

## 中性粒细胞胞外陷阱在脓毒症发病机制中的作用

欧伟良<sup>1</sup>, 张媛莉<sup>2\*</sup> (1. 广东医科大学, 广东湛江 524000; 2. 广东医科大学附属医院重症医学科, 广东湛江 524001)

**摘要:** 脓毒症的发病机制非常复杂, 研究发现脓毒性休克患者血浆中的中性粒细胞胞外陷阱(NET)成分显著增加, 与疾病严重程度和28 d死亡率呈正相关。NET被证实在推动脓毒症进展过程中发挥重要作用。该文对NET在脓毒症发病中的相关研究进行综述。

**关键词:** 脓毒症; 脓毒性休克; 中性粒细胞; 中性粒细胞胞外陷阱; 血小板

**中图分类号:** R 515.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610 (2023) 03-0340-04

### Role of neutrophil extracellular trap in the pathogenesis of sepsis

OU Wei-liang<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-li<sup>2\*</sup> (1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China; 2. Department of Intensive Care Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

**Abstract:** The pathogenesis of sepsis is very complicated. It has been found that the neutrophils extracellular trap (NET) components in the plasma have significantly increased in patients with septic shock, which was positively correlated with disease severity and 28-day mortality. NET has been proved to play an important role in promoting the progression of sepsis. This paper reviewed the relevant studies on NET in the pathogenesis of sepsis.

**Key words:** sepsis; septic shock; neutrophil; neutrophil extracellular traps; platelet

脓毒症是机体由于感染引起病理生理学异常及严重器官功能障碍的临床综合症, 住院病死率高<sup>[1-2]</sup>。脓毒症的发病机制非常复杂, 其分子机制仍有待充分阐明<sup>[3]</sup>, 其中中性粒细胞胞外陷阱(NET)是近年来的研究热点。本文就NET在脓毒症发病机制中的作用作一综述。

#### 1 NET在脓毒症中的抗菌作用

早在1996年人们发现了NET<sup>[4]</sup>, Brinkmann等<sup>[5-7]</sup>对其进行了进一步的研究, 并将其称为NETosis过程。中性粒细胞为短暂存活的粒细胞, 是抵抗入侵病原体的最初防御。它们通过吞噬、脱颗粒产生活性氧、趋化因子和细胞因子来招募其他免疫细胞, 最大限度地提高宿主的免疫反应, 从而实现这一目的<sup>[8]</sup>。NET的形成通过识别刺激物激活中性粒细胞, 并通过蛋白激酶C(PKC)-Raf/MERK/ERK激活NADPH氧化酶(NOX)复合体<sup>[9]</sup>, 进而激活髓过氧化物酶(MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)和精氨酸脱氨酶4型

(PAD4)<sup>[10]</sup>。PAD4催化组蛋白的瓜氨酸化并促进染色质去凝聚, 而活性氧通过膜孔释放细胞外的染色质, 诱导核膜逐渐分离和丢失, 从而促进NETosis。细胞溶解并最终释放DNA、瓜氨酸化组蛋白(CitH3)和其他细胞内颗粒形成NET<sup>[11]</sup>。中性粒细胞通过释放由组蛋白修饰的细胞外染色质和许多颗粒蛋白组成的NET来增强其抗菌性能<sup>[6]</sup>, 并被鉴定为先天免疫反应的一部分, 这种免疫反应可能是有益的, 也可能是病理性的。

NET成分包括组蛋白、组织蛋白酶G、NE、MPO、乳铁蛋白、抗菌肽-LL37等等, 这些蛋白均具有杀菌作用<sup>[5]</sup>。Vidal等<sup>[12]</sup>研究也证明, NET能够限制细菌生长或杀死细菌, 包括福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等。

#### 2 NET在脓毒症中的病理作用

有研究表明, 过度的NET形成在感染性和非感染性疾病中都有病理性作用, 但不限于血栓形成、糖

收稿日期: 2022-12-13

作者简介: 欧伟良(1996-), 男, 在读硕士研究生, E-mail: 545370301@qq.com

通信作者: 张媛莉(1970-), 女, 博士, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: zhangyuanly@126.com

