

微球在非创伤性股骨头坏死血管内凝血中的作用

张彦^{1△} 刘述川^{1△△} 周晋¹

[关键词] 微球;非创伤性股骨头坏死;血管内凝血

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2014.01.025

[中图分类号] R554 [文献标志码] A

Role of microparticles in the intravascular coagulation
of nontraumatic femoral head necrosis

Summary The final common pathway in nontraumatic femoral head necrosis is related to intravascular coagulation and microcirculatory thrombosis, which are considered as one of the pathogenesis in nontraumatic necrosis of the femoral head by researchers in the world. Although osteonecrosis may affect all joints of the organism, the femoral head is the most commonly affected. Endothelial cell damage could be followed by abnormal blood coagulation and thrombus formation with any resulting degeneration distal to the site of vascular occlusion. Microparticles (MPs), the subcellular units coated by phospholipid membranes, are released by several cell lines upon activation or apoptosis. MPs could supply a potent procoagulant surface for prothrombinase and tenase formation. Thus MPs actually act as an important factor for the pathogenesis of intravascular coagulation during nontraumatic femoral head necrosis. In addition, MPs can also transfer cytokines, receptors, RNA and DNA to regulate target cells. The study in the pathogenic role of MPs and the blockage of MPs release or their signal transduction may lead to a novel approach to the treatment of nontraumatic femoral head necrosis.

Key words microparticles; nontraumatic femoral head necrosis; intravascular coagulation

微球是一种磷脂膜包被的亚单位细胞,不仅可以作为非创伤性股骨头坏死血管内凝血发病机制中的一个重要因素,还能转移细胞因子、受体、RNA 和 DNA 来调控靶向细胞。未来进一步研究微球的致病作用以及阻断微球释放或信号传导功能,可能有望找到治疗非创伤性股骨头坏死的新途径。

1 微球的概述

1.1 微球的定义

微球是不同类型细胞凋亡或活化时从细胞膜表面脱落释放的小囊泡^[1]。微球普遍小于 1 μm , 暴露带负电荷的磷脂酰丝氨酸(PS)于细胞膜外层,传递母细胞来源的表面膜抗原^[2]。而血管内凝血和微循环的血栓形成是非创伤性股骨头坏死(ONFH)的各种病因的最终共同通路^[3]。在许多股骨头坏死患者标本中观察到微循环血栓证实了这一点。目前有报道显示不同来源的循环微球数量增加与 ONFH 微血栓形成有关^[4]。然而,微球是否直接促使该病发生,或仅仅是该疾病的现象,仍然难以确定,有待进一步研究。

1.2 微球的来源

凋亡也能诱导凋亡小体产生。凋亡小体是细胞碎片,直径和体积比微球大很多。与在凋亡终末期释放的微球相反,凋亡小体在程序性细胞死亡早

期就被释放^[5]。凋亡小体也暴露 PS 于外膜,但促凝活性低。这些凋亡小体暴露 PS 的作用是为了募集吞噬细胞到凋亡发生的死亡部位^[6]。

细胞活化后其他类型的小囊泡释放,其中具有微球功能的称为外来体。与细胞膜碎片的微球不同,外来体是由一些细胞系的内吞溶酶体系统产生的小囊泡。外来体与微球的大小(常 $<1 \mu\text{m}$)、表面抗原和凝血功能都不同。

核外粒体是用来表示细胞膜微球特征的另一种称呼。大多数由单核细胞、中性白细胞和血小板释放的微球符合核外粒体的定义。有证据显示微球和核外粒体间的结构功能相似^[7]。

1.3 微球的释放机制

凝血酶、钙离子载体 A23187 和高切应力等刺激因素能够激活血细胞和其他类型细胞,如血管平滑肌细胞释放微球^[1]。

通常,微球脱落开始于加入激动剂之后的几分钟内,可能由一种钙依赖的细胞溶质蛋白水解酶卡配因 μ , 分开踝蛋白和 α 肌动蛋白引起。应用钙蛋白酶抑制剂或钙螯合剂抑制卡配因来阻止微球释放。细胞质内的钙也可能活化激酶类和抑制磷酸酶类,与卡配因活化共同维持细胞骨架。细胞膜骨架破坏是某些机制的结果,如在凋亡过程中,肌球蛋白轻链激酶(MLCK)介导肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化,随后激活 Rho 相关激酶 I (ROCK-I)。MLC 的磷酸化刺激肌球蛋白收缩活性,激活肌球蛋白 ATP 酶产生肌动蛋白和肌球蛋白丝之间的移

¹ 哈尔滨医科大学附属第一医院血液科(哈尔滨,150001)

[△] 现在地址为:牡丹江医学院附属红旗医院血液科(黑龙江牡丹江,157011)

