

凝血酶与血管平滑肌细胞增殖研究进展

王启贤 综述

吕俊升 审校

(浙江医科大学附属第二医院心血管病研究室, 杭州 310009)

摘要 凝血酶是血管平滑肌细胞表达的选择性增殖促进剂,其作用通过血管平滑肌细胞表达的选择性受体所介导。凝血酶受体的激活导致细胞内信号传递和内源性血小板源生长因子 A 链和碱性纤维母细胞生长因子的产生。凝血酶抑制剂可阻断凝血酶受体的激活、细胞内信号传递和凝血酶诱导的血小板源生长因子 A 链和碱性纤维母细胞生长因子表达。凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖可被抗血小板源生长因子和碱性纤维母细胞生长因子抗体所阻断,因而认为凝血酶对血管平滑肌细胞的增殖作用可能是通过诱导血小板源生长因子 A 链和碱性纤维母细胞生长因子自分泌和(或)旁分泌来实现的。

关键词 凝血酶, 受体; 血管平滑肌细胞; 增殖; 凝血酶抑制剂

动脉粥样硬化病灶和冠状动脉腔内成形术后再狭窄均是以血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖为主要病理特征之一。参与 VSMC 增殖的因素很多,但研究表明凝血酶在这个过程中起着重要的作用。本文就以下几方面简述凝血酶与 VSMC 增殖的研究进展。

1 凝血酶的细胞效应

具有酶活性的凝血酶(a-凝血酶)的主要作用是促血凝,近年来研究表明其还有许多其它细胞效应。①凝血酶激活血小板,使其粘附、聚集和释放 5-羟色胺、血栓素 A₂、血小板因子 4、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和许多促凝血物质(纤维蛋白原、因子 V 和磷脂膜)。②凝血酶刺激血管内皮细胞产生血小板活化因子、前列环素、内皮素、纤溶酶原激活抑制物剂和 PDGF。③凝血酶对单核细胞有趋化作用,诱导巨噬细胞产生白细胞介素-1^[1],对淋巴细胞有促进分裂作用。④凝血酶诱导血管平滑肌细胞表达血小板源生长因子 A 链(PDGF-A 链)和碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)^[3-5]。

2 细胞表面凝血酶受体及其激活

2.1 细胞表面凝血酶受体

Vu 等^[5]从巨核样 Dami 细胞获得的 cDNA 通过微注射方法在非洲蟾蜍卵母细胞克隆和表达了对凝血酶起作用的人细胞表面凝血酶受体。推导出的 425 个氨基酸序列在反复的疏水区域,由此揭示属于七个跨膜受体家族的一个新成员。血小板、巨噬细胞、动脉内皮细胞和 VSMC 都能表达凝血酶受体^[6-7];此外,纤维母细胞、心肌细胞、肾小球膜细胞、人肾小球表皮细胞、人外周血单核细胞、C6 胶质瘤细胞、外周自然杀伤(NK)细胞、T 细胞(而非 B 细胞)、T 原始淋巴细胞样细胞、成骨样细胞、神经元成神经细胞瘤 NM2a 细胞、NIE-115 和 NG108-15 细胞、U937 细胞(一种单核细胞株)、星形胶质细胞、PC-3 人前列腺癌细胞也能表达凝血酶受体^[8]。在人动脉组织中通过免疫组织化学和原位杂交发现只有内皮细胞从蛋白水平和 mRNA 水平显示阳性信号;在动脉粥样硬化病灶中,内皮细胞、内膜 SMC 和巨噬细胞从受体蛋白及 mRNA 显示阳性信号^[7]。球囊损伤动脉内膜后 6 h,凝血酶受体 mRNA 即在中层平滑肌细胞显著表达,且在整个新生内膜形成和心血管疾病发展过程中,凝血酶受体 mRNA 表达均明显增加^[9]。上述研究提示,动脉粥样硬化病灶及冠状动脉腔内成形术后局部凝血酶产生增加。中层平滑肌细胞表面凝血酶受体表达增加,促进了动脉粥样硬化病变的发展及冠状动脉腔内成形术后狭窄的形成。Zhong 等^[10]克隆了大鼠凝血酶受体,并发现该受体在体外培养的大鼠 VSMC 存在生长刺激因素(如 bFGF)时表达,而生长停滞时不表达。bFGF 和凝血酶对 VSMC 增殖有协同作用^[11]。抗 bFGF 抗体使 VSMC 对凝血酶刺激缺乏易感性。因而,目前尚不能排除凝血酶通过凝血酶受体所诱导的象纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)有丝分裂排斥的促生长效应。

