中华危重病急救医学 2017 年 3 月第 29 卷第 3 期 Chin Crit Care Med, March 2017, Vol.29, No.3

· 论著 ·

百草枯体外诱导人外周血中性粒细胞胞外诱捕网形成的实验研究

金卫 陆健 谢晖 蒋逸群 孟潇潇 朱勇 王瑞兰

200080 上海,南京医科大学附属上海一院临床医学院危重病科

通讯作者:王瑞兰,Email:wangyusun@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.005

【摘要】 目的 探讨百草枯(PQ)能否诱导人外周血中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的形成。**方法** 分离健康者外周血中性粒细胞,苏木素-伊红(HE)染色后进行细胞鉴定;分别采用浓度为 0(对照)、200、400、600、800、1 000、1 200 μmol/L 的 PQ 溶液处理细胞,建立 PQ 中毒的体外模型,应用 CCK-8 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒检测细胞存活率,选择半数致死量的 PQ 浓度作为实验干预点。根据细胞活性检测结果进行细胞染毒(PQ 染毒组),以未染毒细胞作为对照。采用免疫荧光染色显微成像定性鉴定 NETs 形成情况;采用 PicoGreen 核酸定量分析试剂盒检测细胞上清中游离 DNA 含量;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞上清中瓜氨酸化组蛋白 3(H3Cit)、髓过氧化物酶(MPO)的蛋白表达。**结果** HE 染色鉴定中性粒细胞纯度约 95%;经不同浓度 PQ 建立中毒体外模型后发现,PQ 浓度为 800 μmol/L 时细胞存活率为(58±2)%,以该半数致死量作为实验干预点。免疫荧光定性观察显示,对照组中性粒细胞仅有少量 H3Cit 及 MPO 表达,无 NETs 形成;而 800 μmol/L PQ 可以刺激中性粒细胞产生由 DNA、H3Cit 和 MPO 形成的 NETs。定量结果显示,与对照组比较,PQ 染毒组细胞上清中游离 DNA 含量显著升高(μg/L:2 235±462 比 561±87,$P<0.01$);且 PQ 染毒组细胞上清中 H3Cit 和 MPO 蛋白表达量均较对照组明显升高〔H3Cit 蛋白表达(灰度值):0.23±0.03 比 0.11±0.01,MPO 蛋白表达(灰度值):0.47±0.05 比 0.21±0.04,均 $P<0.05$〕。**结论** 800 μmol/L 的 PQ 可以诱导人外周血中性粒细胞形成 NETs。

【关键词】 百草枯; 中性粒细胞胞外诱捕网; 游离 DNA; 中毒

基金项目:国家自然科学基金(81272071);上海市自然科学基金(14ZR1433700)

Experimental study on formation of neutrophil extracellular traps in human peripheral blood induced by paraquat *in vitro*

Jin Wei, Lu Jian, Xie Hui, Jiang Yiqun, Meng Xiaoxiao, Zhu Yong, Wang Ruilan

Department of Critical Care Medicine, Shanghai General Hospital of Nanjing Medical University, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Wang Ruilan, Email: wangyusun@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore whether paraquat (PQ) can induce the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human peripheral blood. **Methods** Neutrophils were isolated from healthy human peripheral blood, and the cells were identified by hematoxylin-eosin (HE) strain. The cells were treated with different concentrations of PQ [0 (as control), 200, 400, 600, 800, 1 000 and 1 200 μmol/L], and the cell viability was measured by cell proliferation and CCK-8 cytotoxicity detection kit, and the median lethal concentration of PQ was selected. The cells were treated with the median lethal concentration of PQ (PQ poisoning group), and the untreated cells were served as the control. Immunofluorescence staining was adopted to evaluate NETs formation. PicoGreen dye was used to determine the quantitative content of circulating free DNA. Western Blot was used to determine the expressions of citrullinated histone 3 (H3Cit) and myeloperoxidase (MPO) in the supernatant. **Results** The purity of neutrophils was about 95% by HE staining. The cells were treated with different concentrations of PQ, and the result showed that the viability of cells was (58±2)% with 800 μmol/L PQ for treatment. The immunofluorescence showed that there were few expressions of H3Cit and MPO in neutrophils in the control group, and there was no NETs formation, which was composed of DNA, H3Cit and MPO. Compared with the control group, a large amount of NETs was generated from neutrophils stimulated by 800 μmol/L of PQ. Meanwhile, quantitative result showed that the content of cell free DNA in the supernatant was significantly increased in PQ poisoning group as compared with that of control group (μg/L: 2 235±462 vs. 561±87, $P<0.01$). The protein expressions of H3Cit and MPO in the supernatant were also significantly increased as compared with those of control group [H3Cit protein expression (gray value): 0.23±0.03 vs. 0.11±0.01, MPO protein expression (gray value): 0.47±0.05 vs. 0.21±0.04, both $P<0.05$]. **Conclusion** 800 μmol/L of PQ can induce the formation of NETs in human peripheral blood.

