

血栓调节蛋白在凝血功能调节及炎症反应中作用的研究进展

宋立成¹, 孟激光², 韩志海²

¹解放军医学院, 北京 100039; ²海军总医院 呼吸内科, 北京 100048

摘要: 血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)是凝血系统中重要的调节因子。其与凝血酶形成复合物后可以活化蛋白C, 从而抑制凝血途径。近年来, 随着凝血酶及活化蛋白C在炎症通路中调节功能的揭示, 血栓调节蛋白在炎症反应、免疫功能及调节白细胞分化、黏附中的显著作用成为研究热点, 并且已扩展至肿瘤领域。本文对血栓调节蛋白在上述领域的研究进展进行综述。

关键词: 血栓调节蛋白; 凝血功能; 炎症反应

中图分类号: R 331 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2017)10-0984-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.10.020

网络出版时间: 2017-07-13 15:12 **网络出版地址:** http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170713.1512.002.html

Research advances in role of thrombomodulin in coagulation and inflammation

SONG Licheng¹, MENG Jiguang², HAN Zhihai²

¹Medical School of Chinese PLA, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Pulmonary and Critical Care, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: HAN Zhihai. Email: hanzhihai@sohu.com

Abstract: Thrombomodulin, a key regulator in coagulation, acts as an inhibitor to thrombogenesis through being combined with thrombin and activating protein C. In recent years, with the revealing of the fact that thrombin and activated protein C play important roles in regulating inflammation, thrombomodulin is becoming a research hot spot in inflammation, immunity, leukocyte differentiation and adhesion, which has extended to carcinoma. In this article, we aim to investigate the research advances in thrombomodulin in the areas mentioned above.

Keywords: thrombomodulin; coagulation; inflammatory reaction

局部或全身的凝血功能紊乱是严重感染的一大特点^[1]。凝血功能紊乱若失控可导致弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)的发生。凝血与纤溶的平衡维持取决于个体蛋白合成能力及合成的凝血酶及基质的稳定性, 还有天然抗凝物的有效性。目前发现3条主要的天然抗凝途径: 1)组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI), 当结合因子Xa(factor Xa, FXa)时, 形成抑制组织因子-因子VII(TF-FVIIa)复合物, 从而抑制了凝血酶形成的初步反应; 2)抗凝血酶, 是凝血酶的直接抑制剂; 3)蛋白C可以被凝血酶-血栓调节蛋白复合体水解为活性蛋白C(active protein C, APC), APC与内皮蛋白C受体(endothelial protein C receptor, EPCR)结合后, 可以发挥强效的抑制凝血酶的作用, 而且也可以作为促纤溶物抑制纤溶酶原激活物抑制因子-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)和凝血酶激活的纤溶抑制物(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)^[2]。APC系统中重要调节因子血

栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)是一种表达于血管内皮细胞表面的糖蛋白, 在维持凝血功能及保证局部损伤的炎症反应中起重要作用^[3]。TM由5个结构域组成, NH₂-末端凝血酶结合结构域, 6个重复EGF样结构域, 富O糖基化位点结构域, 跨膜结构域, 胞质内尾端结构域^[4]。目前的众多研究已证实TM在凝血调节、炎症及肿瘤发展等过程中的重要作用, 本文就此内容进行综述。

1 TM是APC系统中的关键调节因子

蛋白C(protein C, PC)作为一种全身性抗凝剂, 是依赖于维生素K的肝内合成的血浆蛋白, 通过结合钙离子启动催化活性^[5]。当内皮细胞表面凝血酶结合TM, 凝血酶通过与纤维蛋白原的特异性结合转换至PC^[6], FVa和FVIIIa可以促使凝血酶原转变为凝血酶, APC和辅因子蛋白S(protein S, PS)可以使上述两种凝血因子裂解和失活, 因此APC对他们的裂解可以减少凝血酶的产生, 并且使得纤溶酶原抑制因子(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)耗竭^[7], 从而提供了凝血激活的负反馈调节机制, TM可以通过这条途径间接抑制血栓的形成。

