

DOI: 10.13376/j.cblls/2022042

文章编号: 1004-0374(2022)04-0357-08

胞外组蛋白/循环组蛋白病理生理效应及相关机制

王丽君¹, 余卫平^{1*}, 程振兴^{2*}

(1 东南大学医学院病理生理学系, 南京 210009; 2 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022)

摘要: 组蛋白是染色质结构蛋白, 也参与调节真核细胞基因表达。一旦发生大量细胞死亡, 组蛋白会释放至细胞外成为胞外组蛋白或进入血液成为循环组蛋白, 成为损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs)。胞外组蛋白/循环组蛋白结合并破坏细胞膜, 激活细胞膜 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 如TLR2、TLR4 和TLR9, 促进凝血酶或血小板活化, 导致接触性细胞毒性、严重炎症反应和血栓形成, 最终导致多器官损伤和功能障碍。该文主要综述近期报道的胞外组蛋白/循环组蛋白在各种疾病中的病理生理效应和机制以及作为治疗靶点的可能性。

关键词: 胞外组蛋白; 循环组蛋白; 严重炎症反应; 凝血障碍; 血栓形成; 多器官损伤; 治疗靶点
中图分类号: Q41; R363 **文献标志码:** A

Extracellular histone/circulating histone and its pathophysiological effects and mechanisms

WANG Li-Jun¹, YU Wei-Ping^{1*}, CHENG Zhen-Xing^{2*}

(1 Department of Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China;

2 Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Histones are structural proteins of chromatin and also involved in regulating gene expression in living eukaryotic cells. Once a large number of cell death occurs, histones are released outside the cells to become extracellular histones or into the blood to become circulating histones, which act as damage-associated molecular patterns (DAMPs). Extracellular histones/circulating histones bind and interrupt cell membrane, activate membrane Toll-like receptors (TLRs) such as TLR2, TLR4 and TLR9, and enhance thrombin or platelet activation, which cause cytotoxicity of the cells contacted, severe inflammatory reaction, and thrombosis, and eventually lead to injury and dysfunction of multiple organs. This paper mainly reviews the recently reported pathophysiological roles and mechanisms of extracellular histones/circulating histones in various diseases, as well as the possibility of being used as a therapeutic target.

Key words: extracellular histone; circulating histone; severe inflammatory reaction; coagulation disorder; thrombosis; multiple organ injury; therapeutic target

存在于所有真核细胞核内的组蛋白 (histone) 是带正电荷的、高度保守的碱性蛋白。人体细胞核内组蛋白包括 H1、H2A、H2B、H3、H4 五种成分, 其中 H2A、H2B、H3、H4 为核心组蛋白, 由它们各 2 个分子所构成的组蛋白八聚体 (histone octamer) 与缠绕在其周围的 146 bp 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 共同组成作为染色体 (chromosome) / 染色质 (chromatin) 基本单位的核小体 (nucleosome);

H1 为连接组蛋白, 是连接核小体的结构性蛋白^[1]。因此, 组蛋白具有维持与稳定染色体 / 染色质结构

收稿日期: 2021-08-26; 修回日期: 2021-12-05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82100596); 东南大学国际(中英)合作项目(8624000000)

*通信作者: E-mail: yuweiping@seu.edu.cn (余卫平); chengzhenxing407@163.com (程振兴)

的作用。从核小体伸出的核心组蛋白 N 端尾部会发生甲基化、乙酰化、磷酸化、瓜氨酸化等不同类型的可逆性修饰,能改变核心组蛋白与 DNA 双链的亲合性,阻碍或促进转录因子与 DNA 结合,参与基因表达调控^[1]。

然而,组蛋白一旦被大量释放至细胞外成为胞外组蛋白(extracellular histone)或进入血液中成为循环组蛋白(circulating histone),可作为一种损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),通过不同机制引起机体损伤^[1]。胞外组蛋白/循环组蛋白与模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)结合会激活胞内信号通路,诱导细胞焦亡和细胞自噬,促进炎症因子产生与释放;激活凝血系统,促进血栓形成;以及引起多器官功能障碍^[2-7]。研究表明,胞外组蛋白/循环组蛋白具有非选择性器官组织细胞毒性,在急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)^[8]、新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)^[9]、急性肝损伤^[10]、肝纤维化^[11]、急性肾损伤^[12]以及急性胰腺炎^[13]等多种重要器官疾病中都起重要作用。本文主要对近期报道的胞外组蛋白/循环组蛋白病理生理效应与相关

机制以及作为治疗靶标的可能性进行综述。

1 胞外组蛋白/循环组蛋白形成机制

正常人体内循环组蛋白含量非常低,现有方法几乎检测不到^[13]。但是,当各种原因造成严重组织细胞破坏时,组蛋白会被大量释放到细胞外,循环组蛋白浓度也会增加。组蛋白主要通过以下三种方式被释放到细胞外(图1)。(1)细胞坏死。细胞坏死时,核膜与胞膜被破坏,染色质降解,包括组蛋白在内的胞内成分被释放到细胞外。此外,还涉及细胞焦亡(pyroptosis)、程序性坏死(necroptosis)、铁死亡(ferroptosis)等形式^[2,5,14-15]。(2)中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)形成(NETosis)。中性粒细胞被细菌等病原体激活后,细胞核物质分解,细胞质膜被破坏,释放出一种由组蛋白、DNA 和其他颗粒蛋白共同构成的网状物质即 NETs,可直接在细胞外杀死病原微生物^[14,16]。肽基精氨酸脱亚胺酶 4(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)可使胞核内组蛋白精氨酸脱甲基转变为瓜氨酸,引起组蛋白瓜氨酸化,染色体去浓缩,组蛋白随 NETs 被释放到细胞外。瓜氨酸化组蛋白 H3