^{△△} 审校者

通信作者:周晋, E-mail: jinzhouh85@163.com

动,使骨架从细胞膜中分离,形成脱落小泡随后释放微球。然而,细胞膜和细胞骨架间使微球形成的具体作用,仍不清楚。最近研究显示凝血酶活化内皮细胞释放的微球与 ROCK-II 有关^[8]。微球形成的另一个重要特征是在细胞活化后细胞膜磷脂不对称性丧失。通常,PS 和磷脂酰乙醇定位于细胞膜内表面,而磷脂酰胆碱和鞘磷脂集中在细胞膜外表面。这样的分布被 3 种酶控制:一种是内翻酶,一种是外翻酶,以及一种横叉在双分子层的脂类爬行酶,可加速不确定的双向再分布。细胞胞质膜也表现了脂质微小区域,称为筏,对蛋白质横向流动性和募集信号分子起作用^[9]。然而,筏和细胞骨架间作用的确切机制并不清楚。

2 微球的作用

2.1 微球与凝血

2.1.1 微球的促凝活性 微球影响凝血功能的途径有很多,但主要依靠 PS 和组织因子(TF)。表达 PS 外翻的微球促凝血活性不局限于血小板源性微球(PMPs)。单核细胞,内皮细胞及其他类型细胞源性微球表面也存在 PS。PMPs 的主要功能与促凝活性相关。PMPs 富含凝血因子 Va、Ⅷ、和血小板/内皮结合膜受体如 P-选择素等。另外,PMPs 能提高胞内黏附分子-1 水平,刺激细胞因子分泌并增加内皮细胞表达 TF。因此 PMPs 能促进应用激素或嗜酒的患者血栓形成、血管闭塞、血液高凝及血小板聚集^[10]。而在一些情况下,内皮细胞源性微球(EMPs)被认为是血管损伤的一种标志。有报道大多数 ONFH 患者体内 PMPs 及 EMPs 数量增加,因此扩大了用于合成凝血酶原复合物的催化表面,进而更有效地生成凝血酶。而凝血酶能够活化血小板,使其释放 PMPs,导致凝血酶进一步生成。这种正反馈回路可以解释为什么 ONFH 患者血液长期处于高凝状态^[4]。

TF 是凝血系统的启动因子。在受刺激的单核细胞表面表达可提取的 TF 活性仅 10%~20%。微球能结合活化的血小板,促进血小板结合单核细胞,使微球具有活化的 TF 活性。在血栓中,TF 主要定位于细胞膜小囊泡的表面,常聚集在血小板周围。这表明凝血的启动机制包括蓄积于血小板血栓中含 TF 的微球。

2.1.2 微球的抗凝活性 在一定条件下,微球也能表现抗凝性质。有研究认为一些 PMPs 可通过加速活化蛋白 C 的 FVa 钝化抑制凝血。微球表面存在抑制凝血的蛋白如组织因子通路抑制物(TFPI)、蛋白 C 或血栓调节蛋白,可解释微球参与抗凝血通路的问题。当 EMPs 暴露 TF 时,TF 活性可明显被微球相关的 TFPI 抑制,很可能微球表面 TF 和 TFPI 间的平衡在启动凝血方面是一个重要特征^[11]。

2.2 微球与血管损伤及新生

PMPs 能表达凝血酶敏感蛋白,调节 vWF 活性,并调控补体系统以促进血管新生^[9]。包含 CD40-C40L 系统的 PMPs 能通过诱导血管内皮生长因子和 TF 刺激凝血和血管新生。研究显示刺激内皮细胞释放含有基质金属蛋白酶的微球可早于血管形成修复组织。吴志宏等^[12]体外研究发现,应用激素诱导内皮细胞产生的微球与内皮细胞共培养,能促进血管内皮细胞凋亡,当 EMPs 达到一定水平,高于一定阈值,可以使微血管通透性增加,水肿形成,继而局部血小板聚集、纤维素沉着、血栓形成,可见于 ONFH。低于该阈值时 EMPs 被吞噬,启动自身修复作用^[13]。

2.3 微球与炎症

微球可能诱导促炎症介质释放,包括白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、CC-趋化因子-2 和肿瘤坏死因子。微球通过传递和释放炎症介质,向远距离传递信号。目前已研究了细胞源性微球和 C 反应蛋白(CRP)之间的关系^[2]。已知这种急性期蛋白结合于细胞膜上,经结合细胞膜的方式激活补体系统的经典途径,导致血管损伤。炎症和血管损伤都与 ONFH 发病机制有关。有报道称 ONFH 患者体内 CRP 水平增高,与微球数量增加呈正相关,但该研究并未确定细胞微球和 CRP 间的因果关系^[4]。

2.4 微球与细胞自我保护

细胞释放微球可能通过清除不需要的信号分子如凋亡前体半胱天冬酶-3,从而逆转凋亡;也可以快速清除表面的危险信号如 PS,逃避吞噬。翁习生等^[14]研究发现激素性股骨头坏死患者,体内来源于吞噬细胞和血小板的微球较正常水平明显减少,可能导致吞噬功能下降;同时含凝血调节蛋白 CD45⁺的微球也减少,可能使蛋白 C 抗凝活性及内皮机制保护功能下降,从而使股骨头血管内易形成血栓且不易完全溶解,最终导致骨细胞不可逆坏死。生理水平的微球诱导巨噬细胞产生转移生长因子 β 1,控制初始炎症反应,保护细胞免受炎症损害^[15]。