【Key words】 Paraquat; Neutrophil extracellular trap; Free DNA; Poisoning

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81272071); Shanghai Municipal Natural Science Foundation of China (14ZR1433700)

阻止百草枯(PQ)中毒早期急性肺损伤(ALI)的发生是降低患者病死率的关键[1]。目前 PQ 中毒的机制仍未完全阐明。相关文献报道,PQ 中毒后 24 h 内白细胞计数(WBC)越高,预示患者 72 h 内死亡概率越大,提示中性粒细胞增加与患者病死率密切相关[2-4]。我们在临床中也发现,PQ 中毒患者早期外周循环中的中性粒细胞明显增加,因此推测中性粒细胞在 PQ 致 ALI 中发挥了重要作用,但其机制尚需进一步探讨。

中性粒细胞是机体天然免疫系统主要效应器细胞。病原体入侵时,中性粒细胞被迅速趋化募集到感染部位,清除和杀伤病原体。Brinkmann 等[5]于 2004 年发现中性粒细胞可在胞外形成由核酸物质和颗粒蛋白组成的网状结构,即胞外诱捕网(NETs),从而捕杀病原体。虽然 NETs 具有重要的防御作用,但如不能被有效清除和调控则会加重宿主的组织炎症,尤其是细胞外的组蛋白、髓过氧化物酶(MPO)能直接引起上皮细胞和内皮细胞死亡。NETs 与许多疾病的病理过程有关,包括肺部疾病,研究表明在 ALI 或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),以及肺部的细菌、病毒、真菌感染中都发现了 NETs[6-7]。本研究通过定性和定量检测体外 PQ 是否可以诱导 NETs 的形成,以期为 PQ 致 ALI 的治疗提供新的理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂:人外周血中性粒细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);抗瓜氨酸化组蛋白 3(H3Cit)抗体、抗 MPO 抗体(美国 Abcam 公司),羊抗兔、羊抗鼠二抗(上海 Biomart 公司),PicoGreen 核酸定量分析试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。人外周血标本取自南京医科大学附属上海一院健康体检志愿者,无感染、外伤等,无心、肺、肾功能不全,乙肝表面抗原阴性,且均获得知情同意。

1.2 中性粒细胞分离:按照人外周血中性粒细胞分离液说明书,采用密度梯度离心法分离中性粒细胞。取 3 mL 试剂 A,加入 2 mL 试剂 B,制成梯度界面;于分离液液面上加入 4 mL 抗凝血,500×g 离心 30 min;吸取下层白色中性粒细胞于离心管中,加入 5 mL 清洗液,250×g 离心 10 min,弃上清,重复 1 次。最后用 0.5 mL 培养基重悬细胞后计数。

1.3 中性粒细胞的鉴定:将多聚赖氨酸处理的无菌玻片置于 6 孔板中,按 5×10^5/L 接种细胞,于培养箱中静置 1 h 后,95% 乙醇固定 20 min,苏木素 – 伊红(HE)染色,显微镜下进行细胞鉴定。

1.4 细胞活性的测定:采用快速高灵敏度 CCK-8 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒检测不同浓度 PQ 处理后的细胞存活率,选择半数致死量的 PQ 浓度作为实验干预点。将细胞以 5×10^5/L 接种于 96 孔板中,置于培养箱中培养 1 h 后,分别用含有浓度为 0(对照)、200、400、600、800、1 000、1 200 μmol/L PQ 的培养基处理细胞,每组设 3 个复孔;置于培养箱孵育 24 h 后,每孔加入 20 μL CCK-8 试剂混匀后,于培养箱继续孵育 1 h。用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度(A)值,并计算细胞存活率(实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值 ×100%)。

