

中性粒细胞外陷阱在脓毒症发生机制中的研究进展

王雪 李晶菁 黄中伟

南通大学附属医院急诊科, 南通 226000

通信作者: 黄中伟, Email: hzw889@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.06.025

脓毒症 (sepsis) 每年造成全球数百万人死亡, 是医院急救中心和重症监护病房中常见的急危重症。虽然近年来医学技术迅速发展, 但脓毒症仍严重威胁人类健康, 因此迫切需要脓毒症的早期识别方法和更有效的医疗干预措施。中性粒细胞是一种多功能先天性免疫细胞, 当感染发生时趋化因子诱导中性粒细胞由血流迁移至感染部位, 通过吞噬作用和生成中性粒细胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 清除病原体。NETs 在脓毒症发生机制中起到了重要作用, 本文就 NETs 的组成、形成过程、在脓毒症中的作用和潜在的治疗靶点作出总结, 为寻找脓毒症早期诊断标志物及新的治疗手段提供思路。

1 NETs 的组成

NETs 是由解聚染色质形成的具有约 25~50 nm 直径大小不等孔的网状 DNA 结构, 由核蛋白包被, 包括组蛋白、颗粒蛋白 (如弹性蛋白酶和髓过氧化物酶) 和胞浆蛋白 (如 S100 钙结合蛋白 A8、A9 和 A12, 以及肌动蛋白和 α -肌动蛋白)^[1-2]。细胞游离 DNA (cfDNA)、髓过氧化物酶-DNA (MPO-DNA)、瓜氨酸化组蛋白 H3-DNA (citH3-DNA)、弹性蛋白酶-DNA (NE-DNA) 可间接反映脓毒症患者循环 NETs 的形成^[3-4]。

2 NETs 的形成机制

NETs 的释放过程称为“NETosis”, 是一种不同于凋亡和坏死的程序式细胞死亡途径, 该过程是在没有细胞裂解情况下发生的。目前报道了两种不同的“NETosis”^[5]: 溶解性中性粒细胞外陷阱介导的死亡 (lytic neutrophil extracellular traps mediated death) 和重要的中性粒细胞外陷阱介导的死亡 (vital neutrophil extracellular traps mediated death), 前者由生理诱导物刺激, 中性粒细胞受到刺激后激活 PKC-Raf/MERK/ERK 通路, 胞内颗粒蛋白向细胞核迁移, 染色质解聚, 核膜和颗粒膜的通透性丧失, 混合核、颗粒物质和胞质内含产物透过溶解的胞膜排出到细胞外, 此过程依赖 NADPH 氧化酶, 需要约 120 min, NETs 释放后中性粒细胞死亡, 所以也被叫做自杀性“NETosis”^[6-7]。而

后者由细菌或细菌产物刺激, 细胞核失去多叶发育, DNA 核萌发囊泡穿过细胞质, 与质膜融合连同颗粒蛋白释放到细胞外, 该过程不依赖 NADPH 氧化酶, 且发生在 30 min 内^[8]。脓毒症主要通过溶解性中性粒细胞外陷阱介导的死亡途径生成 NETs^[9], NADPH 氧化酶的功能失调可能是 NETs 形成的重要原因, 将中性粒细胞与脓毒症患者的血浆或血清共孵育会促使大量 NETs 生成^[10]。

3 NETs 在脓毒症中的作用

3.1 捕获和直接杀伤

NETs 主要通过形成物理屏障和直接杀死微生物来发挥抗菌活性^[11], NETs 通过细菌上正电荷与带负电的染色质纤维间的静电作用控制其转移, 限制感染扩散^[12]。研究证实了具有快速溶解 DNA 功能的细菌毒力作用更强, 如肺炎链球菌能够表达 endA 基因 (能够降解 DNA), 更易导致菌血症和败血症的发生^[13]。Bianchi 等^[14]将慢性肉芽肿性疾病 (一种 NADPH 氧化酶基因突变引起的家族性疾病) 患者的中性粒细胞与构巢曲霉共培养, 结果导致构巢曲霉生成增多。McDonald 等^[15]研究观察到 PAD4 基因敲除小鼠的中性粒细胞杀死福氏志贺氏菌的能力降低, 吞噬作用受到抑制。研究^[16]发现白色念珠菌菌丝上的 β -葡聚糖会被补体受体 3 (CR3) 所识别, 诱导快速 NETosis 反应, 释放 NETs 捕获并消除酵母或菌丝形式的白色念珠菌。此外, 研究还报道了中性粒细胞能够联合巨噬细胞消灭结核分枝杆菌^[17]。

