

• 综述 •

微粒与脓毒症凝血功能紊乱

殷冬梅(综述)¹, 李银平(审校)²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津市天和医院, 天津 300050)

【关键词】 脓毒症; 微粒; 凝血功能紊乱

中图分类号: R364.5

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.031

脓毒症(sepsis)是感染因素所致的全身炎症反应综合征(SIRS),进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)^[1]。业已证明,脓毒症主要是由炎症反应、凝血活化及纤溶抑制相互作用形成的级联反应过程,其中凝血活化是脓毒症发病的重要环节^[2]。微粒作为循环在外周血中微小的膜结合小囊泡,在血栓形成、炎症和血管应激病变中起着积极的作用。新近研究发现,微粒也参与了脓毒症凝血功能紊乱的发生发展。现就微粒的来源、生物学特性及其与脓毒症凝血功能紊乱的关系进行综述。

1 微粒的简介

微粒是来源于细胞膜的完整小囊泡,大小在 0.2~2.0 μm。微粒主要是在细胞膜活化或凋亡的过程中形成的,且与膜不对称破坏有关,而膜不对称现象是一个静止细胞的特征。微粒的形成和脱落需要细胞结构组织的变形,包括细胞支架和蛋白结构的破裂。微粒的形成依赖于肌动蛋白细胞支架和肌动蛋白-肌球蛋白收缩,这种收缩被天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)诱导的 Rho 激酶 1 和激酶 2 活化调节^[3-5]。DNA 片段从细胞核区域到膜囊泡的再定位需要 Rho 激酶的活化,说明凋亡细胞形成的微粒可能包含细胞核的一些物质^[4,6]。微粒的生物学特征一方面取决于它们的循环数量,但最主要是取决于其蛋白和磷脂的成分。微粒的来源不同,引起它们产生的刺激类型不同,微粒的蛋白和磷脂成分也就不同,这也就决定了其生物学特征的差异。最近研究表明,微

粒在多种病理生理过程中起重要作用。首先,微粒体积小,可在血管内循环流动,能介导局部或远距信号转导,微粒能结合相适合的特异配体,以细胞-微粒-细胞的形式转导信号,而不必遵循细胞-细胞的信号转导途径。其次,微粒还可将其表面分子(包括受体)通过交换胞质或胞膜蛋白的方式转移给其他细胞,使对给定信号起到放大作用。

2 与凝血相关的微粒

与凝血相关的微粒主要有血小板微粒、内皮细胞微粒和单核细胞微粒。

2.1 血小板微粒:血小板微粒具有前凝血活性,是最早被研究的微粒。Chargaff 等^[7]在 1949 年首次提出乏血小板血浆包含一种可沉积的因子,这种因子可以使凝血酶的增殖加速。Wolf^[8]报道在乏血小板血浆里可以通过超速离心获得的一种嗜苏丹的富含磷脂物质,这种物质可以使凝血酶增殖,后来证实这种物质就是血小板微粒。血小板微粒携带有静息状态下血小板膜上的多数成分,也携带活化血小板膜上的标记物(如 CD61 等),它具有很强的促凝活性,也有一定的抗凝活性,在人体血栓形成与止血过程中发挥重要作用。活化因子是凝血酶原激活物复合物的重要组成部分,血小板微粒可提供丰富的凝血酶原激活物结合位点,具有很强的促凝活性。来自血小板 α 颗粒的活化 V 因子,多半结合在血小板微粒膜上,血小板所产生的微粒上存在 VII 因子的结合位点。血小板微粒表面结合了大量的 C5b-9,表达丰富的血小板膜糖蛋白 I b、血小板 α 颗粒膜蛋白、整合蛋白 α IIbβ3(Gp IIb/IIIa)。

2.2 内皮细胞微粒(EMPs);Combes 等^[9]描述了在肿瘤坏死因子-α(TNF-α)刺激下,人脐静脉内皮细胞(HUVECs)产生的微粒为 EMPs。且观察到 EMPs 与血管性血友病因子(vWF)结合的部位有

大量 vWF 复合物,促进了血小板的聚集,增加了血栓的稳定性。随后 Combes 等^[9]于 1999 年首次报道狼疮患者体内检测到 EMPs 水平升高,之后亦证实存在内皮激活或高凝状态的患者 EMPs 水平升高,提示 EMPs 增多可反映内皮损伤。内皮的微粒能够表达 vWF-结合点,表达巨大的 vWF 多聚体,它们能够促进血小板聚集,增加稳定性^[10-11]。