1.5 实验分组:将细胞分为两组,根据细胞活性检测结果确定 PQ 干预浓度为 800 μmol/L 并进行细胞染毒(染毒组),以未染毒细胞作为对照。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 体外诱导中性粒细胞形成 NETs:将多聚赖氨酸处理的无菌玻片置于 6 孔板中,按 5×10^5/L 接种细胞,培养箱中静置 1 h 后,加入 800 μmol/L 的 PQ 溶液处理细胞 2 h,收集细胞上清用于游离 DNA 检测,然后向 6 孔板中加入 1 mL 多聚甲醛,4 ℃固定过夜。

1.6.2 NETs 的免疫荧光染色:取出细胞爬片,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,固定液室温固定 0.5 h,封闭液室温封闭 0.5 h,加入一抗(抗 H3Cit 抗体为 1∶200,抗 MPO 抗体为 1∶2 000),4 ℃孵育过夜;PBS 冲洗 3 次,加入荧光二抗,37 ℃湿盒孵育 1 h;PBS 冲洗 3 次,4',6– 二脒基 –2– 苯基吲哚(DAPI)染色 5 min;PBS 冲洗 3 次后封片;荧光显微镜下观察、拍照。DNA 表达呈蓝色荧光,H3Cit 表达呈绿色荧光,MPO 表达呈红色荧光。

1.6.3 游离 DNA 检测:采用 PicoGreen 核酸定量分析试剂盒检测细胞上清中游离 DNA 含量。取 50 μL 细胞上清加入 96 孔板中,每组设 3 个复孔,同时设立标准品,浓度依次为 1 000、100、25、10、2.5、1、0.25、0 ng/mL,室温避光孵育 5 min。采用荧光酶标仪检测荧光强度,激发光 480 nm,发射光 520 nm。根据标准品及测得 A 值建立标准曲线,计算细胞上清中游离 DNA 含量。

1.6.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞上清中 MPO、H3Cit 蛋白表达:收集细胞上清,与 5× 上样缓冲液按照 4∶1 比例混匀,100 ℃加热

5 min。每个加样孔加入 20 μL 样品，经 8% 十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）后，恒流（300 mA）冰上转膜 1 h，加 5% 牛奶－磷酸盐吐温缓冲液（PBST）封闭 1 h，加一抗（抗 MPO 抗体为 1∶1 000，抗 H3Cit 抗体为 1∶200）4 ℃摇床孵育过夜；PBST 洗膜 3 次 ×10 min，加二抗常温孵育 2 h（1∶1 000）；PBST 洗膜 3 次 ×10 min，电化学发光（ECL）显影。应用 Image J 软件测定平均灰度值，以目的蛋白与相应内参的灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.7 统计学处理：应用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析，采用 Kolmogorov-Smirnov 法对计量资料进行正态性检验，符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐时采用 LSD 法检验，方差不齐时采用 Tamhane *T2* 法检验；$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 人外周血中性粒细胞的鉴定（图 1）：HE 染色后，显微镜下观察细胞形态，可见细胞核为分叶核，中性粒细胞纯度达到 95%。

2.2 人外周血中性粒细胞活性（图 2）：分别用浓度为 0（对照）、200、400、600、800、1 000、1 200 μmol/L 的 PQ 溶液处理后，人外周血中性粒细胞存活率呈剂量依赖性降低，400～1 200 μmol/L PQ 处理后细胞存活率显著低于 0 μmol/L（均 $P<0.05$）；其中 PQ 浓度为 800 μmol/L 时细胞存活率为（58±2）%，因此选用该半数致死量作为实验干预点。

