

脓毒症时中性粒细胞胞外诱捕网的研究进展

宋明明 王旭 孙炳伟

脓毒症 (sepsis) 是由感染引起的全身炎症反应, 严重时可导致多器官功能衰竭、脓毒性休克, 甚至死亡^[1-6]。当前, 脓毒症的发病率和病死率仍然居高不下, 在美国, 脓毒症在危重患者致死因素中居首位, 每年有 75 万新增脓毒症患者, 而其中又有 21 万患者因脓毒症而死亡^[7]。脓毒症的发病机制十分复杂, 至今仍未完全阐明, 脓毒症早期, 感染部位招募大量中性粒细胞, 通过吞噬病原菌、脱颗粒释放蛋白酶等物质来达到杀菌的作用。此外, 中性粒细胞还具有另外一个特殊的效应机制, 即“中性粒细胞胞外诱捕网” (NETs), 使得中性粒细胞在胞外仍然具有有效的捕获及杀伤病原菌的能力, 从而对机体产生重要的保护作用。但是近年来的研究表明, 脓毒症时 NETs 的产生也可以导致病情加重。现对 NETs 的形成、结构、杀菌机制及其对脓毒症的作用进行系统阐述, 以进一步探讨脓毒症的发病机制, 为脓毒症的治疗提供新的思路和方向。

1 NETs 的形成

2004 年, Brinkmann 等^[8]首次报道了中性粒细胞特有的杀菌机制——NETs。NETs 的产生是中性粒细胞特殊的细胞死亡过程, 这种过程称作 NETosis^[9]。NETs 主要由成熟的中性粒细胞产生, 未成熟的中性粒细胞因为缺少了对刺激信号的反应能力而不能形成 NETs^[10]。研究表明, 革兰阴性菌、革兰阳性菌以及真菌等均可以引发中性粒细胞产生 NETs。脓毒症时, 在多种刺激物的作用下中性粒细胞活化, 通过还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶途径产生大量活性氧簇 (ROS), 进而启动 NETosis^[11]。中性粒细胞内嗜天青颗粒中储存的中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、髓过氧化物酶 (MPO) 转位至细胞核内, NE 降解接头蛋白 H1 及核心组蛋白 (histone), MPO 则对此过程具有促进作用^[12]。此外, 在精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 的作用下, 组蛋白 H3 精氨酸残基瓜氨酸化, 组蛋白 H3 构象改变。接着, 核膜破坏, 染色质扩展, 与中性粒细胞内颗粒状的抗菌因子结合, 随着细胞膜破裂后释放, 形成 NETs^[13-14]。

NETs 形成的分子机制尚不明确, 近年的研究发现, 丝氨酸 / 苏氨酸蛋白酶 / 丝裂素活化蛋白激酶激酶 / 细胞外信号调节激酶 (RAF/MEK/ERK) 信号通路通过活化 NADPH 氧化呼吸链蛋白酶 (NOX2) 和上调细胞凋亡蛋白来参与 NETs 的形成^[15-16]; 另外, 还有 Toll 样受体 4 (TLR4)^[17] 以及

哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR) 信号通路^[18] 参与了 NETosis 的调控。

2 NETs 的构成及杀菌机制

NETs 的基本骨架为脱氧核糖核酸 (DNA) 构成的纤维网, 电镜下观察发现, DNA 纤维网孔径为 25 ~ 50 nm 不等, 这使得 NETs 具有捕获病原微生物的能力^[8, 19]。质谱分析发现, 至少有 24 种中性粒细胞蛋白黏附在 DNA 纤维网上, 这些蛋白主要为阳离子杀菌蛋白, 包括组蛋白、防御素 (defensin)、NE、蛋白酶 3 (PR3)、肝素结合蛋白 (HBP)、组织蛋白酶 G、乳铁蛋白 (lactoferrin) 以及 MPO^[20-21]。此外, ROS、钙网蛋白 (galreticulins) 以及穿透素分子 3 (penetratin molecule 3) 也参与组成 NETs 的杀菌网络^[8, 19-20, 22]。