2.3 单核细胞微粒(MPs);Satta 等^[12]在 1994 年描述了起源于单核细胞的循环微粒,他们观察到内毒素(LPS)刺激单核细胞后,可以产生 MPs。来源于单核细胞的微粒表达组织因子(TF)和 P-选择素配体 1(PSGL-1),前者是外源性凝血途径的启动因子,后者通过 CD62P(P-选择素)结合血小板对血管内血栓形成起扩大作用。

3 微粒与凝血

自从血小板微粒首先被鉴定,对微粒在健康者和患者中作用研究的重点一直在凝血系统。微粒包含大量表面暴露的阴性磷脂,这些磷脂对于凝血酶的产生是必需的,因此,它们的先期出现促成了一个前凝血状态;微粒有不同的性质,能促进血栓形成失常的发生。丝氨酸磷脂和 TF 共同暴露在微粒的外膜上,是凝血级联反应启动的中心环节。此外,微粒和因子 Va、VIII 和 IX 相互作用,从而促进凝血酶原激活物复合物形成。因为微粒的这些性质,其在生理性凝血和病理性凝血过程中都扮演重要的角色。

3.1 微粒与生理性凝血:形成微粒的能力是生理性凝血一个基本的部分,在这个通路上的缺陷引起了一个出血的失常,称为 Scott 征(Scott syndrome)。和血小板一样,血小板来源的微粒与止血密切相关。微粒是膜脱落颗粒,富含 PS,微粒表面上的氨基磷脂提供了大量的亲和位点与因子 IX a、VIII、Va、IIa 相结

基金项目:天津市医药卫生中西医结合科研课题(2005088)

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

作者简介:殷冬梅(1982-),女(汉族),湖北省人,硕士研究生。

合^[13-14]。而且,在健康个体中的循环微粒刺激低水平的凝血酶产生,这种水平的凝血酶对正常蛋白 C 的活化是必需的。血小板微粒还能结合内皮下基质并黏附于凝血酶活化的内皮细胞,其内含有的 GPIIb/IIIa 受体可为可溶性纤维蛋白原提供结合位点,致使通过纤维蛋白原的桥梁作用,进一步促使血小板黏附。此外,内皮细胞来源的微粒表达超大的 von Willebrand factor 多聚体(ULvWF),后者能够促进血小板聚集,增加它们的稳定度。有报道 vWF 联合内皮细胞来源的微粒比游离的 vWF 更容易与血小板 vWF 受体结合^[15]。而且,微粒的一些其他性质也提供了附加的前血栓形成的潜能,血小板微粒表面表达 P-选择素(血小板选择蛋白),单核细胞来源的微粒表面表达 TF 和 PSGL-1^[16]。

最近 Del Conde 等^[17]发表的假说认为单核细胞微粒上的 TF 在正常生理性凝血中起关键作用。传统的观点是 TF 不存在于循环中,而只在内皮损伤发生时才对循环血液成分有效。这个观点用来解释在血管中血凝块形成的动力学是不充分的。现在已知在 MPs 富含的脂类脂上,TF 的表达与 CD15(PSLG-1) 紧密相关。这个在微粒上的复合物通过 CD62P 与血小板结合,放大了血管内部的血栓形成现象^[18]。这个研究推测,微粒上富含胆固醇类脂的存在及其所发挥的功能可以部分解释高胆固醇血症和血栓疾病的联系。

3.2 微粒与病理性凝血:除了提供生理的前凝血活性外,微粒可能在某些疾病中扮演重要的前凝血角色,这些疾病包括急性心肌梗死、抗磷脂综合征、惊厥前兆、类风湿关节炎、血栓形成的血小板减少性紫癜、溶血性尿毒症、血管炎、脓毒症、肝素引起的小血小板减少症(HIT)和阵发性的夜间血红蛋白症(PNH)^[10]。Soriano 等^[19]研究显示在静脉血栓栓塞中,内皮、血小板和粒细胞被显著激活,释放各种细胞来源的微粒;其中 EMPs 的释放以及 EMPs 和单核细胞的结合是血栓形成的关键。

4 微粒与脓毒症凝血功能紊乱

4.1 脓毒症中凝血功能紊乱:几乎所有脓毒症患者均有凝血功能异常。内毒素和炎症因子同时可使内皮细胞上的血栓调节蛋白(TM)、硫酸乙酰肝素(HS)的表达明显减少,使血管内皮细胞表面的