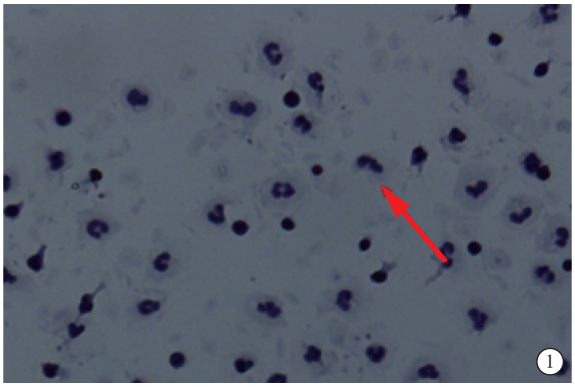
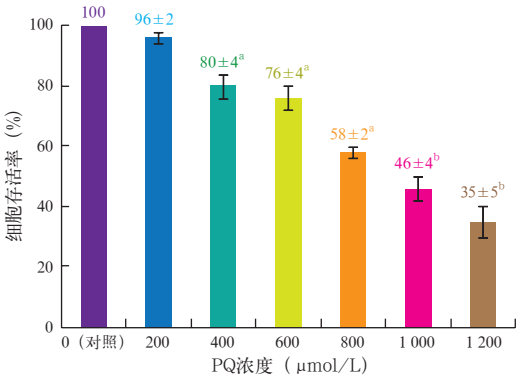


图 1 显微镜下观察人外周血中性粒细胞形态，可见细胞核为分叶核（箭头所示） HE 中倍放大



注：PQ 为百草枯；与 0 μmol/L（对照）比较，$^aP<0.05$，$^bP<0.01$

图 2 不同浓度 PQ 对人外周血中性粒细胞存活率的影响

2.3 人外周血中性粒细胞 NETs 的鉴定（图 3）：免疫荧光显微镜下观察细胞形态学变化，结果显示，对照组中性粒细胞仅有少量 H3Cit 及 MPO 表达，无 NETs 形成；而 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后，中性粒细胞 H3Cit 及 MPO 表达明显增强可产生由 DNA、H3Cit 及 MPO 形成的 NETs。

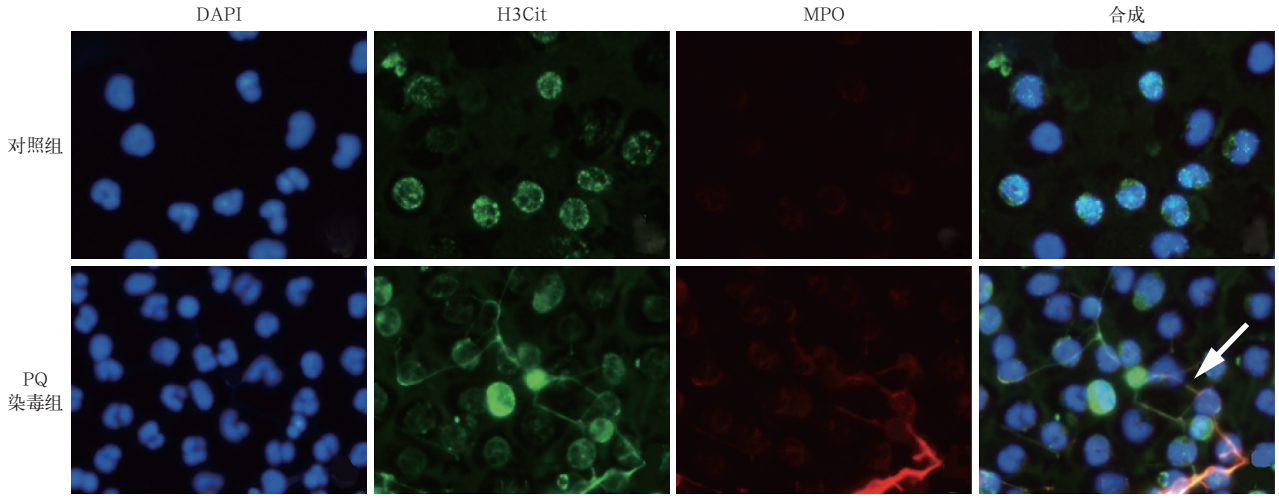
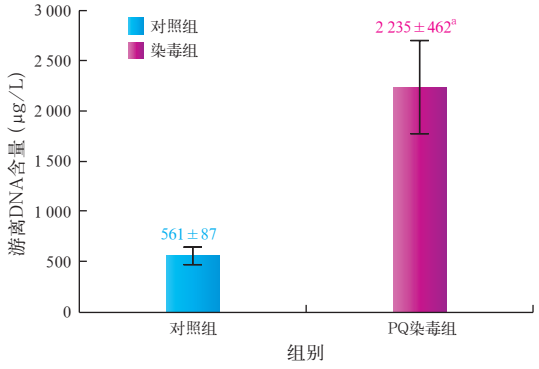