NETs 的杀菌机制主要是其能在局部形成高浓度的抗菌多肽以及 ROS^[23-24], 其中组蛋白发挥着重要的作用。NETs 通过对组蛋白的修饰作用增强其杀菌活性^[25], 而且组蛋白相比于一般的抗菌药物具有更强的杀菌作用^[26]。但在脓毒症时, 组蛋白既能发挥抗菌作用, 同时对细胞又具有一定毒性, 脓毒症模型小鼠循环血中的组蛋白增多是其死亡的重要原因^[27]。肝素作为一种抗凝剂, 在 NETs 中可以结合阳离子组蛋白, 通过降低血小板的凝血作用而发挥 NETs 的除菌作用^[25]。在 NETs 抗菌多肽中, NE 以及 PR3 可以通过清除细菌毒性因子抑制细菌的活动并杀灭细菌^[8, 28]。NETs 中乳铁蛋白可以消除真菌的菌丝而抑制真菌感染^[19], 且钙网蛋白也可以发挥重要的抗真菌作用^[29]。另外, NETs 还可以作为物理屏障来抵御细菌的扩散^[8]。但是, 随着细菌数量的增多, 细菌 DNA 酶可以降解 NETs 的 DNA 骨架, 减弱 NETs 捕获细菌的能力, 增强细菌对 NETs 的逃逸作用。研究发现, 金黄色葡萄球菌^[30]、肺炎链球菌^[31]、A 型溶血性链球菌^[32] 等细菌可通过 DNA 酶的作用减弱 NETs 捕获及杀菌能力, 从而增加细菌毒性。

3 脓毒症时 NETs 的作用

NETs 对病原微生物的清除能有效抑制脓毒症病情的发展。脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征 (SIRS), 其病理生理过程涉及到多种因素的参与, 尤其是各种病原微生物的作用^[33]。研究表明, NETs 可以捕获多种致病微生物, 包括革兰阳性菌、革兰阴性菌以及真菌、病毒、原核生物等^[31-32, 34-37]。McDonald 等^[38]通过盲肠结扎穿孔术 (CLP) 致脓毒症小鼠模型研究发现, 脓毒症时血管内 NETs 可以明显提高机体捕获血液中大肠杆菌的能力, 抑制细菌的扩散; 用 DNA 酶抑制脓毒症小鼠体内 NETs 的产生后, 血液中细菌的清除率明显降低^[38-39], 且用 DNA 酶处理的脓毒症小鼠比未用 DNA 酶处理的脓毒症小鼠生存率明显降低^[39]。Urban

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.016

基金项目: 国家自然科学基金 (81071546, 81272148); 江苏省自然科学基金 (BK2012703)

作者单位: 212001 江苏镇江, 江苏大学附属医院烧伤整形科

通讯作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com

等^[29]发现,脓毒症时 NETs 中的钙网蛋白具有重要的抗真菌(如白色念珠菌)作用,NETs 中乳铁蛋白可以消除真菌菌丝而抑制真菌感染;在体外实验中表明,缺失钙网蛋白的 NETs 抗真菌作用完全丧失^[21]。此外, Jenne 等^[40]还证实了 NETs 在肝微循环中的抵抗病毒作用。血小板的过度活化是脓毒症病情加重的重要原因^[41-42], Clark 等^[17]用脓毒症患者的血清刺激小鼠时发现,活化的血小板能通过 TLR4 信号通路促进小鼠肝和肺血管内的中性粒细胞快速形成 NETs,而且直接用脂多糖(LPS)刺激中性粒细胞发现,中性粒细胞不能有效地形成 NETs,可见脓毒症时血小板活化在 NETs 的产生中发挥着重要的作用。前文已述, PAD4 在 NETs 的形成中发挥着重要的作用, Li 等^[43]研究发现, PAD4 基因敲除的小鼠与 PAD4 基因未敲除的小鼠相比,在受到细菌感染后不能有效地形成 NETs,使细菌清除率明显降低,而这可能与 PAD4 基因敲除小鼠在受到细菌感染时组蛋白 H3 不能有效地瓜氨酸化有关。另外, Kambas 等^[44]研究发现,从脓毒症患者体内分离出的中性粒细胞可以通过自噬作用释放 NETs,且抑制中性粒细胞自噬作用后,中性粒细胞不能有效地产生 NETs。