EPCR结合PC并将PC呈递到凝血酶-TM复合物, 在体外可8倍加强PC激活的活性, 在体内可20倍加强PC激活的活性^[8]。一项研究发现EPCR功能受损有促凝作用, 表现为血凝块降解时间延长, 凝血酶水平明显增高^[9], 因此EPCR功能的受损可以通过表达TM和EPCR的细胞的凝血酶的产生和凝块降解来评估。在不同的TM水平, EPCR功

收稿日期: 2017-05-26

基金项目: 部委级资助项目; 军队后勤科研计划重点项目(BHJ16J011)

Supported by the Key Research Program of Logistics of Chinese PLA(BHJ16J011)

作者简介: 宋立成, 男, 在读硕士, 医师。Email: songlicheng@tom.com

通信作者: 韩志海, 男, 博士, 主任医师。Email: hanzhihai@sohu.com

能的受损或血浆PC的缺失导致APC产生量的明显降低及凝血酶产生量的明显增高,并且使得凝块降解受损,可能是大血管血栓形成的原因。

除了激活PC,凝血酶-TM复合物也可以激活凝血酶活化纤溶抑制剂(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)。研究显示,低浓度的TM可以加强TAFI的激活,而高浓度的TM可以加强PC的激活^[10]。凝血酶-TM复合物激活TAFI的速率大约比单独的游离凝血酶快1 000倍,活化TAFI可以通过去除纤维蛋白羧基端赖氨酸残基抑制纤溶过程,从而降低纤溶酶的产生和凝块降解,导致血凝块溶解延迟。因子XII I a可能使TAFI与纤维蛋白发生交联,有助于防止新形成的纤维蛋白过早被纤溶酶降解,交联也可能促进TAFI活化、增强稳定酶活性并防止有已激活的酶进一步降解。

2 TM是调节炎症反应的关键因子

TM在炎症反应中的作用有PC依赖性和PC非依赖性两种途径。APC在免疫系统中有非常广泛的作用,它可以通过影响细胞因子和黏附因子的表达抑制白细胞的黏附和迁移^[11];也可以在炎症病理过程中维持血管系统稳定,这种效应依赖蛋白酶活化受体1(plasminogen activator inhibitor 1, PAR-1)^[12]。另一条途径是PC非依赖途径:

1)TM可以介导单核细胞的黏附作用。在炎症过程中,大量由循环中的单核细胞分化而来的巨噬细胞在受损部位聚集,发挥免疫功能,抵抗病原体。白细胞运输的过程包括滚动、捕获、黏附、转移。多种白细胞和内皮细胞黏附分子在白细胞聚集的不同阶段发挥不同的调节作用。选择素介导的是白细胞活动减慢和其沿着内皮细胞表面的滚动,为牢固黏附做准备^[13]。选择素配体和趋化因子受体引起的信号转导途径的作用是激活白细胞整合素,整合素可以与免疫球蛋白超家族相互作用,促进牢固黏附^[13]。最后,白细胞迁移过内皮细胞侵入受损组织。白细胞与细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的紧密黏附需要 $\beta 2$ 整合素的激活, $\beta 2$ 整合素可以被p38 MAPK途径快速转换^[14]。而Le^x也是TM的配体之一,很多研究提示Le^x的表达与炎症密切相关。如ICAM-2上表达的Le^x作为树突状细胞特异性黏附因子(C型凝集素)的重要糖类配体,可以调节树突细胞滚动和在上皮细胞上的黏连^[15]。一项研究提示当TM结合到其配体Le^x上时,p38 MAPK信号转导途径被引发,导致 $\beta 2$ 整合素的激活,从而促进了THP-1细胞(单核细胞)的黏附。TM/Le^x相互作用介导的细胞黏附于上皮细胞,提示此为单核细胞黏附的一个新机制^[16]。

2)TM可以介导单核细胞的分化。一项研究检测佛波酯(phorbol esters, PMA)诱导单核细胞(THP-1细胞)分化成巨噬细胞过程中TM的表达情况。数据显示用150 nm的PMA处理THP-1细胞后,TM的表达水平随时间明显增高。当THP-1细胞用TM siRNA转染来达到敲除TM基因的目的,或者用HA-TM FL[influenza hemagglutinin (HA) epitope-tagged full-length TM expression plasmid]质粒达到TM超表达的目的后再用PMA处理,结果提示TM敲除后可以降