尿病、血管炎和癌症<sup>[3, 13]</sup>。随着研究的深入探索,越来越多的学者发现,NET在脓毒症中可能发挥了消极作用,反而促进炎症的发生和发展。一项在肺炎或脓毒症的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者中,对照实验通过ELISA技术检测发现血浆NET水平的增加和ARDS的严重程度与死亡率的增加有关,并且在严重细菌性肺炎、急性肺损伤的小鼠模型中使用DNA酶I(DNase I)治疗可减少NET和肺损伤<sup>[14]</sup>。Nomura等<sup>[15]</sup>发现在脓毒症小鼠模型中通过免疫组化观察到肝脏中CitH3、NE和MPO水平高,在造模4h后给予西洛他唑治疗,一种磷酸二酯酶III抑制剂对肝窦内皮细胞具有保护作用的药物,可显著减少NET生成和防止脓毒性肝损伤。一项对重症监护病房脓毒性休克患者的小队列研究发现,循环NET生物标记物(游离DNA/髓过氧化物酶复合物)水平的增加与脓毒性休克患者的器官功能障碍严重程度和28d死亡率相关<sup>[16-19]</sup>。由此可见,NET的水平增加与病情加重有关,其中的机制研究中以NET在脓毒症中的血管内凝血反应和肠道炎症反应最受关注。

### 2.1 NET促进脓毒症血管内凝血反应的作用

过度形成的NET在脓毒症中会促进凝血和血栓形成,主要通过两个方面,一是血小板-中性粒细胞相互作用诱导NET的释放,后者促进血栓形成;二是NET中各种蛋白水解成分通过多种途径激活血管内凝血。Peters等<sup>[20]</sup>在脓毒症患者的血液中发现循环血小板-中性粒细胞复合物,它是活化的中性粒细胞的一个子集,具有更强的粘附、吞噬和产生超氧物的能力。血小板通过凝血酶和其他介质激活血小板 $\alpha$ 颗粒释放或通过与基质接触,包括胶原蛋白和纤维蛋白原,并与之结合释放P-选择素。血小板在循环中通过P-选择素和中性粒细胞上发现P-选择素糖蛋白配体-1与中性粒细胞结合,形成血小板-中性粒细胞复合物,而在当时缺乏证据证实血小板-中性粒细胞复合物、NET和血管内凝血反应之间的关系。随着实验和临床研究的进展,Boufenzler等<sup>[21]</sup>发现在小鼠脓毒症期间,血小板和NET协同促进血管内凝血。在脓毒症小鼠模型中,使用多色共焦活体内显微镜,在体内观察到NET内的血小板聚集、凝血酶激活和纤维蛋白凝块形成,且在脓毒症小鼠模型中,无论是否存在刺激性细菌刺激条件下,通过输注DNase I或PAD4缺陷小鼠(其NET生成受损)去除NET,导致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,在体内感染模型中证明动态NET-血小板-凝血酶轴,在脓毒

症中促进血管内凝血和微血管功能障碍,也证明NET的作用独立于细菌刺激,脓毒症诱导的凝血功能障碍是失调宿主反应的并发症。Elaskalani等<sup>[22]</sup>在一项研究中发现,将无细胞NET[从佛波酯(PMA)刺激的中性粒细胞中收集]与人血小板共孵育,其中单独存在的NET(即未添加其他血小板激动剂)可促进血小板聚集。事实上,血小板通过与中性粒细胞结合形成血小板-中性粒细胞复合物后产生诱导NET释放,后者直接促使血小板进一步聚集。并且在NET和血小板之间存在正反馈回路。从而血管系统内血小板-中性粒细胞-NET的极大的形成刺激了血管内凝血的激活和传播。

此外,NET各种蛋白水解成分可能通过多种途径激活血管内凝血,例如,组织蛋白酶G激活蛋白酶激活受体4,它是人类血小板表达并介导凝血酶信号的蛋白酶激活受体,同时介导组织蛋白酶C激活人类血小板,引起体内血小板分泌和聚集<sup>[23]</sup>。在炎症环境中,蛋白酶激活受体-1(PAR1)是一种蛋白水解激活的G蛋白偶联受体,在大量中性粒细胞浸润的部位表达。NE通过沉默PAR1钙信号和激活MAPK通路来调节PAR1信号,介导血小板聚集<sup>[24]</sup>。总之,这些发现表明微血管血栓形成恶性循环,NET各种蛋白水解成分活化血小板,血小板聚集在中性粒细胞表面,并激活NET释放,进而直接促使血小板进一步聚集。

