

# 中性粒细胞胞外诱捕网研究进展

周协琛, 武瑞, 王海, 贺显晶

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319)

**摘要:** 多形核中性粒细胞 (poly-morphonuclear neutrophils, PMN) 是机体天然免疫系统中第一条防线的重要组成部分。以往研究发现, PMN 杀灭病原微生物主要通过其脱颗粒及吞噬作用。最近发现一种新的方式——中性粒细胞通过释放自身裂解的 DNA 形成网状结构, 使多种蛋白镶嵌在网状结构上, 形成中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs), 包裹病原微生物并对其进行杀灭。研究表明, NETs 的出现对机体而言是一把双刃剑, NETs 有利于机体杀灭病原微生物, 且是自身免疫性疾病的强诱发因素, 可导致各种急慢性炎症性疾病的发生。本文就 NETs 的形成、影响因素及其与机体自身免疫性疾病的关系作一概述。

**关键词:** 动物医学; 中性粒细胞; 综述; 胞外诱捕网; 杀菌作用; 自身免疫性疾病

**中图分类号:** S854      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1674-2850(2019)01-0127-05

## Progress in neutrophil extracellular traps

ZHOU Xiechen, WU Rui, WANG Hai, HE Xianjing

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**Abstract:** Poly-morphonuclear neutrophils (PMN) as the main members in the innate immune system form the first line of defense. Previous studies have found that PMN killed pathogenic microorganisms mainly by their degranulation and phagocytosis. Recently, another new mechanism has been discovered, which neutrophils form a network structure by releasing self-cleaved DNA, and a variety of proteins are embedded in the network to form neutrophil extracellular traps (NETs), enveloping pathogens and killing them. However, research has shown that NETs are actually a double-edged sword. NETs not only are conducive to host in killing pathogenic microorganisms, but also strongly cause autoimmune diseases, which can lead to various acute and chronic inflammatory diseases. This article reviews the formation, influenced factors of NETs and their relationship with autoimmune diseases.

**Key words:** veterinary medicine; neutrophils; review; extracellular traps; bactericidal effect; autoimmune disease

## 0 引言

PMN 是抵抗病原微生物侵入机体的重要防线, 在天然免疫过程中发挥重要作用。2004 年, BRINKMANN 等<sup>[1]</sup>首次在研究中发现 PMN 存在胞外诱捕现象。当 PMN 被病原微生物激活后, 自身结构发生改变, 裂解为以 DNA 链为骨架、各种蛋白镶嵌在骨架上的复杂三维网状结构, 称为 NETs。PMN 胞外诱捕现象在多个物种中均已发现, 存在生物普遍性<sup>[2-4]</sup>。NETs 的出现常伴随 PMN 的死亡, 然而这种死亡途径不同于正常的细胞坏死和细胞凋亡, STEINBERG 等<sup>[5]</sup>将这种方式命名为 NETosis, 后来研究人

**基金项目:** 黑龙江省普通高等学校青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2015087); 黑龙江省自然科学基金 (C2016045, C2018043); 中国博士后科学基金面上项目 (2016M60146)

**作者简介:** 周协琛 (1993—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 奶牛乳腺健康与乳品质调控

**通信联系人:** 武瑞, 教授, 主要研究方向: 奶牛普通炎症疾病综合防治技术. E-mail: fuhewu@126.com

员又相继发现肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞均可产生胞外诱捕网 (extracellular traps, ETs) [6-8]。且细胞释放 ETs 的能力不仅存在于哺乳动物中, 也存在于禽类和鱼类的免疫细胞中 [2, 3, 9]。

当病原微生物侵入机体后, NETs 游行至感染部位将其捕获, 并释放高浓度的组蛋白、抗菌肽等抗菌物质包裹病原体, 起到杀菌作用。同时, 有报道证实 NETs 对机体细胞及组织存在一定的危害性, 是自身免疫性疾病的诱因之一 [10-11]。本文着重对 NETs 的组成、影响因素及其与自身免疫性疾病之间的关系进行概述。