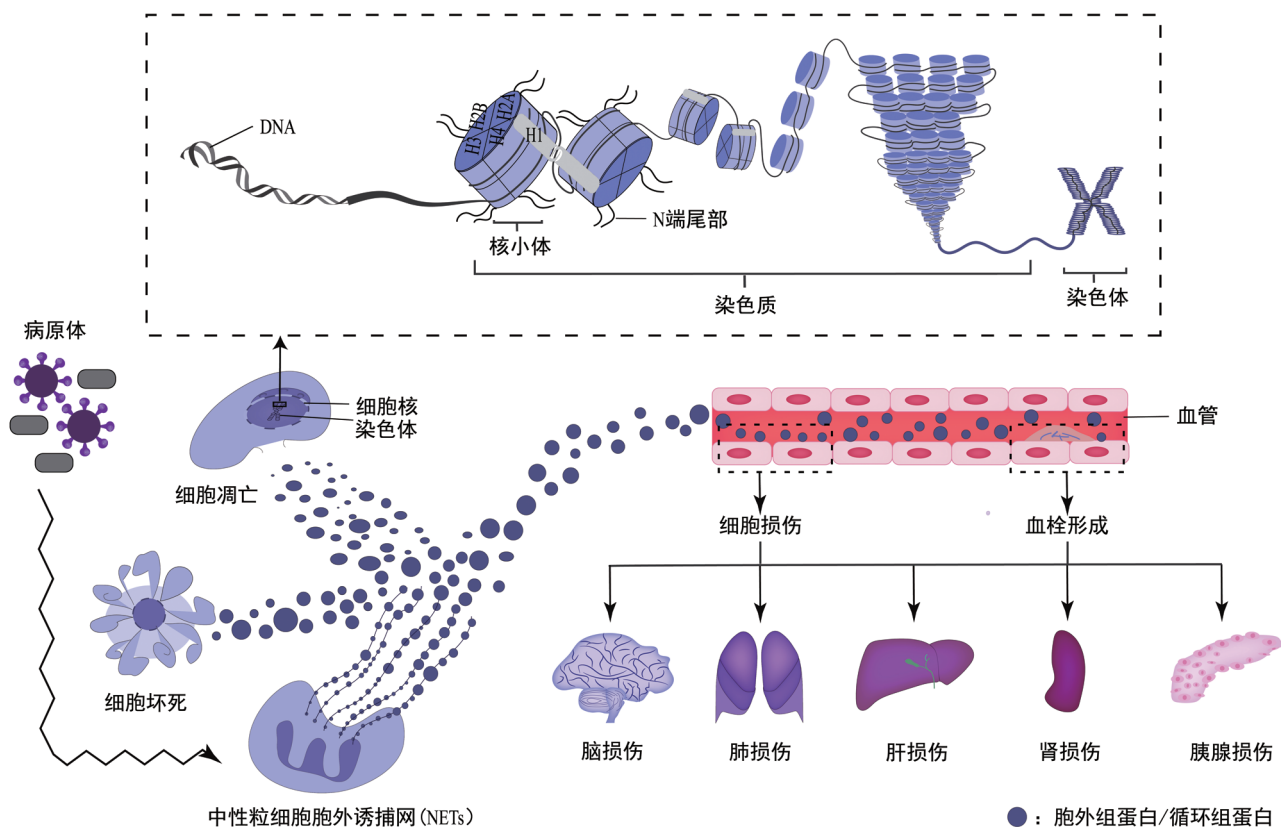


图1 人胞外组蛋白/循环组蛋白形成机制^[5,8,14-18]

(citrullinated histone H3, CitH3) 被认为是 NETosis 的标志, 通过这种方式释放出的组蛋白主要参与动脉粥样硬化和血栓形成^[5,8,17-19]。(3) 细胞凋亡。2013年, Wickman 等^[20]发现大量组蛋白可在凋亡细胞膜泡和凋亡小体处聚集, 并在细胞凋亡后被释放至胞外。