### 2.2 NET促进脓毒症肠道炎症反应的作用

研究发现,NET的增加会推动脓毒症肠道失调的进展。肠上皮细胞在维持肠内稳态方面发挥着重要作用,肠内稳态依赖于适当的内质网功能来进行适当的蛋白质折叠、修饰和分泌。具有干扰内质网功能的外源性或内源性危险因素可损害肠屏障功能并激活宿主的炎症反应,被称为“内质网应激”<sup>[25]</sup>。持续的内质网应激可通过多种机制引发炎症,包括产生活性氧。肠道屏障的破坏可能使许多细菌和毒素进入内部环境,导致致命的脓毒症,甚至导致多器官功能障碍综合征<sup>[26]</sup>。有报道称,NET的形成增加与肠道炎症有关,NET可能会推动脓毒症肠道失调的进展。Sun等<sup>[27]</sup>于2021年在肠道穿孔引起腹腔内感染的脓毒症患者的肠活检样本中,通过ELISA首次发现循环NET生物标志物水平增加,与内质网应激激活水平(肠损伤的生物标志物)呈正相关,以及在脂多糖(LPS)诱导脓毒性休克模型中比较PAD4缺陷小鼠和野生型小鼠中,发现PAD4缺陷小鼠抑制NET可改善脓毒症引起的肠屏障功能障碍、内质网应激激活和活性氧生成。此外,抑

制内质网应激和活性氧可减轻NET诱导的肠上皮细胞死亡; Toll样受体9 (TLR9)拮抗剂显著抑制NET诱导的肠损伤和内质网应激激活。其表明,在脓毒症的情况下,增加的中性粒细胞在肠道内迁移和聚集并形成和释放NET。过度的NET形成可激活TLR9-内质网应激-活性氧信号通路,从而增强肠上皮细胞凋亡和炎症反应。不受控制的肠上皮细胞损伤导致肠屏障破坏,导致细菌移位,进而促进肠道炎症反应,形成恶性循环<sup>[27]</sup>。

### 3 治疗

目前还没有针对脓毒症的特殊治疗方法。临床干预包括抗炎治疗,如皮质类固醇、抗生素、液体复苏和机械通气。而抑制NET形成和/或增强NET降解可能是脓毒症发病的关键事件。Okeke等<sup>[28]</sup>在2020年证明纳米颗粒介导的西维来司他,它是NE的抑制剂,在脂多糖诱导的脓毒性休克小鼠模型中,通过抑制NE来减少NET的形成,可改善肺损伤的临床症状,并提高脓毒性休克小鼠的生存率。Gollomp等<sup>[29]</sup>在2020年发现使用一种Fc修饰HIT样单克隆抗体与血小板因子4-中性粒细胞胞外陷阱复合物结合,进一步增强NET的DNA酶抗性,减少NET降解产物的生成,可改善脓毒症小鼠模型的不良预后。Boufenzler等<sup>[21]</sup>在2021年报道了髓样细胞-1抑制药物在动物试验中模拟感染性休克期间降低NETosis,可改善血管功能,减少器官损伤和脓毒症死亡率。

此外,也有研究通过减少血小板的生成以抑制NET的形成作为治疗脓毒症的策略。血小板已被证明是在脓毒症期间NET形成的有效激活剂<sup>[30]</sup>。先前的研究已证明,在多发性肺损伤小鼠模型中,血小板耗竭可抑制NET的形成并改善肺损伤<sup>[31]</sup>。最近,研究发现NET的形成在很大程度上依赖于脓毒症患者的血小板。血小板耗竭小鼠模型可降低脓毒症后NET的形成和肺损伤,增加肺部的细菌负荷<sup>[32]</sup>。血小板可以作为减少NET产生从而减轻器官损伤的靶点,但会导致出血的副作用。将来生物工程是否可以模拟血小板耗竭机制来阻断NET的形成,同时不会导致真正的血小板减少而引起出血,值得进一步的探索。

### 4 结语

中性粒细胞在脓毒症发病机制中的作用是毋庸置疑,而由中性粒细胞释放的NET,除了作为一种负责清除病原体的先天免疫防御机制外,在脓毒症中更多的是通过促进血管内凝血反应和微血管功能障碍以及

肠屏障功能障碍而导致加剧病情。

目前,研发针对NET特定通路的化合物具有治疗潜力,但现有的临床试验中,以单独针对NET或单独针对血小板为治疗靶点,尚未在临床治疗中得到证实。在接下来的研究中应考虑阻断NET-血小板-凝血酶轴这一病理轴,以生物工程模拟血小板耗竭机制来阻断NET的形成,同时避免血小板减少引起的出血,可能为脓毒症提供一种新的治疗策略,为脓毒症治疗潜在靶点的探索提供理论支持。

