

DOI: 10.13376/j.cbls/2019027

文章编号: 1004-0374(2019)02-0185-05

## 中性粒细胞胞外诱捕网在脓毒症中的研究进展

汪雯心, 万敬员\*, 唐 艺

(重庆医科大学, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

**摘 要:** 脓毒症是重症监护病房中导致患者死亡的主要原因, 它的发病机制至今尚未完全阐明, 目前认为主要和病原微生物的清除、炎症反应、凝血功能等有关。中性粒细胞在固有免疫反应中发挥着重要的作用, 是机体防御病原体的第一道防线, 它可以通过吞噬、脱颗粒来抵抗病原微生物; 此外, 它还可以通过形成中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)来捕获和杀灭病原体。NETs是由DNA骨架、组蛋白、颗粒成分以及胞浆蛋白组成的网状物。尽管已经有研究发现, NETs在脓毒症的发病过程中起到了对机体的保护作用, 但也有证据表明, 脓毒症时NETs的产生使得病情加重。现将就NETs的研究进展及其在脓毒症发病过程中的作用进行总结。

**关键词:** 中性粒细胞胞外诱捕网; 脓毒症; 功能作用

**中图分类号:** R63      **文献标志码:** A

## The role of neutrophil extracellular traps in sepsis

WANG Wen-Xin, WAN Jing-Yuan\*, TANG Yi

(Chongqing Key Lab of Biochemistry and Molecular Pharmacology,  
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Sepsis is a leading course of death in critically ill patients in intensive care units. The pathogenesis of sepsis has not yet been fully elucidated, which is considered to be related to pathogen removal, inflammatory response, blood coagulation and so on. Neutrophils play an essential role in the innate immune response, providing the first line of defense in protecting the body from infection. They can resist pathogenic microorganisms by phagocytosis and degranulation. In addition, it has recently been shown that these cells can trap and kill microorganisms by releasing neutrophil extracellular traps (NETs) composed of DNA, histones, granular components and some cytoplasmic proteins. Although the beneficial role of NETs during sepsis has been demonstrated, there is increasing evidence that NETs contribute to sepsis. Therefore, this article aimed to review the current research progress of NETs and their role in the pathogenesis of sepsis.

**Key words:** neutrophil extracellular traps; sepsis; function

脓毒症作为临床危急症患者的严重并发症之一, 常由严重创伤、烧伤、大手术、感染等因素所诱发, 它可导致脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)等。据统计, 全球每年脓毒症患者达数百万, 且死亡率超过25%, 仍是重症监护病房中导致患者死亡的主要原因<sup>[1-3]</sup>。脓毒症的发病机制十分复杂, 至今仍未完全阐明, 目前认为与病原微生物的清除障碍、炎症反应平衡失调、免疫功能紊乱、凝血功能障碍、

自噬、氧化应激等多种因素相关<sup>[4]</sup>。根据最新的脓毒症3.0定义, 脓毒症是机体对感染反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍<sup>[5]</sup>。机体对脓毒症的防御反应可分为两个阶段: 早期主要为过度免疫炎

收稿日期: 2018-09-22; 修回日期: 2018-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774124, 8137-3870)

\*通信作者: E-mail: jywan@cqmu.edu.cn

症期,当机体不能将感染限制于局部,先天性免疫系统被激活,固有免疫细胞过度活化,大量的炎症介质短时间内失控性爆发,称为“炎症介质瀑布”;晚期则是持续的免疫抑制期,早期的高炎症反应造成免疫细胞功能损害、过度凋亡、生存周期缩短,严重抑制了免疫细胞的功能<sup>[6]</sup>。中性粒细胞作为机体防御系统中的关键免疫细胞之一,占白细胞总数的50%~70%<sup>[7]</sup>。前期研究显示,在脓毒症患者发生的免疫防御反应中,中性粒细胞也有着重要的地位。脓毒症早期,感染部位招募大量的中性粒细胞,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<sup>[8]</sup>;晚期,中性粒细胞过度的耗竭又可导致免疫抑制,机体自身防御能力减弱。最新的研究表明,中性粒细胞还具有一种特殊的效应机制——中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),它是由中性粒细胞释放到胞外的含有DNA、组蛋白、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等的网状物<sup>[9]</sup>,它与脓毒症的发生发展密切相关<sup>[10]</sup>。本文就NETs的形成、诱导因素、功能进行系统阐述,以进一步探讨它在脓毒症发生发展过程中的影响及作用。