尽管脓毒症时 NETs 的形成对于病原菌的清除发挥了重要的作用,但另一方面,NETs 的形成会对机体产生不利的影响。NETs 形成后中性粒细胞内大量的组蛋白及肝素释放入血,进一步增强了血小板的活化,使血小板的黏附、聚集及释放功能增强,导致血液处于高凝状态,促进了脓毒症时微循环内血栓的形成,进而影响重要器官血液供应,从而导致器官功能衰竭^[45]。从脓毒症患者体内分离出中性粒细胞产生的 NETs 可以释放组织因子(TF)^[46]。体外实验证实,脓毒症时 NETs 释放的 TF 可以诱导血栓的形成,通过影响凝血酶受体 1(PAR-1)引起凝血功能障碍和炎症反应^[44]。脓毒症时 NETs 杀灭细菌的同时释放 NE,造成血管内皮细胞损伤,加重了微循环障碍,导致器官缺血损伤^[39,47]。因此,脓毒症时 NETs 对于机体来说是一把“双刃剑”,NETs 的形成增加了机体固有免疫清除细菌的能力,但同时也造成了严重的机体损害。

此外,NETs 对脓毒症的早期诊断具有重要的价值。流行病学调查显示,重症加强治疗病房(ICU)的脓症患者血液中 NETs 水平比非脓症患者明显升高^[48]。严重创伤及化脓性关节炎患者体内可以检测到高水平的 NETs 来源的游离 DNA(cfDNA/NETs),而 cfDNA/NETs 的增加与患者的二次感染和严重脓毒症发生关系密切,这些均有益于脓毒症的早期诊断与治疗^[49]。另一项流行病学调查显示,脓毒症时血清中组蛋白 H3 水平对脓毒性休克的诊断以及脓毒症预后的评估具有重要价值^[27]。

4 NETs 与其他疾病

除脓毒症外,在临床其他疾病中 NETs 同样发挥着重要的作用,研究显示,NETs 对肿瘤、自身免疫性疾病、疟疾、皮肤利什曼病、子痫前期、获得性免疫缺陷综合征等疾病的发生发展均有一定调控作用^[35,50-55]。

5 展望

NETs 作为近年来发现的特殊的中性粒细胞杀菌机制,一方面对脓毒症时病原菌的清除具有重要作用,另一方面中性粒细胞形成 NETs 后释放组蛋白、组胺、NE 等炎症介质入血,加重了脓毒症时的炎症反应。因此,NETs 对脓毒症的发展是一把“双刃剑”,NETs 在脓毒症病理生理过程中的详细机制值得进一步探讨,其研究成果必将为临床脓毒症的治疗提供新的方向与思路。

参考文献

- [1] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(6):321-324.
- [2] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 [J]. N Engl J Med, 2003, 348(16):1546-1554.
- [3] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会,《中国中西医结合急救杂志》编辑委员会. 脓毒症中西医结合诊治专家共识[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(4):194-197.
- [4] 陈兆永,邵宁正,孙炳伟. 一氧化氮干预——脓毒症治疗的新进展[J]. 江苏大学学报(医学版),2006,16(1):78-81.
- [5] 张锦丽,秦魏婷,吕汪涸,等. 苦柯胺 B 对脓毒症小鼠肺脏炎症反应的抑制作用[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(7):493-497.
- [6] 王洪霞,何新懿,宋诗铎. 蛋白 C 基因 -1654C/T 和 -1641A/G 位点多态性与严重脓毒症的关系研究[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(8):463-466.
- [7] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. N Engl J Med, 2003, 348(2):138-150.
- [8] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science, 2004, 303(5663):1532-1535.
- [9] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps [J]. J Cell Biol, 2007, 176(2):231-241.
- [10] Yost CC, Cody MJ, Harris ES, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates [J]. Blood, 2009, 113(25):6419-6427.
- [11] Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(4):513-530.
- [12] Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps [J]. J Cell Biol, 2010, 191(3):677-691.
- [13] Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation [J]. Science, 2004, 306(5694):279-283.
- [14] 周剑涛,丁海峰,姚振国. PAD4 参与中性粒细胞胞外诱捕网的抗菌作用[J]. 生命的化学,2012,32(1):44-46.
- [15] Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(2):75-77.
- [16] 梁雅. 细菌感染刺激中性粒细胞产生胞外杀菌网络的研究[J]. 科技信息,2011,31(18):193.
- [17] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood [J]. Nat Med, 2007, 13(4):463-469.
- [18] Itakura A, McCarty OJ. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 305(3):C348-354.
- [19] Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons [J]. Trends Immunol, 2009, 30(11):513-521.
- [20] Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes [J]. Immunity, 2010, 33(5):657-670.