### 参考文献:

- [1] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI N K, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [2] TIDSWELL R, INADA-KIM M, SINGER M. Sepsis: The importance of an accurate final diagnosis[J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 9(1): 17-18.
- [3] CHEN L, ZHAO Y, LAI D, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 597.
- [4] TAKEI H, ARAKI A, WATANABE H, et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis[J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 59(2): 229.
- [5] BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?[J]. *J Cell Biol*, 2012, 198(5): 773-783.
- [6] BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 577-582.
- [7] URBAN C, ZYCHLINSKY A. Netting bacteria in sepsis[J]. *Nat Med*, 2007, 13(4): 403-404.
- [8] SCAPINI P, CASSATELLA M A. Social networking of human neutrophils within the immune system[J]. *Blood*, 2014, 124(5): 710-719.
- [9] SMITH C K, VIVEKANANDAN-GIRI A, TANG C, et al. Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: An additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(9): 2532-2544.
- [10] HAWEZ A, AL-HAIDARI A, MADHI R, et al. MiR-155 regulates PAD4-dependent formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2462.
- [11] REEVES E P, LU H, JACOBS H L, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux[J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 291-297.
- [12] VIDAL D R, MARTÍNEZ-GUZMÁN M A, LILIANA I G,

- et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 81.
- [13] JORCH S K, KUBES P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(3): 279.
- [14] LEFRANÇAIS E, MALLAVIA B, ZHUO H, et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e98178.
- [15] NOMURA K, MIYASHITA T, YAMAMOTO Y, et al. Citrullinated histone H3: Early biomarker of neutrophil extracellular traps in septic liver damage[J]. *J Surg Res*, 2019, 234: 132-138.
- [16] MARUCHI Y, TSUDA M, MORI H, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 176.
- [17] TIAN Y, RUSSO R M, LI Y, et al. Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic versus non-septic shock and correlate with disease severity[J]. *Infection*, 2021, 49(1): 83-93.
- [18] PAN B, LI Y, LIU Y, et al. Circulating CitH3 is a reliable diagnostic and prognostic biomarker of septic patients in acute pancreatitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 766391.
- [19] LI Y, LIU Z, LIU B, et al. Citrullinated histone H3: A novel target for the treatment of sepsis[J]. *Surgery*, 2014, 156: 229-234.
- [20] PETERS M J, DIXON G, KOTOWICZ K T, et al. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing[J]. *Br J Haematol*, 1999, 106(2): 391-399.
- [21] BOUFENZER A, CARRASCO K, JOLLY L, et al. Potentiation of NETs release is novel characteristic of TREM-1 activation and the pharmacological inhibition of TREM-1 could prevent from the deleterious consequences of NETs release in sepsis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(2): 452-460.
- [22] ELASKALANI O, ABDOL RAZAK N B, METHAROM P. Neutrophil extracellular traps induce aggregation of washed human platelets independently of extracellular DNA and histones[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 24.
- [23] SAMBRANO G R, HUANG W, FARUQI T, et al. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 6819-6823.
- [24] MIHARA K, RAMACHANDRAN R, RENAUX B, et al. Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger G protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (PAR1)[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 32979-32990.
- [25] MA X, DAI Z, SUN K, et al. Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease pathogenesis: An update review[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1271.
- [26] CATALIOTO R M, MAGGI C A, GIULIANI S. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutic interventions[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(3): 398-426.
- [27] SUN S, DUAN Z, WANG X, et al. Neutrophil extracellular traps impair intestinal barrier functions in sepsis by regulating TLR9-mediated endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 606.
- [28] OKEKE E B, LOU TIT C, FRY C, et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock[J]. *Biomaterials*, 2020, 238: 119836.
- [29] GOLLOMP K, SARKAR A, HARIKUMAR S, et al. Fc-modified HIT-like monoclonal antibody as a novel treatment for sepsis[J]. *Blood*, 2020, 135(10): 743-754.
- [30] CARESTIA A, KAUFMAN T, SCHATTNER M. Platelets: New bricks in the building of neutrophil extracellular traps[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 271.
- [31] ROSSAINT J, HERTER J M, VAN AKEN H, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation[J]. *Blood*, 2014, 123(16): 2573-2584.
- [32] VAN DER MEIJDEN P E J, HEEMSKERK J W M. Platelet biology and functions: New concepts and clinical perspectives[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(3): 166-179.