## 1 NETs的形成与构成

NETs主要由成熟的中性粒细胞产生,未成熟的中性粒细胞由于缺乏对刺激信号的反应能力而不能形成NETs。除了中性粒细胞能形成胞外诱捕网,巨噬细胞也可以通过增加细胞内活性氧的形成和组蛋白的瓜氨酸化来形成巨噬细胞胞外诱捕网(macrophage extracellular traps, METs)<sup>[11]</sup>。现有研究表明,NETs可由多种因素诱导形成,如微生物病原体及其产物,包括细菌、真菌、病毒及细菌内毒素等;一些化学物质,如佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)也可诱导NETs的形成;一些细胞因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-8、干扰素等也可诱导NETs<sup>[12]</sup>;此外,抗原抗体复合物、血小板、P选择素和自噬小体等也被证明是NETs的诱导剂<sup>[6,13-15]</sup>。目前认为,NETs的形成主要是通过NADPH氧化酶(NOX)依赖性和NOX非依赖性两条通路<sup>[16]</sup>。前者主要是通过NOX促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,NOX在细胞膜和吞噬体膜表面合成,通过从NADPH转移电子到分子氧生成超氧阴离子,超氧化物歧化为过氧化氢后又进一步作为MPO的底物生成次卤酸,ROS可以氧化各种类型

的分子,包括核酸、脂质和蛋白质等进而引发一系列爆发性细胞死亡事件;此外,该条通路还需要NE、MPO由颗粒向核的迁移。NE能降解组蛋白H1,随后肽酰基精氨酸脱亚氨酶4(PAD4)催化组蛋白H3瓜氨酸化,MPO能加快染色体的解聚,细胞膜最终破裂,随后排至细胞外形成网格样结构,形成NETs,如中性粒细胞暴露于PMA或脂多糖(LPS)后就是通过此途径形成NETs<sup>[17]</sup>。研究表明,NETs的形成是中性粒细胞一种不同于细胞坏死和凋亡的新型的细胞死亡方式,这个过程又被称为NETosis<sup>[18]</sup>。NOX非依赖性通路发生时,中性粒细胞不裂解,同时,不涉及ROS的生成,主要是通过核膜起泡和之后的囊泡来运输NETs,被激活的血小板可能是该条通路的诱导剂。关于此条通路的具体机制仍不清楚,有待深入研究。

NETs以解聚的染色质作为主要骨架。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。此外,DNA骨架中还嵌入了核组蛋白、多种颗粒蛋白和某些胞浆蛋白,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等<sup>[10,19-20]</sup>。目前,主要是通过ELISA和免疫荧光法检测MPO-DNA、NE-DNA、cf(cell-free)-DNA和组蛋白H3瓜氨酸化的血浆水平来定量检测NETs<sup>[16,21]</sup>。

## 2 NETs在脓毒症中的变化

前期临床研究显示,被确诊为脓毒症性休克或脓毒症患者血浆中的MPO-DNA水平明显高于正常配伍组,这意味着在脓毒症早期NETs形成显著增加,并且随着MPO-DNA水平升高,器官的损伤程度和死亡率也相应升高<sup>[22]</sup>。在动物模型中,也存在相似的结果。在盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症小鼠模型中,在CLP手术3 h后,实验组小鼠血浆中cf-DNA/MPO水平显著高于对照组小鼠。在CLP手术前10 min和手术后每8 h用重组人脱氧核糖核酸酶(rhDNase)处理小鼠后发现,实验组小鼠和未经rhDNase处理的小鼠相比,血浆中NETs水平降低,但器官损伤程度并无改善<sup>[23]</sup>,并且血液中细菌负荷明显增加。在CLP手术后用抗生素处理小鼠,血液中细菌数量降低,若在应用抗生素的同时合用rhDNase,NETs水平下降,细菌数量降低,与只用抗生素处理的小鼠相比,炎症反应、器官损伤程度和死亡率降低,小

鼠的预后明显改善。此外,在非 CLP 模型中,用 LPS 诱导小鼠产生内毒素性休克后, rhDNase 处理的效果与上述实验结果一致<sup>[24-25]</sup>。这一系列结果提示,在脓毒症的发生发展过程中,NETs 可能有利于病原微生物的清除,但同时它也会加重器官的损伤程度。

### 3 NETs在脓毒症中的作用

#### 3.1 病原微生物的清除

脓毒症是机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍,其病理生理机制涉及多种因素,尤其是各种病原微生物的作用。NETs 的形成能抑制细菌的扩散,并且有利于细菌的捕获和清除<sup>[26]</sup>。NETs 可以通过形成物理屏障,促进细菌或病毒的毒力因子的降解,将毒性颗粒蛋白镶嵌在 DNA 网状结构上,绑定病原体,限制感染扩散,避免宿主继发损伤等起到杀灭多种微生物的作用,包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌、病毒等<sup>[27-28]</sup>。McDonald 等<sup>[29]</sup>通过 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,NETs 形成的网状结构可以抑制细菌的扩散,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,脓毒症的进展加快。Lee 等<sup>[30]</sup>发现,在 CLP 脓毒症小鼠模型中,敲除 PLD2 基因后,通过促进中性粒细胞的募集和 NETs 的形成来抑制脓毒症病情的进展。组蛋白是 NETs 发挥抗菌作用的关键物质,它比一些典型的抗菌药物的杀菌能力还要强<sup>[31-32]</sup>。此外,NETs 在抗真菌方面也有一定作用。Urban 和 Nett<sup>[33]</sup>发现,NETs 中的钙网蛋白和乳铁蛋白具有抑制真菌感染的作用,在体外实验中发现,缺失钙网蛋白的 NETs 的抗真菌作用完全消失。还有研究表明 NETs 的形成可能是选择性的,中性粒细胞能通过 Dectin-1 来感应病原体的大小,并选择性地释放 NETs 来抵御一些大的病原体<sup>[34]</sup>。