低PMA诱导的THP-1分化,而TM的超表达可以明显增高THP-1的分化。且流式细胞仪测定巨噬细胞表面标记物提示,当TM基因敲除后,PMA诱导的巨噬细胞表面CD14、CD68的表达降低。相反的,TM超表达组的CD14和CD68均明显增加。而且单独用TM siRNA或者TM超表达质粒并不能增加CD14和CD68的表达。这些数据提示TM参与THP-1细胞的分化^[17]。具体的调控机制仍需进一步研究。

3)TM通过调节Tregs的水平控制炎症反应。动物模型研究发现,TME5保护小鼠免受急性抑制物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)与提高调节性T细胞(Tregs)水平有关,并且TME5降低肝和结肠中TH1和TH17亚型,从而减轻目标器官受损。因此,rTM增加器官受体Tregs的数量,是其抗炎功能的一个可能方式^[18]。研究也发现rTM及其TME5可以保护内皮细胞免于钙调神经磷酸酶抑制剂的攻击。这种细胞保护作用依赖的是GPR15在内皮细胞上的表达。G蛋白偶联受体15(G-protein coupled receptor 15, GPR15)是G蛋白偶联受体家族中的一种孤儿受体,最初被发现是人类免疫缺陷病毒的共受体,配体结合GPR15后可以通过几种胞内信号转导途径传导信号,如环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的产生,蛋白激酶C、MAPK及NF- κ B途径^[19]。近期一项研究探索了GPR在GVHD中的作用。诱导急性GVHD的方法是将作为供体的野生型或者GPR15 KO型小鼠的脾T细胞移植到受体小鼠中,用rTM、TME45或TME5治疗急性GVHD,可以显著延长受体小鼠的生存期。与PBS相比,TME5可以显著降低受体小鼠血浆中IL-6、IFN- γ 及IL-17A的水平,提高IL-10的水平,以上提示TME5在GVHD模型中的抗炎作用。HE染色提示与PBS处理组相比,TME5治疗后肝和结肠中细胞浸润减少。进一步对目标器官中CD4⁺细胞研究提示TH1和TH17细胞的比例增高,而Tregs细胞降低。而TME5处理组提示TH1、TH17细胞比例降低,Tregs比例增高。当小鼠转染GPR15KO T细胞后,血浆炎症因子水平经PBS或TME5处理是无差异的。病理分析提示TME5不能抑制转染GPR15KO T细胞的小鼠的肝或结肠淋巴细胞的浸润。而且GPR15KO T细胞转染后的小鼠的目标靶器官,无论经PBS处理还是经TME5处理,其CD4⁺ T细胞数量都是相似的。这些发现提示TME5的抗炎功能取决于供体T细胞表达的GPR15。TME5可以在WT中剂量依赖性地抑制IL-6的上调,但是在GPR15KO T细胞中则无此效果。而且当GPR15表达载体再次转染入GPR15KO T细胞中使得GPR15表达恢复时,TME5抑制IL-6的功能再次恢复^[20],而IL-6是负向调节Tregs分化的重要因子^[21],原始T细胞在TGF- β 的条件下分化为Tregs,IL-6和TGF- β 共同存在的条件下或者其他细胞因子可以诱导其分化为其他的效应表型^[22]。此研究发现在GPR15存在的条件下,TME5可以抑制IL-6的产生,这个过程与NF- κ B途径的抑制有关。且TME5可以降低磷酸化STAT3的水平,这个因子是调节IL-6功能所必需的^[23]。因此,TME5可以通过调节IL-6的功能协助Tregs的分化。TME5通过协助Tregs的分化、抑制异基因反应T细

胞的诱导缓解急性GVHD, 这个过程是GPR15依赖性的, 可能有潜在的治疗价值。

3 TM在肿瘤中的调节作用主要是通过NK- κ B途径

TM已被确认在一系列人类肿瘤中表达改变。69%的食管癌病人表现为转移病灶中TM表达降低^[24]。在肝细胞癌中, TM阳性的病人无复发生存率要高于TM阴性的病人^[25]。