3.2 凝血功能紊乱和血栓形成

内皮结构与功能的完好是保证毛细血管内稳定的基础^[18]。血管内皮损伤在脓毒症血栓的发生和发展中起着重要作用, 异常 NETs 生成可加重与血栓形成相关的内皮功能障碍。NETs 可以通过 TLR4/NF- κ B 信号通路促进内皮细胞释放炎性因子^[19-20], 还可以促进血小板粘附、活化、聚集, 为血栓形成提供支架, 而血小板、内皮细胞和补体的相互作用又可以介导 NETs 的形成和免疫血栓形成, 从而形成凝血正反馈激活^[21]。研究^[22]表明, 脓毒症患者血浆中的 cfDNA 含量与凝血酶形成的速率和程度呈正相关, cfDNA 不但能够通过抑制组织纤溶酶原激活物来破坏纤溶系统, 还能够招募循环中的

红细胞,促进血管性血友病因子、纤维蛋白原和纤维蛋白沉积,促使血栓形成^[23]。H3 可以直接诱导上皮和内皮细胞死亡^[24],并可通过与 TLR2、TLR4 结合,激活下游 ERK/AKT/p38 通路,促使血小板聚集及微血栓形成。此外,NE 的分泌会降解蛋白多糖并促进血小板粘附^[25]。

3.3 炎症反应和器官功能障碍

脓毒症发生时,NETs 能够随中性粒细胞在机体任何部位形成释放,促进炎症反应和组织器官损伤^[26]。cfDNA 过多生成引起微血管闭塞和组织缺氧从而导致多器官功能损伤^[27],H3 可以作为趋化因子,诱导炎症因子产生及白细胞和组织细胞凋亡,同时激发直接细胞毒性,引发炎症反应^[28-30]。Mikacenic 等^[31]研究观察到在脓毒症患者呼吸系统有大量中性粒细胞浸润及 NETs,并与急性呼吸窘迫综合征的发生有关。研究^[32]发现腹腔脓毒症患者 NETs 通过形成 CXCL2、IL-6、HMGB1 等促炎复合物介导组织损伤。研究^[33]将 H3 注射到小鼠肾动脉中诱导了急性肾损伤的发生,且检测到循环 cfDNA 浓度越高,小鼠的死亡率越高。研究^[34]通过体外和体内实验发现 METTL3 会通过 NETs 介导的 m6A 修饰及肺泡上皮细胞铁蛋白下垂,引起脓毒症患者和小鼠相关急性肺损伤(SI-ALI)。此外,研究还发现 NETs 还能够直接刺激巨噬细胞引起慢性炎症反应。

4 NETs 潜在的治疗靶点

肽基精氨酸脱氨酶 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) 所催化的 H3 瓜氨酸化参与 NETosis 染色质解聚^[36], PAD4 基因缺陷小鼠的 NETs 生成水平、脓毒症发生率和器官功能障碍严重程度均显著降低^[37]。PAD4 抑制剂 GSK484 能减少小鼠中性粒细胞中的 kindlin-3,进而降低 NETs 生成并抑制血栓形成^[38]; PAD4 脱氨活性抑制剂 (Cl-amidine) 和 BBC1 肽均可抑制 NETs 生成,并减少血管损害和内皮功能障碍^[39]。

脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease, DNase) 能够消化 DNA 的核酸内切酶,抑制 NETs 形成。DNase1 和 DNase1-III 可在体内独立表达,在脓毒症中降解 NETs 的 DNA 骨架,使用 DNase 治疗脓毒症小鼠,可改善小鼠肺损伤,降低病死率^[40]。

病原体激活血小板 TLR4 触发血栓、炎症和凝血反应,参与动物和人类 NETs 的生成及脓毒症的发生^[41]。TAK-242 (Resatorvid) 为 TLR4 小分子特异性抑制剂,通过阻断 TLR4 与衔接蛋白 TIRAP 和 TRAM 之间的相互作用,而减少炎症的发生; A2 乙酰氨基吡喃苷化合物 (MW 389) 可以抑制脓毒症小鼠 iNOS RNA 和 TNF- α 的产生,提高存活率;此外,他汀类药物及血管紧张素 II 受体阻滞剂对 TLR4 均有着抑制作用。