## 1 NETs 的形成

NETs 是由 PMN 释放到胞外的一种包含 DNA、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、组蛋白、中性粒细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、肝素结合蛋白、组织蛋白酶 G、穿透素 3、明胶酶、肽聚糖结合蛋白等的三维网状结构 [12]。研究证实, 在 NETs 形成期间, PMN 结构发生改变, 核内染色质与颗粒蛋白混合, 最终以死亡的方式释放成熟 NETs; 同时, 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活 Raf-MEK-ERK 途径信号通路后, 组蛋白中的精氨酸残基脱亚胺基转化为瓜氨酸残基, 核内 DNA 与蛋白的复合结构发生明显改变, 呈疏松化, 便于 NETs 在机体内移动, 使其更易到达感染部位 [13]。当 NETs 抵达感染部位后, 通过释放高浓度的组蛋白、抗菌肽等抗菌物质杀灭病原微生物 [14]。其中, 组蛋白能抵抗激活蛋白 C (activated protein C, APC) 的降解, 从而增强 NETs 的生物活性, 且过氧化物在 MPO 的作用下转变为具有杀菌作用的次氯酸 (hypochlorous acid, HClO), 增强杀灭病原的作用。NETs 在机体内功能强大, 可以在感染部位杀灭多种病原微生物, 包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和寄生虫, 如炭疽芽孢杆菌、酿脓链球菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、烟曲霉、白色念珠菌和利什曼原虫, 甚至包括人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) [15-20]。除此以外, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、佛波酯 (PMA)、干扰素等多种因素均能激活 PMN 形成 NETs [21]。

## 2 影响 NETs 形成的因素

机体内的多种物质包括活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)、MPO、乙酰乙酸 (ACAC)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 等均会影响 NETs 的形成。机体内的还原性辅酶 II (NADPH) 活化后产生 ROS, 而 NETs 的形成与 ROS 的产生关系密切。慢性肉芽肿病 (chronic granulomatous disease, CGD) 是常见 PMN 功能障碍的原发性免疫缺陷病。CGD 患者体内缺乏 NADPH, 进而破坏 PMN 产生 ROS 的能力, 导致 CGD 患者体内的 PMN 无法释放 NETs。然而, 在外源性过氧化物刺激后, 代替体内 NADPH 的作用, NETs 可顺利释放 [22]; MPO 缺陷患者在 PMA 的刺激下产生 NETs 的能力明显不足, 并且其产生水平与 MPO 缺乏程度相关 [23]; MPO 同样影响 NETs 的释放, 完全缺乏 MPO 患者体内无法形成 NETs, 而正常 MPO 含量的 3% 足以保证 PMA 诱导生成 NETs [24-27]; 血液中高浓度的 ACAC 可导致影响 NETs 出现的关键性瓜氨酸化组蛋白 H3 和 MPO 含量上升, 从而诱导 PMN 释放 NETs [28]; 当机体发生脓毒性休克时, 血小板中的 TLR4 被激活, 诱导血小板与粘附在窦状细胞上的 PMN 结合, PMN 顺利释放 NETs。从患者体内分离出的 PMN 经 LPS 诱导后无法形成 NETs, 这表明血小板中的 TLR4 对于 LPS 诱导的 PMN 释放 NETs 是必要的 [29]。

## 3 NETs 的双刃剑作用

当病原微生物进入机体后, NETs 既可以高效地杀灭病原, 同时也会对机体产生负面作用。NETs 的

抗菌机制是以损害内皮细胞和组织为代价的,如果 PMN 释放的 NETs 过量或不能及时降解,将转化为自身抗原,诱导机体产生自身免疫性疾病<sup>[30-31]</sup>。

