

获得性活化蛋白 C 抵抗发生机制

顾佳鑫¹ 高玉娟¹ 刘述川¹ 苏雁华¹

[关键词] 活化蛋白 C 抵抗; Leiden FV 突变; 炎症因子; 蛋白 S; 抗磷脂抗体

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2019.05.018

[中图分类号] R554 [文献标志码] A

Mechanisms of acquired activated protein C resistance

Summary Protein C system is an important anticoagulant system that plays a significant role in balancing the coagulation and fibrinolysis. Proteolytic inactivation of FV a and FVIII a by activated protein C (APC) is activated by thrombin bound to thrombomodulin, and its cofactors protein S and FV is a key process in the physiological down-regulation of coagulation. Functional abnormality of this pathway is called APC resistance, which is associated with an increased risk of venous thrombosis. APC resistance was discovered in thrombophilic families originally and later showed to be associated with the Leiden FV mutation. Leiden FV is the major cause of hereditary APC resistance, while acquired conditions contribute to APC resistance and increase the risk of venous thrombosis. This paper reviews the mechanisms of acquired APC resistance.

Key words activated protein C resistance; Leiden FV mutation; inflammatory factor; protein S; antiphospholipid antibody

蛋白 C 在凝血酶-血栓调节蛋白复合物作用下形成活化蛋白 C (activated protein C, APC), 具有抗凝、抗炎、促纤溶、抗凋亡和保护内皮细胞的功能, 与人类多种疾病相关。通过不同的生物活性, APC 和蛋白 C 途径在转化研究及相关疾病治疗策略上有重要意义, 如血栓形成、炎症反应、缺血性脑卒中和神经退行性疾病等^[1]。凝血因子 V (FV) 和凝血因子 VIII (FVIII) 是由多个区域 (A1-A2-B-A3-C1-C2) 组成的同源蛋白。由肝脏合成, 以不活跃的前体因子形式释放到血液中, 并以单链结构循环。在凝血酶或凝血因子 Xa (FXa) 的蛋白水解作用下, 它们丢失 B 区域转换为活跃形式。FVa 和 FVIIIa 作为非酶作用的辅助因子分别促进 FXa 活化凝血酶原以及 FIXa 活化 FX。上述反应以数量级式被加速, FVa 和 FVIIIa 是凝血级联过程中的限速物质。因此, 为维持出血平衡, 它们的活性需被严密调控。蛋白 C 系统中的 APC 和它的辅助因子蛋白 S (PS) 及 FV 可以水解灭活 FVa 和 FVIIIa。正常生理条件下, 向血浆中加入 APC, 由于 FVa 和 FVIIIa 失活, APTT 延长。如果加入 APC 后 APTT 不延长或需加入更多 APC 才可延长至预定时间, 这种现象叫做 APC 抵抗。本文着重综述 APC 在抗凝过程中的重要作用。

1 蛋白 C 抗凝途径

1.1 蛋白 C 活性

蛋白 C 是由肝脏合成的维生素 K 依赖性糖蛋白^[2], 血浆浓度大约 3~6 mg/L。它是丝氨酸蛋白酶原, 在凝血酶的作用下与内皮细胞表面的血栓调节蛋白 (TM) 结合, 被活化为具有酶活性的

APC。内皮细胞蛋白 C 受体 (EPCR) 与蛋白 C 连接, 可以增加蛋白 C 与血栓调节蛋白-凝血酶复合物的亲和力, 从而促进蛋白 C 活化过程^[3]。

1.2 FVa 灭活

在 Ca^{2+} 作用下, FVa 由一条重链 (A1-A2) 和一条轻链 (A3-C1-C2) 通过非共价键连接组成。APC 能够限制 FVa 重链的蛋白酶活性, 使 FVa 与 FXa 的亲和性降低^[4]。APC 在 Arg306、Arg506 和 Arg679 位切割 FVa。虽然 Arg506 是最活跃的切割位点, 但是切割 Arg306 能使 FVa 完全失活。Arg679 位点的切割进行的很慢, 对灭活 FVa 作用较小。由于 Arg506 切割速度是 Arg306 的大约 20 倍, 所以灭活 FVa 主要通过早期快速切割 Arg506, 剩下的大约 40% 的活性通过切割 Arg306 实现。当发生 Leiden FV 突变缺少 Arg506 位点时, 也可以通过缓慢切割 Arg306 灭活 FVa^[5]。

