

蛋白酶激活受体家族与创面愈合

石胜军 肖能坎

蛋白酶激活受体 (protease-activated receptors, PAR) 是 20 世纪 90 年代初发现的一种跨膜 7 次的 G 蛋白偶联受体, 主要通过血小板膜上的该类受体发挥其激活血小板和促凝血的作用, 因此又称为凝血酶受体 (thrombin receptor, TR)^[1]。国内黄跃生等^[2]提出凝血酶肽类对创面愈合及表皮细胞生长具有促进作用。国外研究证明, PAR 在加快烧伤创面愈合速度、促进体外培养的表皮细胞分化及减少皮肤色素沉着等方面具有调节作用。

一、PAR 家族成员及结构

目前已知的 PAR 成员共有 4 个, 分别为 PAR1、PAR2、PAR3 和 PAR4, 其中 PAR1、PAR3 和 PAR4 为凝血酶受体, PAR2 为胰酶受体。PAR1、2、3 基因紧密定位于染色体的同一位置, 总长度不超过 80 000 bp, 人类为 5q13, 小鼠为 13D2, PAR4 基因则相距较远, 人类为 19p12, 小鼠为 8B3.3^[3]。人类 PAR1 和 PAR3 对浓度在纳摩尔以下的凝血酶即有反应 (EC50 约为 0.2 nmol/L), 而 PAR4 则需要较高浓度的凝血酶水平才能激活 (EC50 为 5 nmol/L), 这个水平在生理情况下也会出现。也就是说人类对凝血酶具有 3 套受体系统, 其中 PAR1 和 PAR3 在低浓度配体的情况下起效, 而 PAR4 则只对较高浓度的凝血酶起作用。对这种现象最好的解释就是不同的组织和细胞具有不同的凝血酶受体系统。

二、PAR 的激活和功能

PAR 为典型的跨膜 7 次的单链 G 蛋白偶联受体, 凝血酶或胰酶识别受体后与受体膜外的氨基末端相结合, 并切下部分氨基末端 (约 30~40 个氨基酸残基), 从而暴露出另一新的末端, 该末端的 6 个氨基酸与受体膜外的第 2 个环进行分子内结合, 真正激活 PAR 及其偶联的 G 蛋白, 引起相应的细胞内信号传导过程^[4], 见图 1。如果用与切割后的新末端序列相同的多肽片段直接刺激 PAR, 就能够在保持受体结构完整性的前提下激活受体。人工合成的对应于不同 PAR 的 PAR 激活肽 (PAR-activated peptide, PAR-AP) 已经被广泛应用于 PAR 的各项研

究, 它们能够在体内外重复相应配体的所有作用。已知 4 种人类 PAR 的 PAR-AP 序列如下: PAR1, NH₂-SFLLRN; PAR₂, NH₂-SLIGKV; PAR3, NH₂-TFR-GAP; PAR4, NH₂-GYPGQV^[5]。

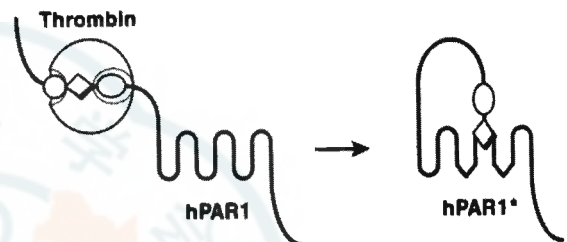


图 1 人类 PAR1 (hPAR1) 激活模式图。大球体代表已经与 PAR1 结合的凝血酶, 内部的小球及菱形从左至右分别代表 PAR1 上的内切酶作用区、新的氨基末端和凝血酶识别区

人体内几乎所有细胞中都有不同类型 PAR 的存在与表达, 其生理功能非常广泛, 包括诱发凝血反应、促进细胞分裂与增殖、释放炎症介质或细胞因子调控局部炎症反应^[6]、收缩子宫、胃肠道和气道平滑肌、调节血管张力^[7]等。激活 PAR 能够刺激胞浆磷脂酶 C、A₂ 和 D, 激活蛋白激酶 C、有丝分裂原激活蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶, 暂时升高胞浆游离钙离子的浓度, 开放细胞膜离子通道, 并促进细胞生长^[8]。