#### 3.2 凝血功能紊乱

有研究表明,NETs 可以刺激血小板聚集进而启动凝血过程,这对于脓毒症患者来说十分重要,血小板的减少和脓毒症的严重程度及死亡率密切相关<sup>[10]</sup>。然而,凝血过程的过度激活和之后微血栓的大量形成会导致弥散性血管内凝血(DIC),进而导致多器官功能衰竭,血小板的过度活化是导致病情加重的重要原因<sup>[35]</sup>。McDonald 等<sup>[36]</sup>用革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌或细菌产物刺激诱导 NETs 形

成后证实,其在脓毒症诱导的血管内凝血中起到了至关重要的作用,而用 DNA 酶处理和通过敲除 PAD4 抑制 NETs 的产生后,血管内凝血酶活性显著降低,血小板聚集减少,微血管灌注改善。他们首次在体内感染模型中证明了动态的 NETs-血小板-凝血酶轴在脓毒症中能促进血管内凝血和微血管功能障碍<sup>[36]</sup>。细胞外组蛋白在脓毒症患者凝血功能障碍方面也发挥了很重要的作用,Xu 等<sup>[37]</sup>研究表明,细胞外组蛋白可通过不同机制促进凝血酶的生成,组蛋白也可通过活化血小板和抑制抗凝血剂来促进凝血和血栓的形成。NETs 这种组蛋白-DNA 复合物是血小板活化的高效催化剂,主要通过 TLR2 (Toll-like receptor 2) 和 TLR4 的相互作用发挥这一效应,从而促进异常凝血过程。正常的内皮细胞主要发挥抗凝作用,可有效防止血栓的形成。而在脓毒症期间,内皮细胞损伤严重影响了内皮细胞的各种功能,包括血管调节、屏障和止血功能等。NETs 中的组蛋白具有细胞毒性,在脓毒症期间可损伤内皮细胞并影响微血管灌注,造成弥漫性血栓形成,最终可导致 DIC 和急性器官衰竭等<sup>[38]</sup>。Gould 等<sup>[39]</sup>发现,在血小板缺乏的血浆中,由 PMA 刺激中性粒细胞产生的 NETs 可以促进凝血酶的生成,但加用脱氧核糖核酸酶(DNase)后凝血酶生成水平未见增加,可以证实 NETs 的这种作用与 cf-DNA 相关,并且研究表明 cf-DNA 的促凝作用可能是通过凝血因子 XII 及 XI 介导的内源性凝血途径实现的。

#### 3.3 炎症反应

细胞外组蛋白在起到抗病原微生物作用的同时也对内皮细胞具有细胞毒性,并且这种毒性作用主要由组蛋白 H3、H4 产生,且呈剂量依赖性。研究表明,组蛋白的释放能造成细胞因子风暴,机制可能是组蛋白与 TLR2 和 TLR4 结合激活 MyD88,引发炎症;其次,组蛋白可通过 NLRP3 炎性体激活单核细胞来源的树突状细胞,诱导 IL-1 $\beta$  的产生,引发炎症<sup>[37]</sup>。已有研究发现,非抗凝肝素能通过抑制组蛋白介导的细胞毒性来提高脓毒症的生存率,因此可能成为将来临床上治疗脓毒症患者的新手段<sup>[40]</sup>。Chen 等<sup>[41]</sup>发现,在 CLP 所致小鼠脓毒症模型中,NETs 中释放的高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 可能通过诱导巨噬细胞的死亡来介导多形核中性粒细胞和巨噬细胞之间的联系,进而加重炎症反应的进展,他们的实验结果再次证实了 NETs 在脓毒症中的促炎作用。Luo 等<sup>[42]</sup>的实验发现,在腹腔脓毒症中,NETs 可以通过形



成促炎复合物, 如 CXCL2、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 HMGB1 等来加强肺组织的中性粒细胞浸润和组织损伤。