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 的一个特征是机体内自身的持续炎症反应,且由 PMN 释放的 NETs 是 SLE 患者的一个典型自身抗原。LEFFLER 等<sup>[32]</sup>研究发现,在体外激活补体和沉积的血清补体 C1q 将抑制 NETs 降解,补体沉积在 NETs 上可促进自身抗体的产生,结合自身抗体后抑制降解,进一步增加血清补体 C1q 的沉积,导致疾病恶化。NETs 的降解能力随病情的好转而恢复至正常水平,但是仅在 NETs 过量产生的刺激下不足以引起 SLE 的发生,可能还需要机体内其他病原分子相关模式的刺激及细胞炎症通路的活化<sup>[33]</sup>。小血管炎 (ANCA-associated vasculitides, AAV) 是一种自身免疫性疾病,覆盖全身多个系统,抗中性粒细胞胞浆抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 主要作用于 MPO 和中性粒细胞表面靶抗原蛋白酶 3 (protease 3, PR3),该过程可引发 CGD、坏死性血管炎及微小多动脉炎等疾病。KESSENBRÖCK 等<sup>[34]</sup>发现 TNF- $\alpha$  可被 ANCA 激活,从而引起 NETs 的产生。NETs 存在特异靶抗原 PR3、MPO 并呈递给树突状细胞,导致持续产生 NETs,而导致 AAV 进一步恶化。而 NAKAZAWA 等<sup>[35]</sup>研究发现,用丙硫氧嘧啶 (PTU) 和 MPA 刺激中性粒细胞后,释放 NETs。利用脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 难以将 NETs 降解,其产生的 MPO-ANCA 同样可引发 AAV。类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的特征是以多关节滑膜炎为主的慢性、全身性、自身免疫性疾病,陈本露<sup>[36]</sup>通过检测 RA 患者患处 NETs 的双链 DNA 含量,发现 RA 患者的 NETs 含量明显高于常人,中性粒细胞中的肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptide-acylarginine deiminase 4, PAD4) mRNA 的表达也有所上升,同时外周血单个核细胞中瓜氨酸化组蛋白含量也高于常人。患者体内瓜氨酸化组蛋白的抗体可结合 NETs,导致中性粒细胞持续释放 NETs,形成恶性循环,加重 RA 患者的病情<sup>[37]</sup>。

## 4 结论与展望

综上所述,中性粒细胞所释放的 NETs 参与机体内多种免疫反应。尽管 NETs 的过量产生会导致机体免疫性疾病的发生,但其仍为机体清除病原微生物做出了突出贡献。NETs 的释放过程受体内多种因素影响,且常以中性粒细胞的死亡为代价。首先细胞核内的结构开始裂解,随后核内染色质与蛋白混合,多种蛋白镶嵌在 DNA 骨架上形成 NETs。从释放至到达感染部位期间,NETs 的完整性从未被破坏,当捕获到病原微生物后,释放高浓度的抗菌物质,以达到杀菌的效果。由于 NETs 的抗菌机制在机体杀灭病原微生物的同时还损伤内皮细胞及组织,因此,若 NETs 不能及时清除,同样会对机体造成伤害,引起自身免疫系统疾病,故 NETs 是一把双刃剑。

中性粒细胞随血液遍及机体的各个器官,而目前普遍认为 NETs 的释放依赖于 ROS,并且 ROS 在机体中广泛存在,明确 ROS 在 NETs 产生过程中的具体机制是下一步研究的重点。中性粒细胞在体内存在时间短暂,难以利用基因技术操控。随着研究的深入,应当逐步明确调控 NETs 产生的相关信号通路,应用在与之相关的自身免疫性疾病及其他临床治疗方面,实现趋利避害。

### [参考文献] (References)

- [1] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [2] CHUAMMITRI P, OSTOJIC J, ANDREASEN C B, et al. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2009, 129(1): 126-131.
- [3] PALIC D, OSTOJIC J, ANDREASEN C B, et al. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish

- neutrophils[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(8): 805-816.
- [4] WARTHA F, BEITER K, NORMARK S, et al. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(1): 52-56.
- [5] STEINBERG B E, GRINSTEIN S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death[J]. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007, 2007(379): pe11.
- [6] SHARMA R, O'SULLIVAN K M, HOLDSWORTH S R, et al. Visualizing macrophage extracellular traps using confocal microscopy[J]. *J. Vis. Exp.*, 2017(128). doi: 10.3791/56459.
- [7] von KÖCKRITZ-BLICKWEDE K M, GOLDMANN O, THULIN P, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation[J]. *Blood*, 2008, 111(6): 3070-3080.
- [8] YOUSEFI S, GOLD J A, ANDINA N, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense[J]. *Nature Medicine*, 2008, 14(9): 949-953.
- [9] PIJANOWSKI L, GOLBACH L, KOLACZKOWSKA E, et al. Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1244-1252.
- [10] NARASARAJU T, YANG E, SAMY R P, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis[J]. *American Journal of Pathology*, 2011, 179(1): 199-210.
- [11] MARCOS V, ZHOU-SUCKOW Z, ÖNDER Y, et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015(20): 1-11.
- [12] DELGADO-RIZO V, MARTÍNEZ-GUZMÁN M A, IÑIGUEZ-GUTIERREZ L, et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017(8): 1-20
- [13] 周剑涛, 丁海峰, 夏瑾燕. 组蛋白瓜氨酸化介导中性粒细胞胞外诱捕网形成[J]. *生命的化学*, 2009, 29(4): 495-497.
- ZHOU J T, DING H F, XIA J Y. Histone citrullination mediates neutrophil extracellular trap formation[J]. *Chemistry of Life*, 2009, 29(4): 495-497. (in Chinese)
- [14] SEELEY E J, MATTHAY M A, WOLTERS P J. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2012, 303(5): L355-L363.
- [15] YOUNG R L, MALCOLM K C, KRET J E, et al. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23637.
- [16] PILSCZEK F H, SALINA D, POON K K, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(12): 7413-7425.
- [17] WALTER A M, WIEDERHOLD K, BRUNS D, et al. Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin-SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 188(3): 401-413.
- [18] URBAN C F, REICHARD U, BRINKMANN V, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms[J]. *Cellular Microbiology*, 2010, 8(4): 668-676.
- [19] GUIMARÃES-COSTA A B, NASCIMENTO M T, FROMENT G S, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(16): 6748-6753.
- [20] 吴腾飞, 陈福广, 黄清华, 等. 中性粒细胞杀灭病原体的新途径: 胞外诱捕网[J]. *免疫学杂志*, 2013(2): 173-176.
- WU T F, CHEN F G, HUANG Q H, et al. A new strategy for eliminating invading microbes by neutrophil: extracellular traps[J]. *Immunological Journal*, 2013(2): 173-176. (in Chinese)
- [21] KESHARI R S, JYOTI A, DUBEY M, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48111.
- [22] SEGAL B H, VEYS P, MALECH H, et al. Chronic granulomatous disease: lessons from a rare disorder[J]. *Biology of Blood & Marrow Transplantation*, 2011, 17(1): S123-S131.
- [23] ALMYROUDIS N G, GRIMM M J, DAVIDSON B A, et al. NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense,

- inflammation, and injury[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 45.
- [24] AKONG-MOORE K, CHOW O A, KÖCKRITZ-BLICKWEDE M, et al. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42984.
- [25] PALMER L J, COOPER P R, LING M R, et al. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2012, 167(2): 261-268.
- [26] PARKER H, DRAGUNOW M, HAMPTON M B, et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus[J]. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, 92(4): 841-849.
- [27] PAPAYANNOPOULOS V, METZLER K D, HAKKIM A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191(3): 677-691.
- [28] 崔媛旭, 张强, 范古玥, 等. 高乙酰乙酸诱导中性粒细胞胞外诱捕网的形成[J]. *中国兽医学报*, 2018 (4): 791-794.  
CUI Y X, ZHANG Q, FAN G Y, et al. High acetoacetate induces the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018(4): 791-794. (in Chinese)
- [29] CLALARK S R, MA A C, TAVENER S A, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(4): 463-469.
- [30] LIN A M, RUBIN C J, KHANDPUR R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187(1): 490-500.
- [31] 谢戩芳, 陈俊伟, 李小峰. 中性粒细胞胞外诱捕网在系统性红斑狼疮发病机制中的作用[J]. *中国药物与临床*, 2016, 16 (3): 350-352.  
XIE J F, CHEN J W, LI X F. The role of neutrophil extracellular network in pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Chinese Remedies & Clinics*, 2016, 16(3): 350-352. (in Chinese)
- [32] LEFFLER J, MARTIN M, GULLSTRANG B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(7): 3522-3531.
- [33] LIU C L, TANGSOMBATVISIT S, ROSENBERG J M, et al. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14(1): R25.
- [34] KESSENBROCK K, KRUMBHOLZ M, SCHÖNERMARCK U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(6): 623-625.
- [35] NAKAZAWA D, TOMARU U, SUZUKI A, et al. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2012, 64(11): 3779-3787.
- [36] 陈本露. 中性粒细胞胞外诱捕网与类风湿关节炎发病机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.  
CHEN B L. PAD4 probably play an important role in rheumatoid arthritis by involving in the formation of the neutrophil extracellular traps[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2015. (in Chinese)
- [37] DWIVEDI N, UPADHYAY J, NEELI I, et al. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2012, 64(4): 982-992.

(责任编辑: 段桃)