三、PAR 与创面愈合

Pam212 是一种人类表皮细胞系, 在培养中会自发地凋亡。1995 年, Marthinuss 等^[9]指出 Pam212 的凋亡是由表皮细胞本身分泌的一种丝氨酸蛋白酶所引起的, 而这种丝氨酸蛋白酶就是凝血酶。研究表明, 凝血酶受体 PAR1 与皮肤损伤后的愈合过程关系密切, 它能加快表皮细胞的分裂速度, 诱导基底细胞向棘层细胞分化, 促进创面愈合。1997 年 Derian 等^[10]的研究证实, 人类 PAR1 和 PAR2 共同调节了表皮细胞在体外的生长与分化等生理过程, 实验结果显示: PAR1 能够在缺乏生长因子和小牛血清的培养条件下以剂量依赖方式刺激表皮细胞生长。PAR2 能够拮抗生长因子, 抑制表皮细胞生长。PAR1 与 PAR2 共同作用可降低表皮细胞分化标志蛋白的表达, 抑制细胞分化。但 PAR 对创面愈合的影响也许并不简单, 某些根据凝血酶氨基酸序列合成的短肽链表现出与凝血酶不同的激活方式和类似的结果, 说明除了 PAR 通路之外, 凝血酶类可能具

作者单位: 510282 广州, 第一军医大学珠江医院烧伤科

有其他的信号传导途径。例如 TP508, 它是对应于人类凝血酶原 508-530 位氨基酸的合成多肽, 对 PAR 而言, TP508 的长度远不能满足配体识别、受体酶切等过程的需要, 其结合也不会使受体蛋白水解, 但 TP508 确实能够引起效应细胞相关的生理变化。它对中性粒细胞具有趋化作用, 能够招引巨噬细胞在创面聚集, 促进胶原在创基聚集以及加速创面血管化, 从而加速切口和创面的愈合过程。即使是对愈合不良或缺血的创面, TP508 也表现出明显的加速上皮化作用, 这些都与凝血酶或 PAR1-AP 对创面的作用相类似^[11]。应用 PCR 技术比较 TP508 和 PAR1-AP 作用于人类成纤维细胞后细胞基因表达谱的改变, 结果两者之间存在差异, 说明凝血酶的确存在其他非 PAR 的激活途径, 这使凝血酶、PAR 和创面愈合之间的关系更加复杂^[12]。同时, PAR3 和 PAR4 在这一过程中的作用尚无定论, 而且这些调节过程的细胞内信号传导通路、效应机制以及与其他生长因子的相互作用及影响还不清楚。

PAR 对皮肤的作用还表现在维持皮肤的细胞稳态和调节免疫反应方面: 凝血酶和胰酶能够诱导培养人表皮细胞中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和白细胞介素 (IL)-6 的基因表达增加^[13], 还有作者指出, PAR2 激活后表皮细胞的 IL-8 分泌明显增多^[14], 说明 PAR 通过调节这些细胞因子的释放影响皮肤的免疫反应状态、调控炎症反应的程度。Vergnolle 等^[15]报道, 在大鼠后足水肿模型的研究中, 足底皮下注射凝血酶或 PAR1-AP 均可引起足部水肿, 预先应用凝血酶抑制剂水蛭素、耗竭肥大细胞颗粒或注射消炎痛等措施, 能够抑制凝血酶引起的水肿, 但对 PAR1-AP 引起的水肿无效。如果联合应用凝血酶和 PAR1-AP 则导致极为轻微的水肿反应, 同时注射水蛭素则使水肿加重, 又恢复原样。这些结果说明凝血酶同时具有促炎症反应和抗炎反应两方面效果, 前者可能通过肥大细胞及 PAR1 介导, 而后者可能依赖于 PAR3 和/或 PAR4。这意味着在皮肤中, 几种 PAR 可能介导不同甚至是完全相反的生理作用, 凝血酶的实际效果取决于哪一种受体占主导作用以及它们之间的相互作用。

PAR 对皮肤的色泽有显著影响, Seiberg 等^[16]在研究皮肤黑色素细胞和角肌细胞之间信息传导的过程中证实, PAR-2 可介导黑色素从黑素细胞向邻近角肌细胞转运, PAR2-AP 及胰酶能够使移植于裸鼠背部的人皮肤明显变黑, 而特异的丝氨酸蛋白酶抑制剂 RWJ-50353 逆转这种改变并使皮肤色泽变

浅。研究认为这是由于 RWJ-50353 影响了角肌细胞的细胞骨架, 导致其吞噬能力下降。黄豆及其提取物由于具有抑制 PAR2、使肤色变浅和来源广泛等优点已受到许多研究机构的重视, 不久的将来也许会出现以黄豆为基础的淡化色素药物^[17]。