图 3 免疫荧光显微镜下观察人外周血中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）的形成情况 DNA 表达呈蓝色荧光，瓜氨酸化组蛋白 3（H3Cit）表达呈绿色荧光，髓过氧化物酶（MPO）表达呈红色荧光。对照组中性粒细胞仅有少量 H3Cit 及 MPO 表达，无 NETs 形成；百草枯（PQ）染毒组经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后，中性粒细胞 H3Cit 及 MPO 荧光强度明显增强，可见细胞外纤维网状结构形成，即 NETs（箭头所示）免疫荧光 低倍放大

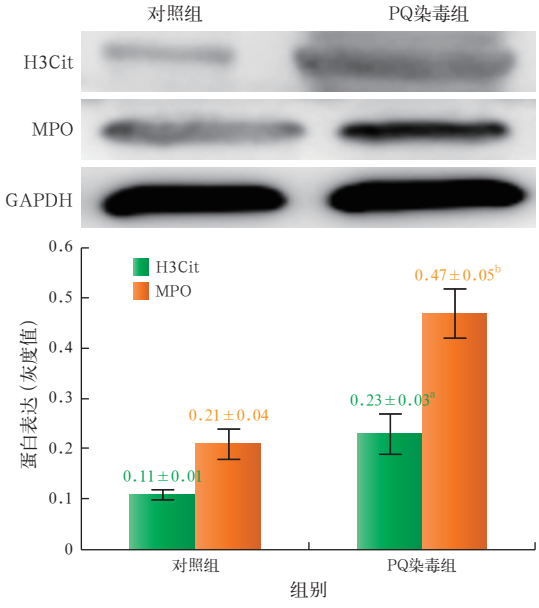
2.4 人外周血中性粒细胞 NETs 含量（图 4）：人外周血中性粒细胞经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后，细胞上清中游离 DNA 含量显著增高，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。



注：PQ 为百草枯；与对照组比较，$^aP<0.01$

图 4 人外周血中性粒细胞经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后细胞上清中游离 DNA 含量的变化

2.5 人外周血中性粒细胞 MPO、H3Cit 表达（图 5）：人外周血中性粒细胞经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后，细胞上清中 MPO 及 H3Cit 表达量明显高于对照组（均 $P<0.05$）。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验，PQ 为百草枯，MPO 为髓过氧化物酶，H3Cit 为瓜氨酸化组蛋白 3，GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶；与对照组比较，$^aP<0.01$，$^bP<0.05$

图 5 Western Blot 检测人外周血中性粒细胞经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后细胞上清中 MPO 及 H3Cit 表达的变化

3 讨 论

大量炎性物质释放是急性 PQ 中毒致肺损伤的一个重要因素[8-9]。研究表明，在 PQ 中毒早期，肺间质和肺泡腔内有中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸粒细胞等大量炎性细胞浸润，可引起Ⅰ型、Ⅱ型肺泡上皮细胞和 Clara 细胞等的破坏，导致 ALI[10]。本课题组前期研究也证实：PQ 染毒 2 h 后，大鼠肺组织中出现炎性细胞浸润、肺泡壁断裂等肺损伤表现[11]。黄杨等[12]发现，PQ 组大鼠血浆肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素（IL-1β、IL-6、IL-8 和 IL-10）等炎性因子含量在染毒早期即显著增高，且呈时间依赖性。中性粒细胞在组织中大量聚集会造成组织损伤，且中性粒细胞数量与肺损伤严重程度呈正相关[13-14]。因此我们推测，中性粒细胞增加在 PQ 致 ALI 中发挥了重要作用，但其机制尚需进一步研究。