抗凝状态变成促凝状态^[2]。内毒素还可损伤血管内皮细胞,暴露胶原,使血小板黏附、活化、聚集,并释放二磷酸腺苷、血栓素 A 等,进一步促进血小板的活化、聚集,促进血栓形成^[20]。此外,脓毒症尤其是存在内毒素血症时,内毒素还可直接激活凝血因子 XI(FXI),启动内源性凝血系统,进而触发凝血的“瀑布效应”,最终导致广泛微血栓形成、出血、低血压、休克,临床表现为多器官功能衰竭和弥散性血管内凝血。

在凝血过程激活的同时,体内抗凝系统受到抑制,丝氨酸蛋白酶抑制物含量下降,蛋白 C 系统的含量也会下降。

组织因子途径抑制物(TFPI)是体内最重要的外源性凝血途径抑制物,脓毒症时体内 TFPI 水平轻度降低。TFPI 可降低白细胞介素-6(IL-6)水平,从而降低脓毒症的死亡率^[21]。故有学者认为,提高脓毒症存活率的机制与抑制 TF/VIa 或 Xa 有关。而微粒决定了 TF 的活性,并与 TF-FVIa 复合物的生成密切相关。

4.2 微粒在脓毒症凝血功能紊乱中的作用

4.2.1 微粒在脓毒症中的表达:体外实验显示,单核细胞暴露在细菌的 LPS 后可产生单核细胞微粒,导致单核细胞微粒表达 TF^[22-25]。同样在脓毒症,体内循环的单核细胞微粒表达 TF,而且可能促进与脓毒症相关的前凝血状态;Nieuwland 等^[24]证明,在体外来自于脑膜炎球菌患者的微粒引起凝血酶增殖,如果样本用抗 TF 或因因子 VI 的单克隆抗体培养,则增殖现象被阻断。在内毒素血症患者中,已经观察到微粒中的 TF 含量高于正常人的 8 倍^[26]。在流行性脑膜炎患者中,发现来自于血小板和单核细胞的微粒与 TF 的促凝活性有关^[24]。来源于血小板的微粒可促进血栓形成。LPS 刺激后,单核细胞来源的微粒已经显示出能表达 TF,单核细胞微粒上表达的 TF 可通过 P-选择素依赖途径被血小板加强,而 TNF- α 刺激 HUVECs 产生的微粒在体外诱导凝血反应时是通过 TF-FVIa 依赖的途径完成的^[26]。

另一个值得考虑的机制是在 EMPs 和单核细胞微粒表面包含有活化蛋白 C (APC)通路。据报道,APC 能促进内皮细胞和单核细胞微粒的脱落,通过蛋白酶激活受体-1 和内皮细胞蛋白 C 受体

依赖机制。这种微粒表达功能性的内皮蛋白 C 受体,保护其不被金属蛋白酶分裂,并通过活化因子 V 显示其抗凝活性,使循环微粒表面的血源性 TF 失活^[27]。

4.2.2 微粒与 TF 活性:以往认为生理情况下直接与循环血液接触的血细胞和内皮细胞不表达 TF,只有当血管损伤暴露组织细胞或是血管内皮细胞、单核细胞受到内毒素等刺激时,表达的 TF 才得以与血液接触。但近年来很多研究表明血中也存在 TF。健康人血浆中有较低浓度的 TF,呈加密无活性状态,它只结合 FVIa 和 TF 抗体,而且血浆中也含有 TFPI,故不能启动凝血反应。由于 TF 是一种跨膜蛋白,故其在血中以微粒或表达在细胞膜上的形式存在。在健康个体中已经发现,血源性的 TF 不是与细胞相关的,而是明显与微粒相关的。

有资料报道,用细胞分类法把血小板来源的微粒从血浆中分离出来,TF 分子全长都能在微粒内检测到;免疫显微镜下可观察到,在静止的血小板中 TF 贮藏在膜上和基质的 α -颗粒内及开放管道系统;在用胶原或凝血酶激活的血小板膜上也可看到 TF 表达,即当血小板被强激动剂激活后,原先合成并贮藏在血小板中的 TF 暴露在细胞表面,或以颗粒的形式分泌出去。