多数研究证明, TM主要通过炎症通路的影响在肿瘤中发挥调节作用。肿瘤发生的一个重要机制是细胞因子诱导的转录因子激活。NF- κ B包含p65和p50组成的异质二聚体复合物。这一复合物在正常细胞内无活性, 因为有NF- κ B抑制因子(IK β)的存在。多种激活剂, 包括抗肿瘤制剂, 通过NF- κ B通路核因子 κ B抑制激酶(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK β)复合物通路使得IK β 磷酸化而激活。一项研究通过蛋白印记检验rTM干预后的NF- κ B途径上游分子pIK β 和IKK β 。pIK β 的水平在rTM治疗后降低, 提示rTM通过抑制IK β 的磷酸化而达到阻断NF- κ B的目的^[26], 从而阻止NF- κ B在细胞核中激活并启动目标基因的转录和表达^[27]。

凝血酶在胰腺癌中可以浓度依赖性地激活NF- κ B^[28]。一项研究通过用抗PAR1抗体抑制PAR1, 导致凝血酶不能诱导NF- κ B的激活, 提示凝血酶对NF- κ B的激活是PAR1依赖性的。而且rTM可以阻断凝血酶诱导的NF- κ B和PAR1的激活。提示rTM抑制NF- κ B激活是通过阻断凝血酶诱导的PAR1激活。当TM结合凝血酶后, 凝血酶不再激活PARs, 因此TM是凝血酶-PAR信号途径的抑制因子, 但却是内皮细胞APC-PAR信号途径的强化因子。所以rTM可以通过抑制凝血酶诱导的PAR1激活, 从而抑制NF- κ B信号转导途径。化疗或放疗可以加强NF- κ B的激活, 通过产生抗凋亡蛋白引起对各种治疗的获得性耐受^[28]。因此, 对肿瘤细胞NF- κ B的抑制是抑制肿瘤生长和强化抗肿瘤治疗的潜在选择。

在化疗药物的耐药方面, 为了阐明TM的表达是否影响肺癌细胞对阿霉素的敏感性, 通过转染TM siRNA进入肺癌细胞沉默TM的表达, RT-PCR和Western blot显示TM的表达在细胞中明显降低, CCK-8检验提示TM的下调降低了阿霉素在腺癌细胞中的敏感性^[29]。这些结果表明TM可以改善肿瘤细胞的耐药情况, 但是具体机制仍需进一步研究。

上皮-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是保证在多细胞器官的形态发生时组织重塑的关键一步^[30]。越来越多的证据表明EMT在肿瘤启动和进展中起到关键作用^[31]。研究发现TM的过度表达可以使细胞分裂在G0/G1期受抑, 从而明显降低细胞集落形成能力。研究发现将TM表达沉默后可以导致上皮细胞钙黏蛋白E(E-cadherin)下调及N-cadherin上调, 而TM可以上调E-cadherin及下调N-cadherin的表达, 导致肺癌细胞中EMT的反转^[32]。总的来说, TM可以作为肿瘤的抑制因子, 介导TM的过度表达可能成为新的抗肿瘤药物研制思路。