2.2 凝血酶受体的激活

凝血酶切断精氨酸 C-末端残基。凝血酶受体的 LDPRS 序列与蛋白激酶 C 相类似(LDPRI)的 R 残基

被切断。在非洲蟾卵母细胞中通过凝血酶受体 cDNA 的直接位置突变,丙氨酸取代精氨酸 R⁴¹产生了一个受体(R⁴¹A),该受体不能应答凝血酶的细胞内钙动员^[5]。对其它两个细胞外精氨酸(R⁴⁶和 R⁴⁷)的相应替代并未影响受体功能。在另一个突变体中(S⁴²P),丝氨酸残基 42 被脯氨酸取代,产生了一个抵抗凝血酶的精氨酸-脯氨酸键,该突变体抵抗凝血酶的激活作用,并显示了凝血酶的蛋白剪切位点在精氨酸残基 41,该位点参与了凝血酶受体的激活,这种激活作用在受体产生了不可逆的变化。

3 细胞内信号传递通路

凝血酶受体激活诱导一系列细胞内事件。在培养的融合状态的大鼠主动脉平滑肌细胞,α-凝血酶诱导依赖于 K⁺-Na⁺ 交换体的快速酸化和随后的缓慢碱化^[12,13]。在数秒钟内,α-凝血酶也激活了磷脂酶 C 和诱导磷酸肌醇水解成 3-磷酸肌醇和 α-磷酸肌醇,随后产生前列环素。通过 G 蛋白偶联激酶的凝血酶受体磷酸化可能是一个起始事件^[14]。凝血酶受体磷酸化数目取决于 α-凝血酶浓度和受激活受体上磷脂酶 C 活性^[15]。bFGF 和 PDGF 激活有丝分裂原激活蛋白酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[16~18]。凝血酶诱导两次 MAPK 突发激活,只有后一次被百日咳毒素所阻断,提示了一种蛋白偶联的受体机制^[16~18]。这种突发激活对细胞增殖是必不可少的。在人 VSMC 及仓鼠纤维母细胞 α-凝血酶以剂量依赖性抑制毛喉素(forskolin)诱导的腺苷酸环化酶活性,随后降低细胞内 cAMP,α-凝血酶的这种作用可被百日咳毒素抵消,提示凝血酶对腺苷酸环化酶的抑制是通过 G 蛋白介导^[19]。

4 对生长因子和原癌基因表达的调节

在培养的人 VSMC 中,凝血酶可刺激其转录 PDGF-A 链表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)^[3]。Okazaki 等^[20]用 Northern 印迹杂交显示 α-凝血酶诱导体外培养的 VSMC 表达 PDGF-A 链而非 B 链。同时发现 PDGF-α 受体 mRNA 受抑制。α-凝血酶的这种作用在 6 h 后最大,且可被苯丙氨酰精氨酸氯甲基酮(phenylalanyl-prolyl-arginine chloromethyl ketone, PPACK)抑制。PDGF-受体 mRNA 抑制主要是凝血酶的最初结果,可以推测这与体外应用 PDGF 刺激后受体下调有关。因而这些发现仅仅表明 α-受体确系内源性 PDGF-A 链二聚体所刺激,这与体内观察一致,球囊损伤猪动脉后 6 小时,从动脉组织中提取总 RNA,

PDGF-A 链转录增加^[20]。然而损伤的同时应用 PPACK,PDGF-A 链增加显著下降。

在大鼠和人的 VSMC 中,α-凝血酶诱导浓度依赖性的 *c-fos* mRNA 在 30 min 内明显增加,60 min 后达高峰,6 h 内消失^[12,19]。这种增加取决于 K⁺-Na⁺ 交换的碱化,因为起交换阻断作用的氨氯吡米(amiloride)衍生物 DMA 抑制了这种增加^[12]。此外,细胞内 Ca²⁺螯生物鸡纳皮 α-AM/EGTA 阻止了 *c-fos* 上调。在培养的人 VSMC 中,α-凝血酶诱导短暂性 *c-fos* 和 *c-myc* 表达^[19],前者峰值在 15 min 后,后者在 8 h 左右。用 PDGF 刺激诱导的两个原癌基因短暂表达在数秒钟内。

以上资料提示 α-凝血酶可能使 PDGF 表达,后者通过诱导两个原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达,刺激细胞增殖。与此相符合的观察在培养的大鼠和人 VSMC,应用 PDGF 刺激后 DNA 合成峰值在 PDGF 刺激高峰值后 10~20 h^[2,19]。因而,α-凝血酶可能是通过诱导 PDGF,继而是 *c-myc* 表达而促细胞增殖。Wilson 等^[21]发现在体外培养的大鼠 VSMC 存在 α-凝血酶的情况下遭受到周期性的机械拉紧,合成更多的 DNA,PDGF 转录产物增加。这种 DNA 合成可被抗 PDGF 抗体抑制。