功能性抗 IL-8 阻断剂 mAb 和 IL-8 受体拮抗剂

reparixin 可降低脓毒症患者血浆 NETs 生成, IL-5, IL-9, IL-12, IL-17 等炎症因子与 NETs 的生成呈负相关^[2]。

5 总结与展望

NETs 与脓毒症的发生发展密切相关,一方面,NETs 可以在免疫防御中发挥清除病原体及限制炎症扩散的作用,另一方面,NETs 的过度激活也会促发免疫反应,导致血栓形成、炎症反应失控及器官衰竭等不良后果。因此,NETs 的探讨将为脓毒症治疗的干预靶点提供新的方向。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Chapman EA, Lyon M, Simpson D, et al. Caught in a trap proteomic analysis of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 423. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00423.
- [2] Abrams ST, Morton B, Alhamdi Y, et al. A novel assay for neutrophil extracellular trap formation independently predicts disseminated intravascular coagulation and mortality in critically ill patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(7): 869-880. DOI: 10.1164/rccm.201811-2111OC.
- [3] 梁霜霜, 龚平. 中性粒细胞胞外诱捕网在急危重症中的研究进展[J]. *中华急诊医学杂志*, 2021, 30(6): 785-788. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.06.031.
- [4] Poli V, Ma VPY, di Gioia M, et al. Zinc-dependent histone deacetylases drive neutrophil extracellular trap formation and potentiate local and systemic inflammation[J]. *Science*, 2021, 24(11): 103256. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103256.
- [5] Yipp BG, Kubas P. NETosis: how vital is it?[J]. *Blood*, 2013, 122(16): 2784-2794. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- [6] Konig MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 461. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00461.
- [7] Al-Khafaji AB, Tohme S, Yazdani HO, et al. Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism[J]. *Mol Med*, 2016, 22:621-631. DOI:10.2119/molmed.2016.00054.
- [8] Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 81. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- [9] Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): fj201800691R. DOI: 10.1096/

- fj.201800691R.
- [10] Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(4): 513-530. DOI: 10.1007/s00281-013-0384-6.
- [11] 李妍 孙翰 朱华栋. 中性粒细胞胞外陷阱在新型冠状病毒感染中的作用与机制[J]. *中华急诊医学杂志*, 2023,32(4):447-451. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.04.001.
- [12] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 623-625. DOI: 10.1038/nm.1959.
- [13] Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing[J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 815-819. DOI: 10.1038/nm.3887.
- [14] Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis[J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2619-2622. DOI: 10.1182/blood-2009-05-221606.
- [15] 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. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011.
- [16] Li PX, 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. DOI: 10.1084/jem.20100239.
- [17] Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, et al. Immune defence against *Candida* fungal infections[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(10): 630-642. DOI: 10.1038/nri3897.
- [18] Chen LS, Zhao YF, Lai DM, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 597. DOI: 10.1038/s41419-018-0538-5.
- [19] Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10973. DOI: 10.1038/ncomms10973.
- [20] Aldabbous L, Abdul-Salam V, McKinnon T, et al. Neutrophil extracellular traps promote angiogenesis: evidence from vascular pathology in pulmonary hypertension[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(10): 2078-2087. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307634.
- [21] Wei JX, Jiang HL, Chen XH. Endothelial cell metabolism in sepsis[J]. *World J Emerg Med*, 2023, 14(1): 10. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2023.019.
- [22] Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs[J]. *Blood*, 2014, 123(18): 2768-2776. DOI: 10.1182/blood-2013-10-463646.
- [23] Zhou H, Deng MH, Liu YJ, et al. Platelet HMGB1 is required for efficient bacterial clearance in intra-abdominal bacterial sepsis in mice[J]. *Blood Adv*, 2018, 2(6): 638-648. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017011817.
- [24] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15880-15885. DOI: 10.1073/pnas.1005743107.
- [25] Kumar S, Gupta E, Kaushik S, et al. Quantification of NETs formation in neutrophil and its correlation with the severity of sepsis and organ dysfunction[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495: 606-610. DOI: 10.1016/j.cca.2019.06.008.
- [26] Wohner N, Keresztes Z, Sótonyi P, et al. Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(7): 1624-1631. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03890.x.
- [27] Chen ZY, Zhang H, Qu MD, et al. Review: the emerging role of neutrophil extracellular traps in Sepsis and Sepsis-associated thrombosis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 653228. DOI: 10.3389/fcimb.2021.653228.
- [28] Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, et al. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111755. DOI: 10.1371/journal.pone.0111755.
- [29] Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis[J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 113. DOI: 10.1186/s13054-019-2407-8.
- [30] Crouser ED, Matthay MA. Endothelial damage during septic shock: significance and implications for future therapies[J]. *Chest*, 2017, 152(1): 1-3. DOI: 10.1016/j.chest.2017.02.016.
- [31] Hu H, Jiang JY, Yao N. Comparison of different versions of the quick sequential organ failure assessment for predicting in-hospital mortality of sepsis patients: a retrospective observational study[J]. *World J Emerg Med*, 2022, 13(2): 114-119. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2022.027.
- [32] Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 358. DOI: 10.1186/s13054-018-2290-8.
- [33] Swamydas M, Gao JL, Break TJ, et al. CXCR1-mediated neutrophil degranulation and fungal killing promote *Candida* clearance and host survival[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(322): 322ra10. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7718.
- [34] Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(8): 1375-1388. DOI: 10.1681/ASN.2011111077.
- [35] Zhang H, Liu J, Zhou Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate m6A modification and regulates sepsis-associated acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3337-3357. DOI: 10.7150/ijbs.69141.
- [36] Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1322. DOI: 10.1038/s41467-019-09160-7.
- [37] Biron BM, Chung CS, Chen YP, et al. PAD4 deficiency leads to decreased organ dysfunction and improved survival in a dual insult