四、发展前景与展望

作为尚未被完全了解的新的受体家族, PAR 独特的激活与灭活方式, 在机体组织内的广泛分布以及复杂多样的生理作用已经引起了许多研究者的兴趣, 随着 PAR 研究的深入及其生理作用的明朗化, 它在血栓性疾病、创面愈合的调节、皮肤免疫与感染以及美容等方面将会有突出的表现。

参 考 文 献

- 1 Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, 64: 1057 - 1068.
- 2 黄跃生, 杨宗城, Carney DH, 等. 凝血酶肽类对创面愈合及表皮细胞增生与移行的作用研究. *中华烧伤杂志*, 2000, 16: 26 - 29.
- 3 Kahn ML, Hammes SR, Botka C, et al. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem*, 1998, 273: 23290 - 23296.
- 4 Rasmussen UB, Vouret CV, Jallat s, et al. cDNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. *FEBS Lett*, 1991, 288: 123 - 128.
- 5 Hollenberg MD. Protease-activated receptors: PAR4 and counting; how long is the course. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20: 271 - 273.
- 6 Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, et al. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med*, 2000, 191: 455 - 462.
- 7 Hamilton JR, Frauman AG, Cocks TM. Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists. *Circ Res*, 2001, 89: 92 - 98.
- 8 Brass LF. Thrombin receptor antagonists: a work in progress. *Coronary Artery Disease*, 1997, 8: 49 - 58.
- 9 Marthiuss J, Andrade GP, Seiberg M. A secreted serine protease can induce apoptosis in Pam212 keratinocytes. *Cell Growth Differ*, 1995, 6: 807 - 816.
- 10 Derian CK, Eckardt AJ, Andrade GP. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ*, 1997, 8: 743 - 749.
- 11 Norfleet AM, Huang Y, Sower LE, et al. Thrombin peptide TP508 accelerates closure of dermal excisions in animal tissue with surgically induced ischemia. *Wound Repair Regen*, 2000, 8: 517 - 529.
- 12 Sower LE, Payne DA, Meyers R, et al. Thrombin peptide, TP508, induces differential gene expression in fibroblasts through a nonproteolytic activation pathway. *Exp Cell Res*, 1999, 247: 422 - 431.
- 13 Wakita H, Furukawa F, Takigawa M. Thrombin and trypsin induce granulocyte - macrophage colony-stimulating factor and interleukin - 6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997, 109: 190 - 207.
- 14 Hou L, Kapas S, Cruchley AT. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin - 8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology*, 1998, 94: 356 -

362.
 15 Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL. Pro-and anti-inflammatory actions of thrombin; a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). Br J Pharmacol, 1999, 126: 1262 - 1268.
 16 Seiberg M, Paine C, Sharlow E, et al. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. Exp Cell Res, 2000, 254: 25 - 32.

17 Paine C, Sharlow E, Liebel F, et al. An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway. J Invest Dermatol, 2001, 116: 587 - 595.

(收稿日期: 2001-08-21)
 (本文编辑: 张 红)

· 经验交流 ·

高原地区 341 例严重烧伤患者创面菌群调查

赵杰 王庆明 张西联 何云邦 保继珍

为了解高原地区严重烧伤患者创面细菌学的流行情况, 现将笔者单位 1990 年 1 月~2000 年 1 月收治的 341 例严重烧伤患者创面培养菌共 1 470 株, 分段进行分析总结, 报告如下。

临床资料: 1990 年 1 月~2000 年 1 月笔者单位共收治烧伤患者 3 386 例, 其中成人重度烧伤患者 341 例, 占总数的 10.07%。本组 341 例中, 男性 234 例, 占 68.7%; 男: 女为 2.5: 1。年龄分布以 20~40 岁多见。烧伤面积为 (33.4 ± 16.8)% TBSA。本组合并吸入性损伤者 19 例, 发生率为 5.5%, 其中轻度 11 例, 占 57.2%; 中度 5 例, 占 16.3%。发生不同程度休克者 48 例, 占 14.1%, 入院时已合并休克者 21 例, 占休克总数 43.8%。

细菌培养方法: 在换药和手术时, 用无菌棉拭子涂抹法采集创面分泌物, 放入无菌试管中密闭后立即送检, 作常规需氧、厌氧菌培养及菌种鉴定。创面及病情有变化时, 随时送检培养。另外, 一次培养有多种细菌及同一患者多次培养所得不同菌种均分别统计。本组患者进行创面培养获阳性结果 1 025 份, 共检出细菌 1 470 株。本组资料按每 5 年分组比较: 1990~1995 年为第 1 组, 1996~2000 年为第 2 组。所得数据用 SAS 统计软件处理。

