1 通过稳定细胞骨架要素微管、微丝来稳定细胞的细胞骨架,减少了内皮细胞的通透性,这依赖于 Rho 家族的三磷酸鸟苷酶和丝裂素活化蛋白酶 (MAPKs) 的作用<sup>[12]</sup>。Singleton 等<sup>[13]</sup>的研究表明,高分子质量的透明质酸诱导 CD44s 介导 S1P1 受体和下游的 Rac1 信号增强了人肺上皮细胞屏障功能。

Kaneider 等<sup>[14]</sup>在盲肠结扎穿孔术 (CLP) 脓毒症动物模型中证实了肺血管通透性的发展是呈双期的,早期应用 P1pal-12S (PAR1 的全拮抗剂) 可以保护性地对抗肺水的形成,晚期应用则可加重血管的渗漏。而晚期应用 P1pal-13 (PAR1 的全激动剂) 可以保护性地对抗肺血管渗漏的进一步发展。在内毒素 (LPS) 诱导的脓毒症模型中,凝血酶受体激动肽 SFLLRN (可活化 PAR1 和 PAR2) 可逆转 LPS 诱导的 65%~70% 内皮细胞渗漏,而活化 PAR1 没能恢复内皮细胞的屏障功能,因此,屏障的保护作用可能需要 PAR2 的活化。延迟用凝血酶受体激动肽 SLIGKV (活化 PAR2) 可逆转 LPS 诱导的 70%~100% 的内皮细胞渗漏。应用 RNA 干扰 (RNAi) 沉默了 PAR2 以后,SFLLRN、SLIGKV 和 P1pal-13 的屏障保护作用消失,而在沉默了 PAR1 以后,SFLLRN 和 P1pal-13 的晚期屏障保护作用也明显减弱了。因此,PAR1 和 PAR2 在屏障保护作用中都很重要<sup>[15]</sup>。

### 3 抗凋亡作用

凝血酶活化的 APC 信号通路显示了体内和体外的抗凋亡活性,这个作用需要内皮细胞蛋白 C 受体 (EPCR) 和 PAR1 的参与。APC 下调了促凋亡的 p53 和 Bax 蛋白,维持了保护性的抗凋亡 Bcl-2 蛋白水平,调节了 Bax/Bcl-2 比值;它还能抑制组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 诱导的凋亡蛋白酶-8 的活化,及缺氧或低血糖诱导的凋亡蛋白酶-3 的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.03.019

作者单位:200080 上海交通大学附属上海市第一人民医院危重病科

通信作者:俞康龙,Email:criticalcare@163.com

活化<sup>[16]</sup>。S1P 不仅促进了内皮细胞屏障稳定,而且介导了抗凋亡信号。鞘脂、酰基鞘氨醇和鞘氨醇保持了一个动态的代谢平衡,酰基鞘氨醇与鞘氨醇的比例有时被认为是鞘脂的变阻器。是否是 APC 介导的 S1P 上调以及伴发的酰基鞘氨醇和鞘氨醇的下调导致了 APC 的抗凋亡作用目前还未可知。葡萄糖苷酰基鞘氨醇是酰基鞘氨醇主要的代谢产物,它能增强 APC 抗凝的活性,提示鞘氨醇调控通路和 PC 调控通路之间的相互作用比预想的复杂<sup>[17]</sup>。在脓毒症中凋亡细胞的减少与生存率的提高相关,提示脓毒症中该通路的抗凋亡活性在减少病死率方面有潜在的重要作用。

4 抗炎作用

凝血酶通过激活 APC 发挥一定的抗炎效应,其抗炎作用依赖于 EPCR 和 PAR1 来抑制内皮细胞中炎症基因的表达。它下调了内皮细胞上黏附分子的表达,如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和 E 选择素(E-selectin),并减少了白细胞黏附和迁移。通过抑制白细胞炎症介质的释放,如肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-1(IL-1),可以减弱全身性炎症反应的启动,减弱脓毒症相关的细胞因子风暴。抗炎效应的机制并不完全清楚,可能与 EPCR 和 PAR1、单独的 EPCR 或其他的受体有关<sup>[18]</sup>。蛋白酶 3(PR3)是一种有弹性蛋白酶特性的丝氨酸蛋白酶,可以与 CD11b/CD18 和可溶性的 EPCR 结合。一旦 EPCR、PR3 和 CD11b/CD18 形成的可溶性复合物结合到 PC 和 APC,这个复合物可以介导 APC 信号和(或)白细胞上 PC 的作用。

5 对树突细胞的作用

脓毒症时树突细胞的 PAR1 与 S1P3 相互耦联,对失控的炎症反应有关键作用。树突细胞促进了全身性凝血反应的放大,并且是淋巴系统内炎症和凝血相互作用的主要枢纽。丧失了 PAR1-S1P3 信号的树突细胞可与炎症细胞进入引流的淋巴结,减少 IL-1 $\beta$  扩散进入肺部。因此,被凝血反应活化的树突细胞促进了全身性炎症反应并提高了致死率<sup>[19]</sup>。