- model of hemorrhagic shock and Sepsis[J]. *J Immunol*, 2018, 200(5): 1817-1828. DOI: 10.4049/jimmunol.1700639.
- [38] Yan YY, Yang HQ, Hu X, et al. Kindlin-3 in platelets and myeloid cells differentially regulates deep vein thrombosis in mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(17): 6951-6959. DOI: 10.18632/aging.102229.
- [39] Franck G, Mawson TL, Folco EJ, et al. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial injury: implications for superficial erosion[J]. *Circ Res*, 2018, 123(1): 33-42. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312494.
- [40] Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical Sepsis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148142. DOI: 10.1371/journal.pone.0148142.
- [41] Schattner M. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(5): 873-880. DOI: 10.1002/JLB.MR0618-213R.

(收稿日期: 2023-01-27)

(本文编辑: 何小军)

小鼠心脏骤停 - 复苏模型建立的研究进展

何露 徐杰丰 蒋相康 张茂

浙江大学医学院附属第二医院急诊医学科 / 浙江省严重创伤与烧伤诊治重点实验室 / 浙江省急危重症临床医学研究中心, 杭州 310009

通信作者: 张茂, Email: z2jzk@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(82072126); 国家重点研发计划项目(2022YFC2401900); 浙江省重点研发计划项目(2021C03073)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.06.026

心脏骤停(cardiac arrest, CA)是心脏机械性活动停止和循环征象消失的一种急症, 目前在全球仍处于高发生率和高病死率的态势, 成为影响人类生命健康的重要原因之一^[1]。欧美国家每年院外CA发生率高达118.5/10万、88.8/10万, 而出院存活率仅有8%、9%^[2-3]。我国每年院外CA患者接近105万, 出院存活率仅有1.0%左右^[4-5]。原因在于我国针对CA的生存链还不完善, 在及时发现、目击者复苏、院前急救、院内急诊室复苏上还有较大差距, 导致心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)成功率低下^[6]。即使复苏成功后, CA后综合症的救治也是很大的挑战。因此, 积极探索CA后综合症的关键病理生理机制及有效干预靶标, 成为心肺复苏领域研究的重点内容之一^[7]。现有较多应用小鼠CA-CPR模型开展复苏研究的报道, 但建模参数众多、标准不统一, 本文回顾了20年来该方向的研究进展, 现报道如下。

1 建模对象选择

在CA动物模型中, 最常见的动物是猪、大鼠和小鼠^[8]。猪作为实验对象, 具有与人类相似的解剖、生理和生化特性, 但对人力财力的要求均较高, 故常用于临床前的成熟研究; 大鼠体型较大, 易于进行手术操作, 且采血量能满足多项血指标检测的要求, 但其遗传物质不稳定, 存在个体差异, 难以对特定基因或途径进行基因调控研究; 小鼠

虽然手术操作难度较大、采血量有限, 但具有遗传背景明确、与人类基因同源性高、转基因构建技术成熟稳定等优点, 而且已被应用于多种疾病的发病机制解析、干预靶点筛选、新药开发评价等多方面研究工作。因此, 相比较猪和大鼠, 小鼠作为实验动物在CA后关键病理生理机制及有效干预靶标的研究中更具优势。现有文献多选择8~12周龄或体重为20~30g的成年雄性C57BL/6小鼠为建模对象^[9-10]。

2 建模前准备

建模前准备包括麻醉、气管插管、动静脉置管、体温监控和心电监测五大内容。麻醉通常采用2种方式, 一种是气体吸入式, 先经3%~5%异氟烷诱导麻醉后, 继以1%~2%异氟烷维持麻醉状态^[10-11]。另一种是腹腔注射式, 选用戊巴比妥钠(40~50 mg/kg, 1 mmHg=0.133 kPa)或氯胺酮(100 mg/kg)联合甲苯噻嗪(15 mg/kg)等其他麻醉药品, 通过腹腔注射以达到麻醉效果^[12-14]。待小鼠完全麻醉后, 选用20 G或22 G套管进行气管插管, 为后续连接呼吸机做准备^[15-16]。动静脉置管以股动脉与颈静脉插入PE-10导管为主, 前者用于监测血压, 后者用于给药^[17-18]。置管操作时, 可根据实际情况考虑是否使用体视显微镜等辅助放大设备。一般通过直肠监测肛温, 要注意健康小鼠的脑温比肛温高0.5~1.0℃^[19], 因此可根据研究目的决定是否在耳道或颞肌处增加监测脑温。通过肢体导联进行心电图监测。