TF 从白细胞微粒传递到血小板是血栓形成的关键现象^[28]。血小板微粒、红细胞微粒和血细胞微粒在体内参与 TF-依赖血栓的传播^[29-30]。在血液循环中的 EMPs 具有黏附循环细胞的能力,能够放大单核细胞的前凝血活性,从而激发了前血栓形成的潜能;EMPs 能够诱导 TF 表达及单核细胞的前凝血活性^[31]。在体内,通过 MP-暴露的 PSGL-1 和血小板 P-选择蛋白的相互作用,微粒能够被与血栓形成相关的小血小板捕获。这就导致了 TF 浓度的增加,而 TF 能启动和加速血液凝固与纤维蛋白形成^[32]。微粒携带 TF 可以在逐渐形成的血栓表面激活凝血因子,而不需扩散^[31],即血小板表面本身能够形成一个纤维蛋白生成体系,使纤维蛋白不断生成,这样就可以稳定和巩固新形成的血栓^[32]。

综上所述,在脓毒症时,外源性凝血系统被激活以及纤溶抑制和抗凝物质减少,造成凝血-抗凝-纤溶异常,使机体处于一种促凝状态。微粒在促使病程发展的进程中起着重要作用。可能是通过表

达 TF 及 TF-FVIa 依赖途径来实现的;此外,EMPs 和单核细胞微粒表面包含有 APC 通路,通过蛋白酶激活受体-1 和内皮细胞蛋白 C 受体依赖机制影响了凝血功能。循环微粒对脓毒症凝血功能的影响还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 姚咏明, 戚志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(6): 321-324.
- [2] 武子霞, 李银平, 姚永明. 活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(3): 182-185.
- [3] Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK 1 induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(4): 346-352.
- [4] Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK 1 [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(4): 339-345.
- [5] Sapat C, Simoncini S, Llorca B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-1 activation by caspase-2 [J]. Blood, 2006, 108(6): 1868-1876.
- [6] Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al. Circulating nucleosomes in serum[J]. Ann NY Acad Sci, 2001, 945: 93-102.
- [7] Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastin protein of blood[J]. J Biol Chem, 1946, 166: 189-197.
- [8] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma[J]. Br J Haematol, 1967, 13(3): 269-288.
- [9] Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant[J]. J Clin Invest, 1999, 104(1): 93-102.
- [10] Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction [J]. Front Biosci, 2004, 9: 1118-1135.
- [11] Jy W, Jimenez JJ, Cheng PY, et al. Endothelial microparticles (EMP) bind and complex with unusually-large multimers of von Willebrand factor (ULvWf) and act as potent inducers of platelet adhesion and aggregation[J]. Blood, 2004, 104: 997A-998A.
- [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]. J Immunol, 1994, 153(7): 3245-3255.
- [13] Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 30(2): 111-142.
- [14] Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation [J]. Thromb Haemost, 2001, 85(4): 639-646.
- [15] 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]. J Thromb Haemost, 2005, 3(6): 1301-1308.
- [16] Celi A, Lorenzet R, Furie BC, et al. Microparticles and a P-selectin mediated pathway of blood coagulation [J]. Dis Markers, 2004, 20(6): 347-352.
- [17] 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 [J]. Blood, 2006, 106(5): 1604-1611.
- [18] Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor [J]. Blood, 2000, 96(1): 170-175.
- [19] Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis [J]. Crit Care Med, 2005, 33(11): 2540-2546.
- [20] 郑贵军, 武子霞, 李银平, 等. 脓毒症大鼠血小板膜糖蛋白的表达变化及血必净的干预作用[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(12): 758-760.
- [21] 郑贵军, 李银平. 组织因子和组织因子途径抑制物与脓毒症[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(2): 126-127.
- [22] 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]. J Immunol, 1994, 153(7): 3245-355.
- [23] Barry OP, Praticò D, Savani RC, et al. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles [J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 136-144.
- [24] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis [J]. Blood, 2000, 95(3): 930-935.
- [25] Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(5): 2311-2315.
- [26] Aras O, Shet A, Bach RR, et al. Induction of microparticle and cell associated intravascular tissue factor in human endotoxemia [J]. Blood, 2004, 103(12): 4545-4553.
- [27] Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor [J]. Blood, 2005, 105(4): 1515-1522.
- [28] Biró E, Sturk-Maquin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(12): 2561-2568.
- [29] Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, et al. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation [J]. Blood, 2004, 104(10): 3190-3197.
- [30] Sabatier F, Roux V, Anfosso F, et al. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity [J]. Blood, 2002, 99(11): 3962-3970.
- [31] Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(4): 171-178.
- [32] 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 [J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1020-1025.

(收稿日期: 2009-04-16)

(本文编辑: 保健媛)