APC 的辅助因子 PS 可以促进灭活 FVa^[6]。PS 作用高度依赖磷脂, 并可协助提高切割 Arg306 大约 20 倍^[7]。因此, 在发生 Leiden FV 突变时, PS 对促进灭活 FVa 起重要作用。而 PS 促进 Arg506 位点切割仅加速大约 2 倍。FXa 保护 Arg506 位点, 凝血酶原抑制 Arg306、Arg506 位点被切割, 这些保护可以被 PS 清除。

1.3 FVIIIa 灭活

通过观察发现, FVIIIa 本质上是不稳定的, 可通过 A2 亚基的分离而自发的失去活性, 因此 APC 与 FVIIIa 灭活相关性受到质疑。然而, 当 FVIIIa 与酶复合物合并时, A2 亚基的自发分离很慢, 因此 APC 成为灭活 FVIIIa 的主要途径。APC 的切割位点在 FVIIIa A1 区域的 Arg336 和 A2 区域的 Arg562, 这

¹ 哈尔滨医科大学第一附属医院 (哈尔滨, 150000)

通信作者: 苏雁华, E-mail: suyanhua163@163.com

两个位点切割都能引起 FⅧa 失活,切割 Arg336 可改变 A1 和 A2 区域的相互作用;切割 Arg562 能够破坏 FⅧa 与 FⅨa 的重要连接位点^[8]。虽然 APC 切割 Arg336 较 Arg562 快,但通过单独缓慢切割 Arg562 也可以将 FⅧa 灭活。

PS 和 FV 促进 APC 水解 FⅧa,并且对 Arg562 位点的促进作用更大。从而导致在 PS 和 FV 存在情况下,Arg336 和 Arg562 两个位点的切割速率相近。

2 遗传性 APC 抵抗

Leiden FV (FV Arg⁵⁰⁶ → Gln) 在人群中较为普遍。仅欧洲就有 2 600 万人携带这种突变,约占欧洲总人口的 5%^[9]。Leiden FV 发生率高并与血栓风险相关,大约 20% 的静脉血栓患者与 Leiden FV 突变有关,在易栓症家族中该突变高达 50%。与正常人相比,Leiden FV 突变的杂合子携带者血栓发生率增加 9 倍,纯合子携带者血栓发生率增加 80 倍。然而,大部分 Leiden FV 携带者并未出现静脉血栓,其他易栓缺陷(蛋白 C 或 PS 缺陷、G20210A 突变)和(或)获得性危险因素(口服抗凝药),可增强 Leiden FV 突变效果。

Leiden FV 引起 APC 抵抗的机制已被明确阐明。发生 Leiden FV 突变时,FV 的 506 位 Arg 转换为 Gln,导致 APC 切割位点缺失^[5]。另一方面,由于缺少 Arg506 切割位点,Leiden FV 不能促进 APC 灭活 FⅧa。因此,Leiden FV 突变同时干扰 FV a 和 FⅧa 灭活。

3 获得性 APC 抵抗机制

3.1 TM 和 EPCR 丢失

TM 和 EPCR 是 APC 抗凝过程中两种重要的膜受体。凝血酶和 TM 结合保护凝血酶的促凝活性,并且促进蛋白 C 活化。EPCR 可以将蛋白 C 锚定在细胞内皮表面上,从而增强上述反应。

在组织培养中可观察到,TNF、IL-6、内毒素可以引起内皮细胞表面 TM 和 EPCR 缓慢丢失^[10]。这些炎症分子可以直接通过从头合成途径或者间接通过凝血系统,动员白细胞粘附分子(E-选择素)刺激凝血酶形成,从而动员内皮细胞的 Weibel-Palade 小体,进而动员 P-选择素,白细胞通过 IL-1 与 P-选择素连接,活化后的白细胞释放可以切割 TM、EPCR 的颗粒,使 TM、EPCR 从内皮细胞表面脱落,转换成可溶形式,从而失去促进蛋白 C 活化功能。同时可溶性 EPCR(sEPCR)能够抑制蛋白 C 活化,诱导血栓形成,可能由于 sEPCR 抑制蛋白 C/APC 与磷脂结合或者 sEPCR 改变了 APC 的分子构象。这种抑制呈剂量依赖相关同时需要 Ca²⁺、Mg²⁺ 以及脂质体参与^[11]。