凝血酶和 PDGF 刺激细胞内信号事件除上述讨论的类似外还有很多差异(附表)。刺激凝血酶受体对蛋白激酶 C 无效,但降低苷酸环化酶,使 cAMP 和前列腺素 I₂ 产生降低^[6]。与此相反。刺激 PDGF 受体腺苷酸环化酶或蛋白激酶 C 增加。在 PDGF 受体内通过酪氨酸磷酸化,激活相关激酶是 PDGF 有丝分裂刺激的前提^[22,23]。如前所述,PDGF 快速诱导原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达,随后是 DNA 合成。与此相比较,凝血酶 i 仅仅快速诱导 *c-fos*,凝血酶诱导的 *c-myc* 和 DNA 合成是在其刺激后较长一段时间,内源性 PDGF-A 链产物增加稍后一段时间。

附表. α-凝血酶、PDGF 和 FGF 刺激后细胞内信号事件。

	pH	磷脂酶 C	细胞内 Ca ²⁺ 浓度	cAMP	蛋白激酶 C
α-凝血酶	↓	↑	↑	↓	—
PDGF	↓	↑	↑	↑	—
FGF	?	—	↑	—	↑

↑ 提示增加, ↓ 提示减少, — 无变化。

关于 FGF 刺激后细胞内事件较 PDGF 或 α-凝血酶刺激后细胞内事件知之甚少(见表)。然而,FGF 似乎是

部分通过不同的信号通路而发挥作用。FGF 增加蛋白激酶活性,而非 cAMP 产生增加细胞浆内钙依赖 *c-fos* 和 *c-myc* 表达和肾小球膜平滑肌细胞、牛主动脉内皮细胞增殖。bFGF 激活磷脂酶 D 而非诱导磷酸肌醇降解。

α -凝血酶使大鼠血管内皮细胞和皮肤纤维母细胞上调 bFGF^[24,25]。Weiss 等^[4,11]在体外培养的大鼠 VSMC 中发现 α -凝血酶和 bFGF 有协同作用,他们还发现细胞内 bFGF 快速增加和抗 bFGF 抗体可抑制 α -凝血酶的有丝分裂应答。因而可以认为 α -凝血酶诱导内源性 FGF 和 PDGF 表达,后二者直接刺激细胞增殖。

5 凝血酶与动脉粥样硬化

前面已提到在动脉粥样硬化病灶中,内皮细胞、内膜 VSMC 和巨噬细胞的凝血酶受体表达明显增加。在球囊导管损伤的动脉壁中平滑肌细胞的凝血酶受体表达明显上调,且动脉壁损伤后两周,血管平滑肌细胞仍富含凝血酶受体 mRNA^[8]。因而认为在动脉粥样硬化病灶及动脉壁球囊损伤(包括冠状动脉腔内成形术)后,损伤血管局部凝血酶增加,血管内皮细胞、血小板、和血管平滑肌细胞凝血酶受体表达增加,从而诱导一系列细胞内事件,促使血管平滑肌细胞增殖和迁移,促进了动脉粥样硬化病灶及动脉壁球囊导管损伤后再狭窄的形成。

凝血酶可能通过多个环节参与动脉粥样硬化及冠状动脉腔内成形术后再狭窄的形成。凝血酶与血管内皮细胞表面凝血酶受体结合,刺激其产生血小板活化因子、纤溶酶原激活物抑制剂和 PDGF。血小板活化因子是一种较强的促血小板聚集物。纤溶酶原激活物抑制剂使血管局部纤溶活力减弱。PDGF 对血管平滑肌细胞增殖和迁移作用较强。凝血酶对血管内皮细胞有直接损伤作用,损伤的内皮细胞通透性增加,血浆低密度脂蛋白及纤维蛋白质渗入内膜,纤维蛋白原经病灶内凝血酶作用转变为纤维蛋白,纤维蛋白原和纤维蛋白可诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移^[26~28],参与动脉粥样硬化病灶的形成。凝血酶激活血小板表面凝血酶受体使血小板 α -颗粒释放 PDGF 等生长因子而诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移。凝血酶激活巨噬细胞表面凝血酶受体,使其产生白细胞介素-1^[1],白细胞介素-1可诱导血管平滑肌细胞增殖,使内皮细胞表达白细胞粘附分子、von willebrand 因子和纤溶酶原激活物抑制剂。凝血酶激活血管平滑肌细胞表面的凝血酶受体,使其产生 PDGF-A 链和 bFGF^[3,4,20],后二者促使血管平