树突细胞在天然免疫的活化和消退中扮演重要角色,炎症反应使树突细胞从外周迁移进入淋巴结<sup>[20]</sup>。有研究分析了引流的肠系膜淋巴结内的局部炎症反应情况,研究发现 PAR1<sup>-/-</sup>、S1P3<sup>-/-</sup>

和 SphK1<sup>-/-</sup>小鼠在肠系膜淋巴结内有 IL-1 $\beta$  水平的增加,在肺内 IL-1 $\beta$  水平反而减少。肺是胸导管下游的第一个毛细血管床,这支持了树突细胞 PAR1-S1P3 信号丧失,在引流淋巴结内可特异性限制炎症反应的观点。因此,给予野生型小鼠 S1P3<sup>-/-</sup>的树突细胞增加了肠系膜淋巴结内的局部炎症,而输注野生型的树突细胞到 S1P3<sup>-/-</sup>小鼠则促进了炎症向肺的扩散。相同的结果出现在 CLP 模型中,应用 PAR1 拮抗剂诱导了引流的肠系膜淋巴结内炎症的局限,并阻止了炎症向肺的扩散。因此,丧失了 PAR1 信号的树突细胞在引流的淋巴结内被限制迁移。树突细胞的出现有两个目的,即促炎和促凝,这提出了一个耦联炎症反应和凝血反应的简单机制。我们了解树突细胞能够调控炎症反应<sup>[21]</sup>,强调了树突细胞可能作为全身性炎症和脓毒症死亡启动者的角色<sup>[22]</sup>。阻断 PAR1 足以中断放大的全身性炎症和凝血反应,促进脓毒症患者的康复。为了对抗炎症,需要阻断淋巴系统内的凝血酶通路,这解释了静脉应用血浆蛋白酶抑制剂如抗凝血酶为什么作用有限<sup>[23]</sup>。

6 问题和展望

通过干预凝血酶-PAR1-S1P 信号通路可以调节 PAR1 在内皮细胞中的作用,使其从内皮屏障的破坏作用转换到内皮屏障的保护作用上来,从而改善毛细血管的通透性,减少液体渗出和肺水肿的发生。再通过 APC 途径发挥抗炎和抗凋亡的作用,从而提高脓毒症患者的存活率。但是该通路的许多作用机制还需要进一步的研究。树突细胞在脓毒症中有促炎和促凝的作用,通过阻断淋巴系统内树突细胞的 PAR1-S1P3 信号通路,把炎症限制于下游淋巴结内来减弱全身性炎症反应,这为我们提供了一个抗炎的新思路。

参考文献

[1] Feistritz C, Wiedermann CJ. Effects of anticoagulant strategies on activation of inflammation and coagulation. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(6): 855-870.  
 [2] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 2003, 9(5): 517-524.  
 [3] Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(Suppl 1): 196-202.

[4] Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, 2002, 296(5574): 1880-1882.  
 [5] Rallabhandi P, Nhu QM, Toshchakov VY, et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction; a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem*, 2008, 283(36): 24314-24325.  
 [6] Feistritz C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*, 2005, 105(8): 3178-3184.  
 [7] Vogel SM, Gao X, Mehta D, et al. Abrogation of thrombin-induced increase in pulmonary microvascular permeability in PAR1 knockout mice. *Physiol Genomics*, 2000, 4(2): 137-145.  
 [8] Gon Y, Wood MR, Kiosses WB, et al. S1P3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by TNF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9270-9275.  
 [9] Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, et al. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(5): 1534-1545.  
 [10] Bae JS, Rezaie AR. Protease activated receptor 1 (PAR1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand. *Thromb Haemost*, 2008, 100(1): 101-109.  
 [11] Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, et al. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1646-1656.  
 [12] Xu M, Waters CL, Hu C, et al. Sphingosine 1-phosphate rapidly increases endothelial barrier function independently of VE-cadherin but requires cell spreading and Rho kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(4):

C1309-1318.

[13] Singleton PA, Dudek SM, Ma SF, et al. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation, novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *J Biol Chem*, 2006, 281 (45): 34381-34393.

[14] Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, et al. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1303-1312.

[15] 武子霞, 李银平, 姚咏明. 活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(3): 182-185.

[16] Stephenson DA, Toltl LJ, Beaudin S, et al. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. *J Immunol*, 2006, 177 (4): 2115-2122.

[17] Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 2007, 109(8): 3161-3172.

[18] Liu D, Cheng T, Guo H, et al. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med*, 2004, 10 (12): 1379-1383.

[19] Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C, et al. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature*, 2008, 452 (7187): 654-658.

[20] Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7 (1): 19-30.

[21] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(7): 523-532.