除此以外,TNF、IL-1 和内毒素可以下调内皮

细胞上的 TM 表达^[11]。研究表明,短时间的 TNF 刺激就可以抑制 TM 转录;同时可引起内皮细胞表面的 TM 被内化,在溶酶体的作用下被降解。

3.2 PS 减少

PS 可以提高 APC 与细胞膜表面亲和力,促进 APC 发挥抗凝作用^[12]。人体内 30%~40% 的 PS 以游离蛋白形式循环,其余 60%~70% 与 C4 结合蛋白(C4bP)结合,只有游离 PS 才辅助活化蛋白 C。炎症状态下,C4bP 可增加到 400%,导致游离 PS 减少。据临床统计显示,恶性血液疾病(包括急性髓系白血病、慢性粒细胞白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤等)患者血浆游离 PS 水平明显减少,因此认为游离 PS 的减少可能由瘤细胞过度表达 C4bP 引起。

口服避孕药也可引起 PS 水平降低。PS 没有血清蛋白酶结合位点,但其 C 末端有一个与血浆类固醇结合蛋白同源的位点,如性激素结合蛋白、皮质醇结合蛋白等^[13]。这可能是口服避孕药、性激素类药物、怀孕等引起 APC 抵抗的原因之一。

肺间质综合征、弥散性血管内凝血、肝脏疾病、口服华法林、水痘、HIV 感染、多发性骨髓瘤等疾病情况下,可能出现具有抗 PS 的免疫球蛋白,这种免疫球蛋白是非抗磷脂抗体,能够抑制 PS 活性。通常抗-PS 抗体是系统性红斑狼疮发生 APC 抵抗的主要原因,这些抗体出现可能增加血栓形成风险。

3.3 抗磷脂抗体

抗磷脂抗体是直接抑制磷脂与血浆蛋白连接的抗体。至今已发现大量血浆蛋白受抗磷脂抗体影响,抗磷脂抗体能引起 APC 抵抗已被熟知。抗磷脂抗体能直接影响蛋白 C 系统的各种蛋白,抑制 APC 抗凝。其引起 APC 抵抗可能由于免疫复合物竞争抗凝途径的细胞膜磷脂结合位点或干扰 APC 复合物形成。可能涉及以下几个机制^[11]:①抑制凝血酶形成途径;②干扰 TM-凝血酶活化蛋白 C 途径;③抑制蛋白 C 复合物聚集;④直接或间接通过 PS 抑制 APC 活性;⑤直接抑制 APC 灭活 FV a 和 FⅧa。现已证明抗-β2GPI 抗体能抑制 FV a 降解,某些抗-凝血因子 II 抗体可能也与凝血酶反应从而干扰凝血酶活化。

3.4 循环 APC 半衰期缩短

APC 循环受蛋白 C 抑制物 α1-抗胰蛋白酶和 α2-巨球蛋白调节,半衰期 15 min^[14]。与 C4bP 相同,α1-抗胰蛋白酶是急性期反应物,受炎症因子调节。炎症时,APC 半衰期可能会缩短,从而降低其抗凝潜能。

3.5 凝血因子 V 受抑制

FV a 是 APC 抗凝系统的主要作用底物,FV 是 APC 的辅助因子。如 Leiden FV 突变,当 FV 结构发生改变时,APC 抗凝过程可能受到阻碍。重组

FV位点突变研究表明切割 Arg1545 会导致FV丧失辅助 APC 抗凝活性,而切割 Arg709 和 Arg1018 对 FV 发挥辅助因子作用无影响。研究表明 B 区域的 C 末端(最后 70 个氨基酸)是 FV 发挥抗凝作用所必须的^[15]。然而,开放的 B 区域是否保留其 APC 辅助因子活性或者是否需要 B 和 A3 区域完整连接,仍存在争议。据推断,B 区域碎片与 FV a (非 FV)在 PS 存在时共同刺激 APC 活性,同时研究表明在没有 B 区域碎片时,FV a 不能促进 APC 活性。正如既往实验证明,单克隆抗 B 区域抗体能直接抑制 FV 的 APC 辅助因子活性。由此可见,B 区域很重要。

自发性 FV 抗体也可引起 APC 抵抗。但至今仅有 3 例患者涉及自发 FV 自身抗体,这些抗体增加血栓形成风险的分子机制并不明确。可能这些自身抗体抑制 FV 抗凝活性。然而与 FV 抗体相关的血栓形成较少,反而出血风险较大,且严重程度各不相同,轻则无症状,重则发生危及生命的出血。