2 胞外组蛋白/循环组蛋白病理生理效应

2.1 严重炎症反应

中性粒细胞是机体感染时主要的防御细胞, 会释放 NETs 从而放大炎症反应^[16]。NETs 促炎效应主要由胞外组蛋白和 DNA 引发, 瓜氨酸化组蛋白促炎活性明显增强^[21]。胞外组蛋白作为 DAMPs 与 PRRs 结合能激活胞内通路如炎症小体信号通路, 诱导细胞焦亡并促进 IL-1 β 、IL-18 产生与释放^[2-3]。比如, 胞外组蛋白与单核细胞表面 TLR4 结合可促进 IL-1 β 转录^[21]; 通过核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide binding oligomerization domain, NOD) 样受体 (NOD like receptor, NLR), 能激活 NLRP3-Asc 型氨基酸转运蛋白 (Asc type amino acid transporter, ASC)-半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteiny aspartate specific proteinase 1, caspase-1) 途径, 促进 IL-1 β 和 IL-18 分泌^[3]。胞外组蛋白 H4 与 TLR2/4 结合还能诱导血管内皮细胞与巨噬细胞释放组织因子 (tissue factor, TF), 激活核转录因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和转录因子 AP-1 介导的信号通路, 促进炎症因子释放^[22]。2021年, Hsieh 等^[1]报道胞外组蛋白 H4 能增加中性粒细胞膜通透性与钙离子内流, 使中性粒细胞活化并释放髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 和 IL-8, 促进炎症反应, 诱导更多的免疫细胞活化, 最终形成恶性循环。这些研究结果表明, 胞外组蛋白 H4 具有很强的促炎作用^[1,22]。

补体在机体抗炎过程中发挥重要的免疫功能。活化的补体不仅能杀伤病原体, 也会损害机体细胞, 从而引起组蛋白、DNA 等释放。胞外组蛋白/循环组蛋白 (H3、H4 为主) 作为补体活化产物, 与补体 C4 相互作用会反过来抑制补体活化, 这可避免机体细胞过度损伤。因此, 在伴有补体活化的慢性炎症中, 胞外组蛋白/循环组蛋白常处于低水平状态^[23]。

2.2 凝血障碍和血栓形成

胞外组蛋白/循环组蛋白可通过多种途径激活凝血系统, 促进血栓形成, 主要存在以下机制。(1) 胞外组蛋白 H3、H4 (主要是 H4) 与细胞膜 TLRs 如 TLR2、TLR4 和 TLR9 结合, 激活下游的 NF- κ B、

AP-1、p38、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 促进 TF 表达, 诱导血小板活化, 促进凝血酶生成和血栓形成^[22,24-25]。(2) 组蛋白作为 NETs 的重要组成部分, 刺激内皮细胞释放血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF), 参与血栓形成^[26]。(3) 胞外组蛋白/循环组蛋白以剂量依赖的方式作用于蛋白 C-血栓调节蛋白系统, 抑制蛋白 C 活化, 促进凝血酶生成, 造成凝血功能紊乱^[27]。(4) NETs 组蛋白 (主要是 H4) 刺激红细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 翻转至膜外侧, 促进凝血、诱导血栓形成^[28]。(5) 高浓度循环组蛋白 ($\geq 80 \mu\text{g}/\text{mL}$) 与纤维蛋白交联, 促进纤维蛋白凝聚, 抑制人组织型纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator, tPA) 与尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 诱导的纤维蛋白降解作用^[18,29]。另一方面, 一定范围内低浓度循环组蛋白可激活 VII 因子活化蛋白酶 (factor seven activating protease, FSAP), 使单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (single chain uPA, scuPA) 转化为 uPA 从而诱导纤维蛋白降解, 使患者易于出血。因此, 循环组蛋白的纤溶终效应可能取决于 scuPA 与 uPA 之间的平衡^[29]。

血栓形成与炎症有内在联系。血栓形成可放大炎症反应, 该过程与胞外组蛋白有关^[5]。采用动脉粥样硬化小鼠模型进行研究发现, 病变平滑肌细胞能诱导中性粒细胞聚集并释放 NETs, NETs 衍生的胞外组蛋白 H4 进一步诱导平滑肌细胞非程序性死亡和动脉粥样硬化病变, 这一过程是动脉壁慢性炎症的主要诱因^[5]。

2.3 多器官功能障碍

本课题组发现健康人循环组蛋白水平为 0~2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而脓毒症患者循环组蛋白含量可高达 66.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 是患者多器官损伤的关键介质^[7]。脓毒症早期中性粒细胞形成 NETs, CitH3 可刺激巨噬细胞产生与释放细胞因子, 进一步促进 NETosis, 造成过度炎症反应, 引起内皮损伤与剥脱, 增加内皮细胞通透性, 诱发渗出性血小板聚集, 导致患者多器官衰竭^[7,30-33]。循环组蛋白与 TLRs 结合, 诱导红细胞 Ca^{2+} 内流、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成及 caspase-3 活化, 导致溶血性贫血; 激活内皮细胞与免疫细胞, 增加细胞因子、趋化因子以及 NO 的合成与释放; 上调 Sestrin2 (SESN2) 表达, 抑制 PKB 活化, 从而诱导内皮细胞自噬; 此外, 较高浓度的循环组蛋白 ($\geq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 能以 p53-Bax 依赖方式诱导内皮细胞凋亡^[4,34-35]。研究证实, 循

环组蛋白 H3 与脓毒症患者凝血障碍、多器官衰竭和死亡相关,可作为评判脓毒症严重程度的关键指标^[36]。循环组蛋白 H3 通过 NOD2 和含 V-set 免疫球蛋白结构域蛋白 4 (V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4, VSIG4) 受体激活 NLRP3 炎症体与 caspase-1, 促进消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 蛋白对质膜的切割, 导致细胞焦亡并释放组蛋白等细胞内容物, 形成恶性循环, 造成持续的细胞毒作用, 介导脓毒症患者多器官衰竭^[3,15]。