[22] Ohteki T, Tada H, Ishida K, et al. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med*, 2006, 203 (10): 2329-2338.

[23] Opal SM. The nexus between systemic inflammation and disordered coagulation in sepsis. *J Endotoxin Res*, 2004, 10 (2): 125-129.

(收稿日期: 2008-08-02  
修回日期: 2008-12-05  
本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

白细胞介素-1 受体激酶 M 介导的免疫抑制能增加脓毒症患者的病死率

机体免疫抑制常以循环血中单核细胞释放促炎细胞因子减少为特征,与脓毒症远期病死率相关。在南亚,革兰阴性菌感染导致的类鼻疽病死率高达 40%。体外试验和鼠类实验中发现, Toll 样受体 (TLR) 在免疫抑制信号传导中发挥关键作用。荷兰研究人员采用体外试验研究了类鼻疽患者 TLR 的表达。34 例类鼻疽患者与 32 例健康志愿者参与研究。测定指标包括血浆细胞因子水平和用于 TLR 合成的 mRNA 水平。研究结果显示,类鼻疽患者血中促炎细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (IL-1) 以及趋化细胞因子 IL-8 显著降低, IL-1 受体激酶 M (IRAK-M) 升高, IRAK-1 降低。类鼻疽死亡患者入院时 IRAK-M 水平高于幸存者。研究者认为, IRAK-M 水平升高提示类鼻疽患者预后不良。

白慧颖, 编译自《Crit Care Med》, 2008-12-26 (电子版); 胡森, 审核

脂质球表皮生长因子-8 通过脂多糖-CD14 途径影响脓毒症的预后

脂质球表皮生长因子-8 (MFG-E8) 参与凋亡细胞的清除, 其吞噬作用能够预防死亡细胞可能造成的免疫损伤。以往研究已经证明, 通过应用骨髓细胞来源的 MFG-E8 能增强对凋亡细胞的吞噬作用, 提高脓毒症的生存率。最近, 美国研究人员应用野生型小鼠、Toll 样受体 4 (TLR4) 突变小鼠及 CD14 缺陷小鼠, 采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 和腹腔注射脂多糖制备脓毒症模型。CLP 后 5 h、20 h 分别检测脾细胞 MFG-E8 表达、吞噬细胞活性及凋亡细胞。野生型脓毒症小鼠 MFG-E8、MFG-E8 mRNA 分别下降 33% 和 49%。脂多糖使 MFG-E8 mRNA 表达减少且呈剂量依赖性, 多黏菌素 B 可减弱其影响。TLR4 突变小鼠及 CD14 缺陷小鼠未观察到 MFG-E8 mRNA 表达减少。CLP 可显著降低野生型小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力 (下降 30%), 但对 CD14 缺陷小鼠无影响。CLP 同时诱导野生型小鼠脾脏细胞凋亡 (凋亡率 61%), 但对 CD14 缺陷小鼠影响较小。因此, 美国研究者认为 MFG-E8 可能通过脂多糖-CD14 途径影响对凋亡细胞的吞噬作用。

白慧颖, 编译自《J Immunol》, 2009, 182(1): 581-587, 胡森, 审核

碱性磷酸盐改善严重脓毒症和脓毒性休克患者的肾功能

碱性磷酸盐 (AP) 能够减轻脂多糖引起的炎症反应, 因而, 其可能在感染性休克病理过程中发挥器官保护作用。最近, 荷兰的研究人员通过多中心随机双盲安慰剂对照 I 期临床试验, 研究了 AP 对严重脓毒症和脓毒性休克患者急性肾损伤的保护作用。研究纳入 36 例重症监护病房 (ICU) 患者, 其中男 16 例, 女 20 例, 平均年龄 (58 $\pm$ 3) 岁, 均已证实或怀疑革兰阴性菌感染, 全身炎症反应综合征和器官功能障碍出现时间分别在 24 h 和 12 h 内。入院 10 min 内分别快速静脉推注 AP 和安慰剂 (67.5 U/kg), 之后 23 h 连续静脉滴注 AP 和安慰剂 (132.5 U/kg)。结果显示, AP 治疗后血清肌酐水平由 91 nmol/L (73~138 nmol/L) 降至 70 nmol/L (60~92 nmol/L), 安慰剂组不降低。15 例肾功能损害患者经 AP 治疗后一氧化氮合酶 (NOS) 水平降低 (80 $\pm$ 5)%, 一氧化氮 (NO) 代谢产物含量也显著降低, 近端肾小管损伤标记物谷胱甘肽 S-转移酶 A1 含量较安慰剂组降低 70% (50%~80%)。研究者认为, AP 治疗能降低肾脏 NO 和 NOS 含量, 保护肾小管, 改善严重脓毒症和脓毒性休克患者的肾功能。

白慧颖, 编译自《Crit Care Med》, 2008-12-26 (电子版); 胡森, 审核