滑肌细胞增殖。

6 凝血酶抑制剂和细胞增殖

凝血酶抑制剂不仅阻断了纤维蛋白的形成,而且阻断了受体介导的细胞应答。在体外,自然存在的凝血酶抑制剂抗凝血酶原 III 抑制了凝血酶存在时的人血管平滑肌细胞增殖^[29]。PPACK 除了使凝血酶外结合部位游离外,还阻滞了其催化部位,PPACK 抑制了体外培养的人血管平滑肌细胞 DBA 合成和狒狒球囊损伤后 PDGF 表达^[19,20]。水蛭素和水蛭素原结合凝血酶受体阴离子外位,使催化部位游离,水解一些分子底物,阻滞细胞应答。水蛭素具有显著抗实验性家兔动脉粥样硬化形成效果及防止家兔腹主动脉球囊成形术后再狭窄^[30,31]。目前研究较多的凝血酶受体阻滞剂水蛭素抗动脉粥样硬化,为临床治疗动脉粥样硬化、冠心病、冠状动脉腔内成形术后再狭窄、脑血管梗塞和高血压等心脑血管疾病提供了实验依据。

参考文献

- 1 Jones A, Geczy CL. Thrombin and factor X_a enhanced the production of interleukin-1. *Immunology*, 1990, **71**: 236~241.
- 2 Mcnamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 94~98.
- 3 Nakano T, Raines EW, Abraham JA, et al. Glucocorticoid inhibits thrombin induced expression of platelet-derived growth factor A-chain and heparinbinding epidermal growth factor in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 22 941~947.
- 4 Weiss RH, Maduri M. The mitogenic effector of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 5 724~727.
- 5 Vu TK, Huang DT, Wheaton VI, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, **64**: 1 057~068.
- 6 Vouret-Craviari V, Van E, Rasmussen CB, et al. Synthetic α -thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Biol Cell*, 1992, **3**: 95~102.
- 7 Nelkeu NA, Sifer SJ, O'keefe J, et al. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 614~621.

- 8 Seiler SM. Thrombin receptor antagonists. *Semin Thromb Hemost*, 1996, **22**(3): 223~232.
- 9 Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, et al. Characterization of thrombin receptor expression during. *Circ Res*, 1994, **75**(6): 1 029~038.
- 10 Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA, et al. Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor; evidence for in vitro regulation by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 16 975~979.
- 11 Weiss RH, Nuccitelli R. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but intracellular free calcium release in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 5 608~613.
- 12 Berk BC, Taubman MB, Griendling KK, et al. Thrombin-stimulated events in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem J*, 1991, **274**: 799~805.
- 13 Van Obberghen-schilling E, Pouyssegur J. α -Thrombin receptor and growth signaling. *Semin Thromb Hemost*, 1993, **19**: 378~385.
- 14 Ishii K, Hein L, Kobilka B, et al. Kinetics of receptor cleavage on intact cells: relation to signaling. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 9 780~786.
- 15 Ishii K, Chen J, Ishii M, et al. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem*, 1993, **269**: 1 125~130.
- 16 Kahan C, Seuwen K, Melosche S, et al. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 13 369~375.
- 17 Meloche S, Pages G, Pouyssegur J, et al. Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol Biol Cell*, 1992, **3**: 63~71.
- 18 Meloche S, Seuwen K, Pages G, et al. Biphasic and synergistic activation of p44 mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol*, 1992, **6**: 845~854.
- 19 Kanthou C, Parry G, Wijelath E, et al. Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1992, **314**: 143~148.
- 20 Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, et al. Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by α -thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1992, **71**: 1 285~293.
- 21 Wilson E, Mai Q, Sudhir K, et al. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol*, 1993, **123**: 741~747.
- 22 Kashishian A, Kazlauskas A, Cooper JA. Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PB kinase in vivo. *EMBO J*, 1992, **11**: 1 373~382.
- 23 Heidaran MA, Beeler JF, Yu JC, et al. Differences in substrate specificities of α and β platelet-derived growth factor (PDGF) receptor. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 9 287~295.
- 24 Weich HA, Iberg N, Klagsbrun M, et al. Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in capillary endothelial cells. *J Cell Biochem*, 1991, **47**: 158~164.
- 25 Lowe WL, Yorch MA, Teasdale RM. Ligands that activate protein kinase-C differ in their ability to regulate basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 1993, **132**: 1 593~602.
- 26 Smith EB, Keen GA, Grant A, et al. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 263~275.
- 27 Shekhonin DV, Tararak EM, Samokin GP, et al. Visualization of apo B, fibrinogen/fibrin and fibronectin in the intima of normal human aorta and large arteries and during atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1990, **82**: 213~226.
- 28 Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, et al. Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Atherosclerosis*, 1990, **83**: 9~12.
- 29 Hedin V, Frebelius S, Sanchez J, et al. Antithrombin III inhibits thrombin-induced proliferation in human arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 254~260.
- 30 范亚明, 张颖, 王绿亚, 等. 水蛭和水蛭素对实验性动脉粥样硬化的影响及其机理研究. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**(2): 157~158.
- 31 Sarembock IJ, Gertz SD, Gimple LW, et al. Effectiveness of recombinant desulphatohirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation*, 1991, **84**: 232~234.

(1997-01-28 收到, 1997-06-06 修回)