2.4 在重要器官疾病中的损伤效应

2.4.1 脑疾病

胞外组蛋白 / 循环组蛋白能造成脑血管内皮与脑实质细胞损伤。2020 年, Deng 等^[8]发现 AIS 患者血栓中富含 CitH3, 表明 NETosis 在患者高凝状态中起关键作用。缺血激活外周血液和软脑膜血管血液中的中性粒细胞, 后者在脑实质浸润过程中释放蛋白酶引发神经毒性并形成 NETs; 组蛋白被释放至胞外激活免疫系统, 引起进一步的细胞毒性, 损伤缺血侧脑皮质、纹状体以及软脑膜。约 40% AIS 患者血糖升高, 高血糖也会促进 NETs 生成与循环组蛋白释放, 加重 AIS 患者脑组织损伤^[8,17]。因此, AIS 严重程度与血 CitH3 水平高低有关^[17]。对短暂大脑中动脉栓塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 小鼠的研究表明, 胞外组蛋白可增加脑梗死体积, 在 AIS 再灌注后继发性血栓形成中起关键作用; 会破坏内皮细胞连接, 增加脑微血管通透性, 改变血脑屏障结构和功能; 可激活小胶质细胞, 诱导线粒体损伤和神经细胞凋亡; 采用抗体中和循环组蛋白可减轻 tMCAO 小鼠脑损伤^[15,37-39]。

2.4.2 肺疾病

胞外组蛋白 / 循环组蛋白与肺病变严重程度相关。2021 年, Shaw 等^[9]报道 COVID-19 患者体内可检测到大量循环组蛋白, 其与纤维蛋白原和 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 等急性期蛋白增加显著相关, 表明循环组蛋白诱导 COVID-19 患者急性期炎症反应。循环组蛋白还可触发 IL-6 释放, 增加凝血酶生成从而促进凝血, 导致肺部血栓形成和患者死亡^[40]。循环组蛋白主要来自淋巴细胞等免疫细胞和 NETs^[9]。临床研究表明, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 可通过血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 和病毒复制直接引起中性粒细胞释放 NETs; 同时, 患者血液中和肺部浸润的中性粒细胞也会释放 NETs。NETs 及其组分可

诱导肺上皮细胞和内皮细胞凋亡, 严重损伤肺功能; 受损肺内皮细胞释放 TF, 促进纤维蛋白沉积和血栓形成, 加重肺损伤^[40-41]。因此, NETosis 标志物 CitH3 可作为评估 COVID-19 病情严重程度的指标^[31]。

2.4.3 肝疾病

小鼠肝衰竭模型实验表明, 胞外组蛋白可刺激 p38、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 磷酸化, 导致多种细胞因子释放从而损伤肝脏细胞^[10]。受损肝脏细胞可释放胞外组蛋白、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1, HMGB1) 等 DAMPs 分子与 TLR4、TLR9 结合, 激活并招募中性粒细胞, 释放大量的 NETs, 从而加剧炎症反应, 加重肝损伤, 而特异性 PAD4 抑制剂和脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 能阻断这一正反馈机制^[42]。此外, 动物实验表明肝损伤还与远隔器官肾脏损伤有关; 大鼠肾移植后缺血 - 再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 早期阶段释放出的胞外组蛋白可与炎性细胞膜上的 TLR4 结合, 诱导促炎因子释放, 从而引起肝脏炎症反应, 激活 caspase-1 引起肝脏细胞焦亡^[2]。2020 年, 本实验室的研究表明, 胞外组蛋白可经 TLR4-髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 通路刺激胶原纤维表达, 从而诱导肝纤维化^[11]。

2.4.4 肾疾病

缺血性急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN) 可促进中性粒细胞活化和 NETs 形成, 释放的组蛋白等成分不仅会加重肾小管损伤和肾间质炎症, 还可导致远隔器官如肺、肝的损伤^[2,43]。胞外组蛋白主要通过肾小管上皮细胞膜上的 TLR2 与 TLR4 激活 MyD88、NF- κ B 以及丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路, 引发炎症反应和急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)^[12,44]。肾 IRI 常见于肾移植术后, 是 AKI 重要发病机制之一, 涉及 NETs 的作用^[45]。肾 IRI 雄鼠与雌鼠外周血中均存在大量 CitH3, 但对肾脏损伤程度呈性别依赖性, 卵巢激素尤其是雌激素能抑制 CitH3 肾损伤效应, 相关机制尚不清楚^[46]。

2.4.5 胰腺疾病

重症急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 时会发生胰腺自身组织消化、水肿、出血、坏死, 使中性粒细胞募集、活化, 释放促炎因子与 NETs; 胞外组蛋白可介导腺泡细胞中信号转导与转录激活因子