之前研究者大多认为，中性粒细胞是通过脱颗粒释放的颗粒酶成分以及“呼吸爆发”作用损伤肺血管内皮细胞及上皮细胞，进而导致肺泡通透性增加，引起肺水肿。2004 年 Brinkmann 等[5]发现，中性粒细胞可以释放到胞外，形成含有 DNA、组蛋白、MPO、弹性蛋白酶（NE）、组织蛋白酶 G 的网状结构，即 NETs。但近年来研究发现，NETs 除具有防御病原体入侵的作用外，在组织内含量增加也能够造成组织损伤[15]。同样，NETs 结构中的高浓度组蛋白、MPO 等能加重组织损伤[16]。Fuchs 等[17]也证实过量的 NETs 会对机体造成不良后果，引起内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤，且呈剂量依赖性，应用组蛋白抗体、MPO 抑制剂可明显抑制其对细胞的毒性作用。因此我们推测，在 PQ 中毒时中性粒细胞可能通过产生大量的 NETs 引起 ALI。

为了验证 PQ 是否可以诱导中性粒细胞产生 NETs，我们采用密度梯度离心法提取中性粒细胞，建立体外 PQ 染毒模型，并对 DNA、H3Cit 和 MPO 进行免疫荧光染色，免疫荧光显微镜下观察证实，经 800 μmol/L PQ 处理 2 h 后中性粒细胞可形成 NETs 结构。Margraf 等[18]建立了血浆 cf-DNA/NETs 快速定量检测方法，即 PicoGreen 核酸定量分析法。PicoGreen 能特异性结合 dsDNA，在波长 480 nm 处检测荧光强度，基本不受 RNA 和单链 DNA 的影响，可快速分析 cf-DNA/NETs 最低浓度为 25 μg/L 的血样[19]。该方法对中性粒细胞具有特异性，而刺激其他血细胞不会引起 NETs 形成或荧光信号强度增强。因此我们采用 PicoGreen 法检测 cf-DNA 水平来评价 cf-DNA/NETs 含量，发现 800 μmol/L PQ 刺激中性粒细胞 2 h 后细胞上清中游离 DNA 含量显著升高。本实验还显示，经 800 μmol/L PQ 刺激 2 h 后，中性粒细胞上清中 MPO、H3Cit 蛋白表达较对照组

明显上调，提示 PQ 可以体外刺激中性粒细胞产生 NETs。

综上所述，中性粒细胞可能通过形成大量 NETs 在 PQ 致 ALI 中发挥重要作用，但其分子机制尚需进一步研究，为寻找以中性粒细胞为靶点的 PQ 中毒治疗措施提供理论和实验依据。

参考文献

[1] Lin JL, Lin-Tan DT, Chen KH, et al. Improved survival in severe paraquat poisoning with repeated pulse therapy of cyclophosphamide and steroids [J]. Intensive Care Med, 2011, 37 (6): 1006-1013. DOI: 10.1007/s00134-010-2127-7.

[2] 焦峰军，祝文，王涛宁，等. 急性百草枯中毒患者预后危险因素分析 [J]. 中华危重病急救医学，2015, 27 (11): 906-910. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.008.
Jiao FJ, Zhu W, Wang TN, et al. Analysis of risk factors for prognosis of patients with acute paraquat intoxication [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (11): 906-910. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.008.

[3] 才权，刘志. 急性百草枯中毒早期死亡相关因素分析 [J]. 中华危重病急救医学，2014, 26 (6): 379-382. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.06.003.
Cai Q, Liu Z. An analysis of relevant factors of early death in acute paraquat poisoning [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (6): 379-382. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.06.003.

[4] 张翠萍，王胜武，李丽. 白细胞及中性粒细胞对百草枯中毒患者预后的意义 [J]. 中国医药，2012, 7 (9): 1173-1175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4777.2012.09.051.
Zhang CP, Wang SW, Li L. Significance of leukocyte and neutrophil in paraquat poisoning [J]. China Med, 2012, 7 (9): 1173-1175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4777.2012.09.051.

[5] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science, 2004, 303 (5663): 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385.