- [21] Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (10): e1000639.
- [22] Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6 (3): 173-182.
- [23] Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (8): 1777-1783.
- [24] Camicia G, Pozner R, de Larrañaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis [J]. *Shock*, 2014, 42 (4): 286-294.
- [25] Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction [J]. *Blood Rev*, 2012, 26 (6): 255-259.
- [26] Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (2): e32366.
- [27] Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis [J]. *Nat Med*, 2009, 15 (11): 1318-1321.
- [28] Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD, et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria [J]. *Nature*, 2002, 417 (6884): 91-94.
- [29] Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8 (4): 668-676.
- [30] Berends ET, Horswill AR, Haste NM, et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2 (6): 576-586.
- [31] Beiter K, Wartha F, Albiger B, et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps [J]. *Curr Biol*, 2006, 16 (4): 401-407.
- [32] Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps [J]. *Curr Biol*, 2006, 16 (4): 396-400.
- [33] Sun BW, Jin Q, Sun Y, et al. Carbon liberated from CO-releasing molecules attenuates leukocyte infiltration in the small intestine of thermally injured mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (46): 6183-6190.
- [34] Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5 (8): 577-582.
- [35] Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (16): 6748-6753.
- [36] Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009, 89 (1): 29-37.
- [37] Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1 [J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12 (1): 109-116.
- [38] McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis [J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12 (3): 324-333.
- [39] Meng W, Paunel-Görgülü A, Flöhé S, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice [J]. *Crit Care*, 2012, 16 (4): R137.
- [40] Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13 (2): 169-180.
- [41] 庄明峰, 刘大东, 孙炳伟. 脓毒症时糖原合酶激酶3相关作用的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (7): 519-521.
- [42] 高艳霞, 李莉, 李毅, 等. 血小板参数在感染性休克患者中的变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (1): 28-32.
- [43] Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps [J]. *J Exp Med*, 2010, 207 (9): 1853-1862.
- [44] Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e45427.
- [45] Ammolto CT, Semeraro F, Xu J, et al. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (9): 1795-1803.
- [46] Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis—the journey of TF through NETs [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 385.
- [47] Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol*, 2011, 187 (1): 538-552.
- [48] Margraf S, Lögters T, Reipen J, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis [J]. *Shock*, 2008, 30 (4): 352-358.
- [49] Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis [J]. *J Orthop Res*, 2009, 27 (11): 1401-1407.
- [50] Arazna M, Pruchniak MP, Zycinska K, et al. Neutrophil extracellular trap in human diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 756: 1-8.
- [51] von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87 (8): 775-783.
- [52] Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16 (11): 1438-1444.
- [53] Jenne CN, Kubes P. NETs tangle with HIV [J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12 (1): 5-7.
- [54] Ito T, Igarashi H, Jensen RT. Serum pancreastatin: the long sought universal, sensitive, specific tumor marker for neuroendocrine tumors? [J]. *Pancreas*, 2012, 41 (4): 505-507.
- [55] Hahn S, Giaglis S, Hoesli I, et al. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 362.

(收稿日期: 2014-10-15) (本文编辑: 李银平)