结果: 两组中 G⁺ 菌总检出率高于 G⁻ 菌, 但差异无显著性意义 (P > 0.05)。在第 1 组中, 优势菌种依次为: 枸橼酸杆菌 (16.8%)、溶血性链球菌 (15.8%)、金黄色葡萄球菌 (14.9%); 第 2 组中依次为: 金黄色葡萄球菌 (38.2%)、枸橼酸杆菌 (16.2%)、铜绿假单胞菌 (7.2%), 两组细菌培养情况见表 1。

讨论 金黄色葡萄球菌检出率第 2 组明显高于第 1 组, 由第 1 组中的第 3 位跃居第 1 位。铜绿假单胞菌由第 10 位升至第 2 组中第 3 位。可能与以下原因有关: (1) 近年创面用磺胺嘧啶银造成细菌耐药; (2) 第 2 组中有 7 批重度烧伤患者, 住院时间相对集中, 加之消毒隔离制度不严, 患者之间经医护人员手 (经细菌培养, 和患者创面菌基本一致) 及病房器具、空气交叉感染机率增大; (3) 抗生素联合使用时间相对较长, 不合理用药次数及种类增加; (4) 第 1 组中单病例细菌培养次数较少, 尤其是病程长的患者仅做 1 次培养,

致检出率增高; (5) 可能与近年来高原地区气温逐渐升高, 更有利于铜绿假单胞菌生长、繁殖有关。

表 1 两组患者创面细胞培养情况

细菌种类	第 1 组		第 2 组		P 值 (两组比较)
	菌株数 (株)	%	菌株数 (株)	%	
乙型溶血型链球菌	84	15.8	29	3.1	<0.01
金黄色葡萄球菌	79	14.9	359	38.2	<0.01
表皮葡萄球菌	9	7.2	66	1.0	
肺炎双球菌	17	3.2	11	1.2	<0.01
丙型链球菌	11	2.1	8	0.9	<0.01
异型枸橼酸杆菌	89	16.8	152	16.2	
大肠杆菌	48	9.0	5.4	5.8	<0.05
奈瑟菌	31	5.8	64	6.8	
变形杆菌	16	3.0	18	1.9	
铜绿假单胞菌	11	2.1	68	7.2	<0.01
产碱杆菌	10	1.9	22	2.3	
克雷伯菌	0	0	18	1.9	<0.01
霉菌	34	6.4	14	1.5	<0.01
其他	52	9.8	56	6.0	
合计	531	100	939	100	

枸橼酸杆菌的检出率一直居高不下, 可能与以下原因有关: (1) 本组患者多经长途转送入院, 入院前已发生明显休克或隐性休克者较多, 患者机体免疫力严重下降; (2) 由于本地区周围环境中人、畜粪便及垃圾管理不善, 气候干燥, 风沙大, 患者在运送途中创面未经妥善保护而污染严重; (3) 院内交叉感染。

G⁻ 菌中肠杆菌逐年增高, 其他无显著差别。可能与以下原因有关: (1) 本地区优势菌种发生了变化; (2) 因经济条件改善, 部分患者使用了高档、有效抗生素联合短期抗感染, 减少了不合理用药次数和种类, 故上述菌种检出率下降。但是该类抗生素在本地区的使用仍较有限, 故部分杆菌又有所上升。

笔者医院地处青藏高原, 平均海拔 2 260 m 以上, 空气相对湿度 56.6%, 年平均气温 5.8℃。因此, 虽然检出率呈上升趋势, 但 G⁻ 肠杆菌和霉菌的总检出株数仍较少, 这与其他文献报道有很大差异。可能与本地区气候条件不利于这两种细菌生长、繁殖有关。提示: 在高原地区治疗重度烧伤感染中, 应重点防治金黄色葡萄球菌感染, 同时应注重铜绿假单胞菌、肠杆菌和其他 G⁻ 菌的防治, 积极治疗肠源性感染。在治疗中应严格无菌操作, 避免交叉感染。创面及全身用药应合理有效, 防止滥用抗生素。

(收稿日期: 2001-02-05)
 (本文编辑: 赵 云)

作者单位: 810008 西宁, 解放军第三二五医院烧伤整形科