[6] 夏杰，王蓉，周剑涛. 中性粒细胞胞外诱捕网与急性肺损伤 [J]. 生命的化学，2015, 35 (2): 239-242.
Xia J, Wang R, Zhou JT. Neutrophil extracellular traps and acute lung injury [J]. Chem Life, 2015, 35 (2): 239-242.

[7] Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases [J]. Front Immunol, 2013, 4: 1. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00001.

[8] 陈贵洪，刘世平，曹小平，等. 地塞米松联合葛根素治疗急性百草枯中毒大鼠的实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2016, 23 (5): 499-503. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.05.013.
Chen GH, Liu SP, Cao XP, et al. An experimental study on dexamethasone combined with puerarin in treatment of acute paraquat-poisoned rats [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (5): 499-503. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.05.013.

[9] 吴优，刘虹，丁颖威，等. 抗氧化基因核因子 E2 相关因子 2 对百草枯中毒肺损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2016, 23 (1): 36-41. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.010.
Wu Y, Liu H, Ding YW, et al. The protective effect of anti-oxidant gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on paraquat induced lung injury in mice [J].Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (1): 36-41. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.010.

[10] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment [J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38 (1): 13-71. DOI: 10.1080/10408440701669959.

[11] Xie H, Wang R, Tang X, et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis starts at an early stage of inflammation in rats [J]. Immunotherapy, 2012, 4 (12): 1809-1815. DOI: 10.2217/imt.12.122.

[12] 黄杨，张秀敏，尹文，等. 百草枯中毒急性肺损伤细胞因子变化和干细胞的干预 [J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志，2012, 7 (1): 49-52. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6966.2012.01.017.
Huang Y, Zhang XM, Yin W, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on changes of cytokines in acute paraquat poisoned rats [J]. China J Emerg Resusc Disaster Med, 2012, 7 (1): 49-52. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6966.2012.01.017.

[13] Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, et al. Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS [J]. Chest, 2004, 125 (1): 212-219.

[14] Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury [J]. Mol Med, 2011, 17 (3-4): 293-307. DOI: 10.2119/molmed.2010.00138.

[15] Saffarzadeh M, Preissner KT. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection [J]. Curr Opin Hematol, 2013, 20 (1): 3-9. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32835a0025.

[16] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366.

[17] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (36): 15880-15885. DOI: 10.1073/pnas.1005743107.

[18] 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. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31816a6bb1.

[19] Bruijns BB, Tiggelaar RM, Gardeniers JG. Fluorescent cyanine dyes for the quantification of low amounts of dsDNA [J]. Anal Biochem, 2016, 511: 74-79. DOI: 10.1016/j.ab.2016.07.022.

（收稿日期：2016-10-25）

· 科研新闻速递 ·

体外膜肺氧合治疗成人脓毒症和呼吸衰竭患者的长期生存情况

体外膜肺氧合（ECMO）治疗在呼吸衰竭合并脓毒症成人患者中的应用正在稳步增加，但有关应用 ECMO 治疗这类患者的长期生存情况的研究资料很少。近期有瑞典学者进行了一项单中心回顾性队列研究，旨在调查接受 ECMO 治疗的呼吸衰竭合并脓毒症患者的 5 年存活率和晚期死亡原因。该研究纳入 255 例自 1995 年至 2013 年 12 月接受 ECMO 治疗的成人呼吸衰竭和脓毒症患者。从国家死亡登记系统收集患者的生存状态、基本背景及生存和死亡原因的数据资料。用 Kaplan-Meier 法计算存活率。结果显示：在 255 例患者中，64% 患者存活出院；中位随访时间为 4.4 年；出院后 1 个月内病死率很高。在治疗 90 d 后存活的患者中，其 5 年存活率为 87%，以感染性疾病患者存活率较高（88%～100%）。部分呼吸衰竭合并脓毒症患者存在晚期死亡，但 Kaplan-Meier 曲线随着时间的推移逐步平坦。该研究者得出结论：对于合并呼吸衰竭和脓毒症的患者，ECMO 治疗可达到挽救生命的目的。对于 ECMO 治疗后几个月内存活的患者，其长期生存情况较好，特别是感染患者。

喻文，罗红敏，编译自《Crit Care Med》，2017，45（2）：164-170