3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 磷酸化和胰蛋白酶活化, NETs 可刺激中性粒细胞表达 ROS 和 Mac-1, 引起更多中性粒细胞募集, 加重胰腺损伤 [47-49]。2017 年, Szatmary 等 [50] 发现, 脓毒症时肝脏来源的胞外组蛋白也参与胰腺炎早期损伤机制, 损伤程度呈胞外组蛋白浓度依赖性。胞外组蛋白在胰腺炎症组织内聚集, 破坏胰腺细胞膜, 引起胰腺细胞坏死, 加重病情。对 236 例 AP 患者的临床研究结果表明, 循环组蛋白水平与 AP 患者病情严重程度密切相关, 可作为早期预测患者持续性器官衰竭和死亡的重要指标 [13]。

总之, 胞外组蛋白/循环组蛋白能在机体原有疾病基础上, 作为一种 DAMPs 加重炎症与免疫反应, 促进凝血与血栓形成, 诱导多器官损伤和功能障碍, 对体内各种组织细胞造成非特异性、浓度依赖性损伤。在脑、肺和肾等重要器官疾病中, 中性粒细胞活化会释放 NETs, CitH3 可刺激内皮细胞释放 vWF 参与血栓形成并进一步诱导 NETosis, 造成恶性循环从而加重组织细胞损伤。因此, 胞外组蛋白/循环组蛋白对脑、肺和肾等重要器官的病理生理效应都涉及中性粒细胞激活、NETs 释放与血栓形成 [17,41,43]。CitH3 会破坏血脑屏障结构并诱导神经细胞死亡 [39], 还与肺血栓形成、过度炎症反应所

致的严重肺损伤相关 [41]; 此外, 由于雌激素对肾脏具有保护作用, CitH3 的肾脏损伤效应呈现性别依赖性 [46]。然而, 胞外组蛋白/循环组蛋白的体内作用也不尽是损伤效应, 也可触发机体保护机制, 如导致 CRP、急性期蛋白显著增高以中和胞外组蛋白/循环组蛋白的毒性效应, 以及与 C4 相互作用抑制补体激活 [7]。

3 胞外组蛋白/循环组蛋白病理生理效应相关机制

目前认为, 胞外组蛋白/循环组蛋白主要通过以下三种机制介导组织损伤 (图 2)。(1) 受体作用 [3,12,21,42]。胞外组蛋白/循环组蛋白作为 DAMPs 与细胞膜表面 TLRs 结合, 激活免疫细胞 (中性粒细胞和巨噬细胞等) 和内皮细胞, 促进内源性炎症相关分子或炎症因子如 MyD88、NF-κB、IL-1β 和 IL-18 等合成与释放; 通过 NOD2/VSIG4 受体激活 NLRP3 炎症小体通路, 形成炎症因子风暴, 同时活化 caspase-1, 诱发细胞坏死或细胞焦亡, 引起体内各种病理变化与重要器官损伤。(2) 电荷作用 [39,50]。循环组蛋白对机体组织的损伤效应常始于与血管内皮细胞相互作用, 如带正电荷的循环组蛋白与带负电荷的肺内皮细胞膜表面物理性接触, 两者之间相