3.6 凝血因子Ⅷ升高

肝硬化患者可能出现 APC 抵抗,通常患者FⅧ水平升高,蛋白 C 水平降低。FⅧ/蛋白 C 比率增加可能导致 APC 抗凝活性受抑制从而导致血栓形成倾向。这种血栓形成倾向状态被认为是导致门静脉血栓形成频繁出现的原因^[16]。肝硬化本身引起的血液郁积状态已经是高凝状态,FⅧ/蛋白 C 比率增加可能是另一促进因素。由于 FⅧ/蛋白 C 比率增加,肝硬化患者应严密抗凝,减少出凝血失衡风险。

4 临床意义

APC 抵抗发病率约为 15%,是至今已引起静脉血栓的最常见危险因素,在静脉血栓病患者中占比高达 40%。显然,不仅 Leiden FV 突变可引起 APC 抵抗,获得性因素也可引起 APC 抵抗,并且明显增加血栓形成风险。这可能与几个已知的除 Leiden FV 突变外的血栓形成高风险因素有关,如 TM 或 FⅧ水平升高、PS 水平降低、口服避孕药、怀孕、抗磷脂抗体阳性、肿瘤,以上变化均可引起血浆 APC 反应活性降低。APC 抵抗与血栓形成风险呈正相关,APC 抵抗强阳性者比阴性者血栓形成风险高大约 4 倍。同时,已有报道显示发生过静脉血栓的 Leiden FV 携带者 APC 活性明显低于未发生过血栓的携带者。以上观察结果表明 APC 抵抗检测能够预测临床血栓风险。

综上所述,蛋白 C 系统在维持出凝血平衡过程中起着重要作用。当发生 APC 抵抗时,静脉血栓发生风险明显增加,严重影响患者生存率及生活质量。APC 抵抗是基因及获得性因素引起的复杂表型。Leiden FV 突变是引起 APC 抵抗的重要原因,同时,获得性因素的作用不容忽视。早期检测 APC 活性能够评估患者出凝血状态,预测血栓风险。

参考文献

- [1] Esmon CT. Protein C anticoagulant system-anti-inflammatory effects[J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34:127-132.
- [2] Xie W, Liu Z, Chen B. Protein C deficiency resulting from two mutations in PROC presenting with recurrent venous thromboembolism[J]. *J Vasc Surg Cases Innov Tech*, 2017, 3:254-256.
- [3] 胡豫. 中国人群静脉血栓形成的分子遗传学研究[J]. *临床血液学杂志*, 2013, 26(1):4-8.
- [4] Chen C, Yang L, Villoutreix BO, et al. Gly74Ser mutation in protein C causes thrombosis due to a defect in protein S-dependent anticoagulant function [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117:1358-1369.
- [5] Marlar RA, Gausman JN. Assessment of hereditary thrombophilia: performance of protein C (PC) testing [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1646:145-151.
- [6] Marlar RA, Gausman JN. Assessment of hereditary thrombophilia: performance of protein S (PS) testing [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1646:153-160.
- [7] Pilli VS, Plautz W, Majumder R. The journey of protein S from an anticoagulant to a signaling molecule [J]. *JSM Biochem Mol Biol*, 2016, 3:1014.
- [8] Fernández JA, Xu X, Sinha RK, et al. Activated protein C light chain provides an extended binding surface for its anticoagulant cofactor, protein S [J]. *Blood Adv*, 2017, 1:1423-1426.
- [9] Amiral J, Vissac AM, Seghatchian J. Laboratory assessment of activated protein C resistance/factor V-Leiden and performance characteristics of a new quantitative assay[J]. *Transfus Apher Sci*, 2017, 56:906-913.
- [10] Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO. Cell painting with an engineered EPCR to augment the protein C system[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114:1144-1155.
- [11] Misasi R, Capozzi A, Longo A, et al. "New" antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015:858542.
- [12] Hayashi T, Suzuki K. Changes of expression of the protein C pathway components in LPS-induced endotoxemia—implication for sepsis[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2015, 15:2-9.
- [13] Harrington LB, Marck BT, Wiggins KL, et al. Cross-sectional association of endogenous steroid hormone, sex hormone-binding globulin, and precursor steroid levels with hemostatic factor levels in postmenopausal women[J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15:80-90.
- [14] Martos L, Ramón LA, Oto J, et al. α 2-macroglobulin is a significant in vivo inhibitor of activated protein C and low APC: α 2M levels are associated with venous thromboembolism[J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118:630-638.
- [15] Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13:S200-S207.
- [16] La Mura V, Tripodi A, Tosetti G, et al. Resistance to thrombomodulin is associated with de novo portal vein thrombosis and low survival in patients with cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2016, 36:1322-1330.

(收稿日期:2018-07-19)