3 有望成为靶向微球的抗凝药物

膜联蛋白(Annexin)是一类广泛分布于真核细胞细胞质内钙离子依赖的磷脂结合蛋白。在细胞凋亡早期,AnnexinV 选择性结合 PS,从而阻断 PS 的促凝血反应^[16]。乳粘素是一种巨噬细胞和内皮细胞分泌的糖蛋白,分子结构中包含 EFG1-EFG2-C1-C2 结构域,其中 C2 结构域能够特异性结合 PS。同时,乳粘素的 C2 结构域晶体结构与 V 因子和Ⅷ因子的 C2 结构域相似,揭示乳粘素可通过与 V 因子和Ⅷ因子竞争膜结合位点,而作为一种理想的抗凝药物^[17]。乳粘素通过吞噬细胞 α v β 3/5 整合素的羟基末端锚定于表达 PS 的细胞,经由其

EFG2 结构域内的 RGD 基序介导吞噬。最近研究发现,乳粘素能促进巨噬细胞清除 PMPs,介导血管内皮细胞吞噬微球^[18-19]。

4 展望

ONFH 是由各种病因导致关节塌陷和关节炎的一种破坏性疾病。以往成功治疗该病的方法为外科手术(髋关节置换)。近几十年来,研究人员一直在不断尝试探索该病的发病机制以寻找更好的治疗方法,认为应注重疾病的一级预防和早期诊断。多种致病因素诱发 ONFH,使微球释放的数量高于正常人群水平,故其可作为治疗 ONFH 的靶点。而我们可应用 PS 的特异性探针乳粘素进行早期预防,同时靶向微球表面的 PS,抑制其促凝活性并介导吞噬微球作用,有望成为非手术治疗 ONFH 的新途径。

参考文献

- [1] BOULANGER C M, AMABILE N, TEDGUI A. Circulating microparticles; a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease[J]. *Hypertension*, 2006, 48: 180—186.
- [2] DIAMANT M, TUSHUIZEN M E, STURK A, et al. Cellular microparticles; new players in the field of vascular disease? [J]. *Eur J Clin Invest*, 2004, 34: 392—401.
- [3] JONES J P JR. Intravascular coagulation and necrosis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1992, 277: 41—53.
- [4] KANG P, SHEN B, YANG J, et al. Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Throm Res*, 2008, 123: 367—373.
- [5] HRISTOV M, ERL W, LINDER S, et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro [J]. *Blood*, 2004, 104: 2761—2766.
- [6] JANISZEWSKI M, DO CARMO A O, PEDRO M A, et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32: 818—825.
- [7] DISTLER J H, PISETSKY D S, HUBER L C, et al. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 3337—3348.
- [8] SAPET C, SIMONCINI S, LORIOD B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation; identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2 [J]. *Blood*, 2006, 108: 1868—1876.
- [9] HORSTMANN L L, JY W, JIMENEZ J J, et al. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles [J]. *Keio J Med*, 2004, 53: 210—230.
- [10] OGATA N, IMAIZUMI M, NOMURA S, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy [J]. *Diabetic Res Clin Pract*, 2005, 68: 193—201.
- [11] STEPPICH B, MATTISEK C, SOBCHYZK D, et al. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93: 35—39.
- [12] 吴志宏, 郑敏哲, 李辉, 等. 细胞膜微粒对内皮细胞凋亡影响的研究 [J]. *中国骨与关节外科*, 2011, 4(2): 141—145.
- [13] 郑敏哲, 吴志宏, 纪春良, 等. 内皮细胞膜微粒对血管内皮细胞通透性的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(5): 337—339.
- [14] 翁习生, 邱贵兴, 高增鑫, 等. 血浆膜微粒与激素性股骨头缺血坏死的相关性研究 [J]. *中国骨与关节外科*, 2008, 8(3): 217—223.
- [15] GASSER O, SHIFFERLI J A. activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis [J]. *Blood*, 2004, 104: 2543—2548.
- [16] HOU J, FU Y, ZHOU J, et al. Lactadherin functions as a probe for phosphatidylserine exposure and as an anticoagulant in the study of stored platelets [J]. *Vox Sang*, 2011, 100: 187—195.
- [17] SHI J, GILBERT G E. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites [J]. *Blood*, 2003, 101: 2628—2636.
- [18] DASGUPTA S K, ABDEL-MONEM H, NIRAVATH P, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles [J]. *Blood*, 2009, 113: 1332—1339.
- [19] TERRISSE A D, PUECH N, ALLART S, et al. Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8: 2810—2819.

(收稿日期: 2012-12-25)