参考文献

- Hofstra JJ, Vlaar AP, Knape P, et al. Pulmonary activation of coagulation and inhibition of fibrinolysis after burn injuries and inhalation trauma [J]. *J Trauma*, 2011, 70 (6): 1389-1397.
- Christiaans SC, Wagener BM, Esmont CT, et al. Protein C and acute inflammation: a clinical and biological perspective [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305 (7): L455-L466.
- Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (5): 1267-1274.
- Hanly AM, Winter DC. The role of thrombomodulin in malignancy [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33 (7): 673-679.
- Rezaie AR. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17 (19): 2059-2069.
- Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (8): 1374-1383.
- Chesebro BB, Rahn P, Carles M, et al. Increase in activated protein C mediates acute traumatic coagulopathy in mice [J]. *Shock*, 2009, 32 (6): 659-665.
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, et al. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo [J]. *Blood*, 2001, 97 (6): 1685-1688.
- Pepler L, Wu C, Dwivedi DJ, et al. The impact of the endothelial protein C receptor on thrombin generation and clot lysis [J]. *Thromb Res*, 2017, 152: 30-37.
- Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85 (1): 5-11.
- Levi M, Dörffler-Melly J, Reitsma P, et al. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice [J]. *Blood*, 2003, 101 (12): 4823-4827.
- Schuepbach RA, Feistritz C, Fernandez JA, et al. Protection of vascular barrier integrity by activated protein C in murine models depends on protease-activated receptor-1 [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101 (4): 724-733.
- Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 63 (1): 1-14.
- Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, et al. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils [J]. *Blood*, 2010, 116 (4): 617-624.
- Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1 (4): 353-357.
- Lin WL, Chen CC, Shi GY, et al. Monocytic thrombomodulin promotes cell adhesion through interacting with its ligand, Lewis (y) [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95 (4): 372-379.
- Tsai CS, Lin YW, Huang CY, et al. Thrombomodulin regulates monocyte differentiation via PKCdelta and ERK1/2 pathway in vitro and in atherosclerotic artery [J/OL]. <https://www.nature.com/articles/srep38421>.
- Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, et al. Thrombomodulin alleviates murine GVHD in association with an increase in the proportion of regulatory T cells in the spleen [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2015, 50 (1): 113-120.
- Packiriswamy N, Parameswaran N. G-protein-coupled receptor kinases in inflammation and disease [J]. *Genes Immun*, 2015, 16 (6): 367-377.

(上接986页)

- 20 Pan B, Wang X, Kojima S, et al. The Fifth Epidermal Growth Factor-like Region of Thrombomodulin Alleviates Murine Graft-versus-Host Disease in a G-Protein Coupled Receptor 15 Dependent Manner [J] . Biol Blood Marrow Transplant, 2017, 23 (5) : 746-756.
- 21 Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs [J] . Immunity, 2008, 29 (1) : 44-56.
- 22 Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation [J] . Immunity, 2009, 30 (5) : 646-655.
- 23 Kishimoto T. Interleukin-6 : from basic science to medicine--40 years in immunology [J] . Annu Rev Immunol, 2005, 23 : 1-21.
- 24 Tezuka Y, Yonezawa S, Maruyama I, et al. Expression of thrombomodulin in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship to lymph node metastasis [J] . Cancer Res, 1995, 55 (18) : 4196-4200.
- 25 Zhou J, Tang ZY, Fan J, et al. The potential of plasma thrombomodulin as a biomarker of portal vein tumor thrombus in hepatocellular carcinoma [J] . J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127 (9) : 559-564.
- 26 Shirai Y, Uwagawa T, Shiba H, et al. Recombinant thrombomodulin suppresses tumor growth of pancreatic cancer by blocking thrombin-induced PAR1 and NF-kappaB activation [J] . Surgery, 2017, 161 (6) : 1675-1682.
- 27 Hellweg CE. The Nuclear Factor kappa B pathway : A link to the immune system in the radiation response [J] . Cancer Lett, 2015, 368 (2) : 275-289.
- 28 Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression [J] . Nature, 2006, 441 (7092) : 431-436.
- 29 Yang Y, Cheng BJ, Lu S. Thrombomodulin regulates doxorubicin sensitivity through epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J] . Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (1) : 95-101.
- 30 Bao JF, Hao J, Liu J, et al. The abnormal expression level of microRNA in epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells induced by high glucose [J] . Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (2) : 289-292.
- 31 Zhang QD, Xu MY, Cai XB, et al. Myofibroblastic transformation of rat hepatic stellate cells : the role of Notch signaling and epithelial-mesenchymal transition regulation [J] . Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (21) : 4130-4138.
- 32 Zheng N, Huo Z, Zhang B, et al. Thrombomodulin reduces tumorigenic and metastatic potential of lung cancer cells by up-regulation of E-cadherin and down-regulation of N-cadherin expression [J] . Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476 (4) : 252-259.