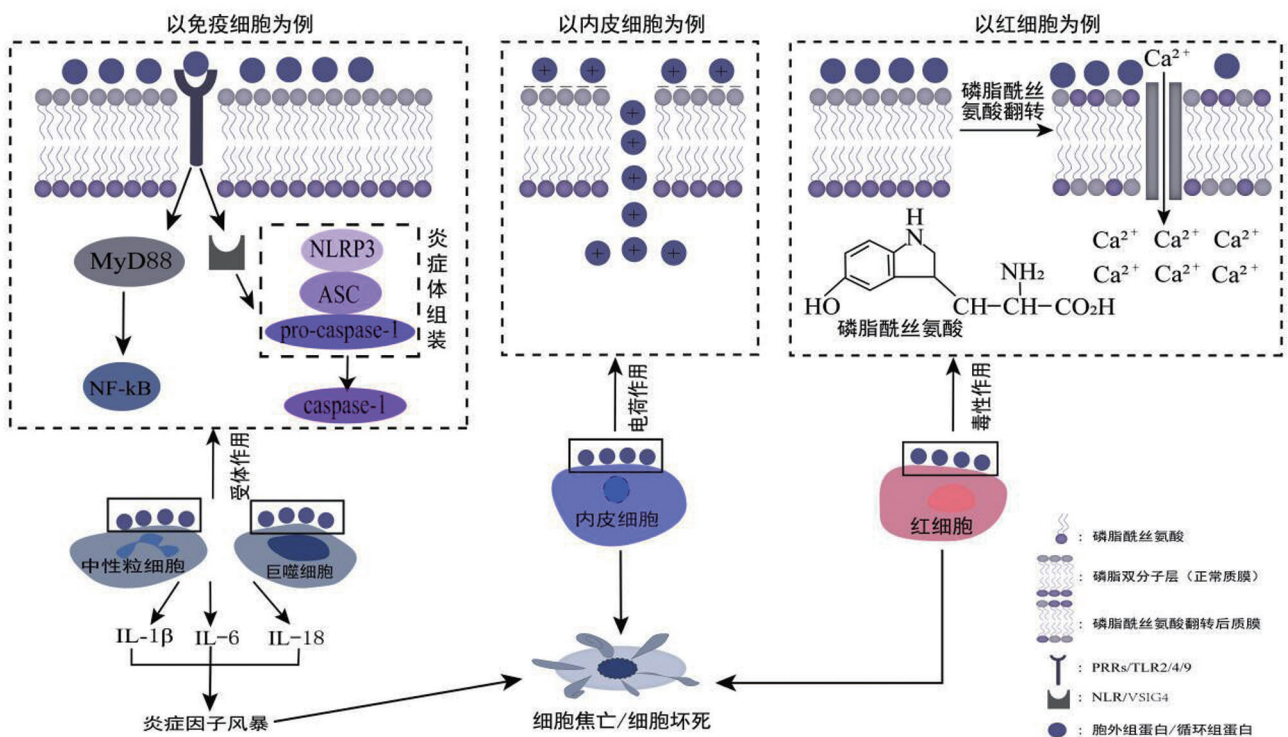


图2 胞外组蛋白/循环组蛋白病理生理效应的机制 [1,3,12,19,21,28,39,42,50-51]

互作用会导致肺内皮细胞与肺组织损伤。胞外组蛋白和胰腺腺泡之间电荷作用的体外研究也表明,胞外组蛋白通过与细胞表面带负电的磷脂酰丝氨酸分子结合,增强组蛋白与膜的相互作用,破坏细胞膜,导致腺泡细胞死亡。(3) 细胞毒性作用^[1,19,28,51]。脓毒症和 AP 时均能观察到循环组蛋白的细胞毒性作用,其可直接引起内皮细胞死亡。胞外组蛋白可在细胞膜双层脂质内形成孔状结构,改变质膜通透性,伴随 PS 易位至膜外侧介导胞外 Ca^{2+} 内流,导致细胞死亡。例如,胞外组蛋白可增加脑微血管壁内皮通透性,破坏血脑屏障结构,导致脑损伤;还可增加中性粒细胞膜通透性,导致 Ca^{2+} 内流,进而导致中性粒细胞呼吸爆发、细胞因子释放和脱颗粒,介导严重炎症反应。

4 靶向循环组蛋白/胞外组蛋白的治疗策略

胞外组蛋白/循环组蛋白在多种疾病发病机制中的作用引发了当前相关领域的研究热潮。胞外组蛋白/循环组蛋白不仅可作为判断脓毒症、新冠病毒感染等疾病严重程度的指标以及进展和预后的生物标志物,还可作为这些疾病的治疗靶标。目前主要相关治疗策略有:(1) 使用药物来阻止胞外组蛋白/循环组蛋白形成,如 NETs 形成抑制剂;(2) 使用抗体中和胞外组蛋白/循环组蛋白,抑制或减弱其损伤效应;(3) 使用药物促进胞外组蛋白/循环组蛋白降解。

当前,研究最多的 NETs 形成抑制剂是 PAD 抑制剂,其中 Cl-amidine 已被证实能在缺血性脑损伤、狼疮、心肌梗死、肝损伤和深静脉血栓形成等小鼠模型中能抑制中性粒细胞 NETosis 从而发挥保护作用。类似地, PAD 抑制剂 YW3-56 和 YW4-03 被证明可减轻 IRI 损伤^[8,42-43,45]。DNase I 是能促进染色质降解的非特异性 NETs 抑制剂,在脑 IRI 相关的肺损伤和深静脉血栓形成中具有保护作用^[7,42]。氯喹 (chloroquine, CQ) 和羟氯喹 (hydroxychloroquine, HCQ) 是常用的自噬抑制剂,已发现 CQ 可抑制胰腺炎组织 NETs 形成。CQ 不仅能抑制 NETosis,还能减少中性粒细胞募集,降低中性粒细胞活化后 NETs 形成倾向,减少血液中游离 DNA 和 CitH3,显著改善小鼠急性胰腺炎损伤^[47,49]。类似于 CQ, HCQ 可保护系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者皮肤和肾脏^[52]。脓毒症时,中性粒细胞与血小板相互作用会促进 NETosis,导致内皮细胞损伤;抗血小板药物磷酸二酯酶 III

(phosphodiesterase III, PDE3) 抑制剂西洛他唑 (cilostazol, Ciz) 可显著阻断 NETs 形成并防止脓毒症小鼠肝损伤^[33]。此外,内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是发育及 DNA 损伤反应调节基因 1 (regulated in development and DNA damage responses 1, REDD1) 驱动 NETs 形成的主要介质,ET-1 受体拮抗剂波生坦 (bosentan) 和 HIF-1 α 抑制剂 L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid) 也可阻止 NETs 形成^[52]。

实验结果表明,通过抗组蛋白抗体中和作用可阻断胞外组蛋白/循环组蛋白的细胞毒性效应。抗组蛋白抗体 BWA-3 对 AIS 小鼠模型具有保护作用,能缩小脑缺血后组织梗死区^[37]。CitH3 单克隆抗体 4Cit 能靶向 PAD2 和 PAD4 催化生成的 CitH3 上的 4 个瓜氨酸位点,改善脓毒症小鼠的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI),减轻炎症反应,提高脓毒症小鼠存活率^[32]。本课题组通过体内和体外实验发现,非抗凝肝素 (non-anticoagulant heparin, NAHP) 能抑制循环组蛋白与细胞膜、凝血酶原等结合,降低循环组蛋白的毒性效应,显著地提高脓毒症小鼠存活率或抑制肝纤维化小鼠病情进展^[7,11]。