#### 4 展望

NETs 作为近年来发现的中性粒细胞特殊的效应机制, 它对脓毒症的发展可能是一把双刃剑: 一方面, NETs 对脓毒症时病原菌的清除有重要作用, 提高脓毒症患者的生存率; 另一方面, 中性粒细胞形成 NETs 后释放组蛋白、组胺、NE 等炎症介质进入血液, 损伤组织, 并且可促进巨噬细胞的凋亡, 加重了脓毒症时的炎症反应, 也可通过激活血小板启动凝血过程, 诱导血栓的形成, 进一步加重病情。因此, 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和思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization. *Dev Cell*, 2018, 44: 542-53
- [2] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intens Care Med*, 2017, 43: 304-77
- [3] SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intens Care Med*, 2016, 42: 1980-9
- [4] Rizzo AN, Dudek SM. Endothelial glycocalyx repair: building a wall to protect the lung during sepsis. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2017, 56: 687-8
- [5] Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 2016, 315: 775-87
- [6] Park SY, Shrestha S, Youn Y, et al. Autophagy primes neutrophils for neutrophil extracellular trap formation during sepsis. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2017, 196: 577-89
- [7] de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Res Immunol*, 2016, 16: 378-91
- [8] Bukong TN, Cho Y, Iracheta-Vellve A, et al. Abnormal neutrophil traps and impaired efferocytosis contribute to liver injury and sepsis severity after binge alcohol use. *J Hepatol*, 2018, 69: 1145-54
- [9] Merza M, Hartman H, Rahman M, et al. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 2015, 149: 1920-31.e8
- [10] Camicia G, Pozner R, de Larranaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, 2014, 42: 286-94
- [11] Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, et al. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nat Med*, 2018, 24: 232-8
- [12] Tatsiy O, McDonald PP. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front Immunol*, 2018, 9: 2036
- [13] Etulain J, Martinod K, Wong SL, et al. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*, 2015, 126: 242-6
- [14] Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps —the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1612-20
- [15] Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukocyte Biol*, 2016, 99: 153-62
- [16] Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, et al. Cleaved N-terminal histone tails distinguish between NADPH oxidase (NOX)-dependent and NOX-independent pathways of neutrophil extracellular trap formation. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77: 1790-8
- [17] Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2015, 14: 633-40
- [18] Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circ Res*, 2017, 120: 736-43
- [19] Porto BN, Stein RT. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing? *Front Immunol*, 2016, 7: 311
- [20] Lim CH, Adav SS, Sze SK, et al. Thrombin and plasmin alter the proteome of neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*, 2018, 9: 1554
- [21] Pan B, Alam HB, Chong W, et al. CitH3: a reliable blood biomarker for diagnosis and treatment of endotoxic shock. *Sci Rep*, 2017, 7: 8972
- [22] Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care*, 2018, 22: 176
- [23] Shen XF, Cao K, Jiang JP, et al. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med*, 2017, 21: 1687-97
- [24] Gao X, Hao S, Yan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats. *J Surg Res*, 2015, 195: 211-8
- [25] Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One* 2016, 11: e0148142
- [26] Cedervall J, Zhang Y, Olsson AK. Tumor-induced NETosis as a risk factor for metastasis and organ failure. *Cancer Res*, 2016, 76: 4311-5
- [27] Rajeeve K, Das S, Prusty BK, et al. *Chlamydia trachomatis* paralyzes neutrophils to evade the host innate immune

- response. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 824-35
- [28] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 134-47
- [29] McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 2012, 12: 324-33
- [30] Lee SK, Kim SD, Kook M, et al. Phospholipase D2 drives mortality in sepsis by inhibiting neutrophil extracellular trap formation and down-regulating CXCR2. *J Exp Med*, 2015, 212: 1381-90
- [31] Sol A, Skvirsky Y, Blotnick E, et al. Actin and DNA protect histones from degradation by bacterial proteases but inhibit their antimicrobial activity. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1248
- [32] Chen R, Kang R, Fan XG, et al. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1370
- [33] Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, [Epub ahead of print]
- [34] Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*, 2014, 15: 1017-25
- [35] Fiusa MML, Carvalho-Filho MA, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Causes and consequences of coagulation activation in sepsis: an evolutionary medicine perspective. *BMC Med*, 2015, 13: 105
- [36] McDonald B, Davis RP, Kim SJ, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*, 2017, 129: 1357-67
- [37] Xu Z, Huang Y, Mao P, et al. Sepsis and ARDS: the dark side of histones. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 205054
- [38] Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*, 2016, 45: 259-70
- [39] Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscle Thromb Vasc Biol*, 2014, 34: 1977-84
- [40] Wildhagen KC, Garcia de Frutos P, Reutelingsperger CP, et al. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity *in vitro* and improves survival in sepsis. *Blood*, 2014, 123: 1098-101
- [41] Chen L, Zhao Y, Lai D, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 597
- [42] Luo L, Zhang S, Wang Y, et al. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307: L586-96