活化蛋白 C (activated protein C, APC) 可通过切割组蛋白从而促进胞外组蛋白/循环组蛋白降解,降低其细胞毒性,减少脓毒症小鼠死亡率。在 AIS 模型小鼠中,APC 也具有类似保护作用^[37]。

5 展望

胞外组蛋白/循环组蛋白是脓毒症、新冠病毒感染等多种疾病进展的生物标志物,可作为判断患者病情严重程度及预后的指标,也可将胞外组蛋白/循环组蛋白作为治疗靶点。

以脓毒症为例,这是感染引发的体内炎症反应失调所致危及生命的多器官功能障碍。由于常规抗炎治疗效果欠佳,提示炎症因子并非脓毒症发展阶段主要的致死介质。研究发现,胞外组蛋白/循环组蛋白是脓症患者多器官功能障碍的关键因素,可作为评判脓毒症严重程度的关键指标,也可作为早期预测严重脓毒症器官衰竭的重要指标,针对胞外组蛋白/循环组蛋白的疗法有望提高脓毒症临床疗效。目前,多项研究证明, PAD 抑制剂 Cl-amidine、自噬抑制剂 CQ、抗组蛋白抗体、APC 等药物均能显著提高脓毒症小鼠存活率。如果这些基础研究成果转化至临床应用,必将为脓症患者治疗带来福音。

作者认为, 未来尚需着重关注的方面包括: 拓展目前的研究, 证明胞外组蛋白/循环组蛋白与核内其他组分在致病机制中的协同效应或拮抗效应; 探讨不同修饰的与未修饰的胞外组蛋白/循环组蛋白之间组织细胞效应上的差异; 揭示胞外组蛋白/循环组蛋白是否与固有血管壁细胞或其他类型细胞如平滑肌细胞损伤相关; 阐明胞外组蛋白/循环组蛋白对T细胞、B细胞等免疫细胞的作用机制及抑制补体系统的分子机制; 阐明胞外组蛋白/循环组蛋白除了与TLRs结合, 是否还与其他细胞膜表面受体结合从而发挥损伤效应等。

[参 考 文 献]

- [1] Hsieh IN, Deluna X, White MR, et al. Histone H4 directly stimulates neutrophil activation through membrane permeabilization. *J Leukoc Biol*, 2021, 109: 763-75
- [2] Zhao H, Huang H, Alam A, et al. VEGF mitigates histone-induced pyroptosis in the remote liver injury associated with renal allograft ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant*, 2018, 18: 1890-903
- [3] Shi CX, Wang Y, Chen Q, et al. Extracellular histone H3 induces pyroptosis during sepsis and may act through NOD2 and VSIG4/NLRP3 pathways. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 196
- [4] Ibanez-Cabellos JS, Aguado C, Perez-Cremades D, et al. Extracellular histones activate autophagy and apoptosis via mTOR signaling in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 3234-46
- [5] Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature*, 2019, 569: 236-40
- [6] Barranco-Medina S, Pozzi N, Vogt AD, et al. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 35749-57
- [7] Cheng Z, Abrams ST, Alhamdi Y, et al. Circulating histones are major mediators of multiple organ dysfunction syndrome in acute critical illnesses. *Crit Care Med*, 2019, 47: e677-84
- [8] Deng J, Zhao F, Zhang Y, et al. Neutrophil extracellular traps increased by hyperglycemia exacerbate ischemic brain damage. *Neurosci Lett*, 2020, 738: 135383
- [9] Shaw RJ, Abrams ST, Austin J, et al. Circulating histones play a central role in COVID-19-associated coagulopathy and mortality. *Haematologica*, 2021, 106: 2493-8
- [10] Ding L, Zhang X, Li L, et al. Qingchangeligan formula alleviates acute liver injury by attenuating extracellular histone-associated inflammation. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 140-6
- [11] Wang Z, Cheng ZX, Abrams ST, et al. Extracellular histones stimulate collagen expression *in vitro* and promote liver fibrogenesis in a mouse model via the TLR4-MyD88 signaling pathway. *World J Gastroenterol*, 2020, 26: 7513-27
- [12] Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23: 1375-88
- [13] Liu T, Huang W, Szatmary P, et al. Accuracy of circulating histones in predicting persistent organ failure and mortality in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg*, 2017, 104: 1215-25
- [14] Allam R, Kumar SV, Darisipudi MN, et al. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92: 465-72
- [15] Sun YB, Zhao H, Mu DL, et al. Dexmedetomidine inhibits astrocyte pyroptosis and subsequently protects the brain in *in vitro* and *in vivo* models of sepsis. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 167
- [16] Van Avondt K, Maegdefessel L, Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation. *Thromb Haemost*, 2019, 119: 542-52
- [17] Kim S W, Lee H, Lee HK, et al. Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7: 94
- [18] Locke M, Longstaff C. Extracellular histones inhibit fibrinolysis through noncovalent and covalent interactions with fibrin. *Thromb Haemost*, 2021, 121: 464-76
- [19] Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187: 160-9
- [20] Wickman GR, Julian L, Mardilovich K, et al. Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ*, 2013, 20: 1293-305
- [21] Tsourouktsoglou TD, Warnatsch A, Ioannou M, et al. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4. *Cell Rep*, 2020, 31: 107602
- [22] Yang X, Li L, Liu J, et al. Extracellular histones induce tissue factor expression in vascular endothelial cells via TLR and activation of NF- κ B and AP-1. *Thromb Res*, 2016, 137: 211-8
- [23] Qaddoori Y, Abrams ST, Mould P, et al. Extracellular histones inhibit complement activation through interacting with complement component 4. *J Immunol*, 2018, 200: 4125-33
- [24] Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, et al. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost*, 2013, 110: 1035-45
- [25] Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu YB, et al. *In vitro* activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood*, 2017, 129: 1021-9
- [26] Lam FW, Cruz MA, Parikh K, et al. Histones stimulate von Willebrand factor release *in vitro* and *in vivo*. *Haematologica*, 2016, 101: e277-9
- [27] Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, et al. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing

- thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*, 2011, 9: 1795-803
- [28] Semeraro F, Ammollo CT, Esmon NL, et al. Histones induce phosphatidylserine exposure and a procoagulant phenotype in human red blood cells. *J Thromb Haemost*, 2014, 12: 1697-702
- [29] Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, et al. Extracellular histones promote fibrinolysis by single-chain urokinase-type plasminogen activator in a factor seven activating protease-dependent way. *Thromb Res*, 2020, 196: 193-9
- [30] Ito T, Nakahara M, Masuda Y, et al. Circulating histone H3 levels are increased in septic mice in a neutrophil-dependent manner: preclinical evaluation of a novel sandwich ELISA for histone H3. *J Intensive Care*, 2018, 6: 79
- [31] Cavalier E, Guiot J, Lechner K, et al. Circulating nucleosomes as potential markers to monitor COVID-19 disease progression. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 600881
- [32] Deng Q, Pan B, Alam HB, et al. Citrullinated histone H3 as a therapeutic target for endotoxic shock in mice. *Front Immunol*, 2019, 10: 2957
- [33] Nomura K, Miyashita T, Yamamoto Y, et al. Citrullinated histone H3: early biomarker of neutrophil extracellular traps in septic liver damage. *J Surg Res*, 2019, 234: 132-8
- [34] Yeung KW, Lau PM, Tsang HL, et al. Extracellular histones induced eryptotic death in human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53: 229-41
- [35] Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun*, 2015, 21: 827-46
- [36] Yokoyama Y, Ito T, Yasuda T, et al. Circulating histone H3 levels in septic patients are associated with coagulopathy, multiple organ failure, and death: a single-center observational study. *Thromb J*, 2019, 17: 1
- [37] De Meyer SF, Suidan GL, Fuchs TA, et al. Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 1884-91
- [38] Gilthorpe JD, Oozeer F, Nash J, et al. Extracellular histone H1 is neurotoxic and drives a proinflammatory response in microglia. *F1000Res*, 2013, 2: 148
- [39] Villalba N, Baby S, Cha BJ, et al. Site-specific opening of the blood-brain barrier by extracellular histones. *J Neuroinflammation*, 2020, 17: 281
- [40] Shaw RJ, Bradbury C, Abrams ST, et al. COVID-19 and immunothrombosis: emerging understanding and clinical management. *Br J Haematol*, 2021, 194: 518-29
- [41] Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*, 2020, 217: e20201129
- [42] Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*, 2015, 62: 600-14
- [43] Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, et al. Histones and neutrophil extracellular traps enhance tubular necrosis and remote organ injury in ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28: 1753-68
- [44] Akatsuka M, Masuda Y, Tatsumi H, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin is associated with attenuation of sepsis-induced renal impairment by inhibition of extracellular histone release. *PLoS One*, 2020, 15: e0228093
- [45] Raup-Konsavage WM, Wang Y, Wang WW, et al. Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int*, 2018, 93: 365-74
- [46] Melo Z, Gutierrez-Mercado YK, Garcia-Martinez D, et al. Sex-dependent mechanisms involved in renal tolerance to ischemia-reperfusion: role of inflammation and histone H3 citrullination. *Transpl Immunol*, 2020, 63: 101331
- [47] Murthy P, Singhi AD, Ross MA, et al. Enhanced neutrophil extracellular trap formation in acute pancreatitis contributes to disease severity and is reduced by chloroquine. *Front Immunol*, 2019, 10: 28
- [48] Bang JY, Wilcox CM, Arnoletti JP, et al. Superiority of endoscopic interventions over minimally invasive surgery for infected necrotizing pancreatitis: meta-analysis of randomized trials. *Dig Endosc*, 2020, 32: 298-308
- [49] 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
- [50] Szatmary P, Liu T, Abrams ST, et al. Systemic histone release disrupts plasmalemma and contributes to necrosis in acute pancreatitis. *Pancreatol*, 2017, 17: 884-92
- [51] Allam R, Darisipudi MN, Tschopp J, et al. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol*, 2013, 43: 3336-42
- [52] Frangou E, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). *Ann Rheum Dis*, 2019, 78: 238-48