

中性粒细胞胞外诱捕网在肺部疾病中作用的研究进展

丁雨, 吴艳, 卞涛*

南京医科大学附属无锡人民医院 呼吸与危重症科, 江苏 无锡 214023

摘要: 中性粒细胞是肺部的常驻免疫细胞, 受到刺激后, 可释放含有中性粒细胞弹性蛋白酶、髓过氧化物酶、瓜氨酸组蛋白、细胞骨架蛋白的解凝染色质, 即中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs)。NETs 在肺部疾病中发挥抗感染作用, 但过量的 NETs 释放也会导致肺部组织损伤、炎症反应增强和促进肿瘤转移。本文简要总结 NETs 的相关研究进展, 为研发治疗肺部疾病的潜在药物提供新的思路。

关键词: 中性粒细胞胞外诱捕网; 肺部疾病

中图分类号: R56 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.03.481

Research progress on the role of neutrophil extracellular traps in lung diseases

DING Yu, WU Yan, BIAN Tao*

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

Abstract: Neutrophils are resident immune cells in the lung, which can release decondensed chromatin containing neutrophil elastases, myeloperoxidases, citrullinated histones and cytoskeletal proteins upon stimulation, namely neutrophil extracellular traps (NETs). NETs play an anti-infective role in lung diseases. But excessive NETs release potentially leads to cause lung tissue injury, enhances inflammatory response and promotes tumor metastasis. These results of research provide some new ideas for the development of potential drugs.

Key words: neutrophil extracellular traps; lung disease

中性粒细胞是对抗入侵病原体的第一道防线, 同时也是参与适应性免疫应答、急性损伤修复、肿瘤等发生发展的免疫细胞。中性粒细胞受刺激后, 可通过吞噬、脱颗粒等方式发挥作用; 近年来发现中性粒细胞是以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶依赖为主要方式释放装饰有抗菌颗粒蛋白的解凝染色质而发挥作用的, 并将其称为中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular

traps, NETs), 这一过程被称为“NETosis”。最初发现 NETs 时, 认为其主要发挥中性粒细胞的传统功能, 即杀灭病原体 and 对抗感染, 但越来越多的研究表明大量中性粒细胞的 NETs 反应与许多疾病的不良预后有关, 特别是新型冠状病毒肺炎/感染 (corona virus disease 2019, COVID-19)、细菌性肺炎、慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘和肺部转移性肿瘤等肺部疾病。

收稿日期: 2022-01-10 修回日期: 2022-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (82173472)

* 通信作者 (corresponding author): biantaophd@126.com

1 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 概述

1.1 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 的形成

NETs 首次于 2004 年被发现并描述,病原体侵入肺部时,活化的中性粒细胞发挥抗感染的作用,除吞噬、脱颗粒外,同时也释放出 NETs^[1]。至今为止,除病原体外,佛波酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、一氧化氮、自身免疫相关抗体以及血小板等均可刺激中性粒细胞发生 NETosis。刺激因素不同,NETs 成分有差异,但 NETs 始终包含一组固定的蛋白质,如中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、瓜氨酸组蛋白 3 (citrulline histone 3, CITH3)、钙保护素、 α -防御素、抗菌肽和细胞骨架蛋白质等^[2]。

中性粒细胞受到刺激后,细胞膜上受体如 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptors, GPCRs),趋化因子和细胞因子受体、Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 和 Fc 受体将信号传入细胞内,氧化产物的上游分子 Raf-MEK-ERK 通路启动,随后的下游信号 NADPH 氧化酶复合物激活。NETs 的形成依赖于细胞骨架重排、糖酵解产生的 ATP 与线粒体功能障碍和 NADPH 氧化酶复合物激活状态下产生的高浓度活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[3]。ROS 产生后,NE 从膜相关复合物解离到细胞质中,并以依赖 MPO 的方式激活其蛋白水解活性,随后,NE 转位进入细胞核,NE 和 MPO 驱动染色质解凝和组蛋白切割,这可以由依赖肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) 的组蛋白瓜氨酸化支持,此外,也有 NE 和 PAD4 各自独立参与的途径被描述^[4]。抑制白细胞信号抑制受体-1 可以在不影响氧化产物的情况下阻止 NETs 的产生,最终的细胞裂解和 NETs 释放涉及 GasderminD,它能够在颗粒和质膜上形成孔,染色质和抗菌蛋白组成的混合物以囊泡的形式从中性粒细胞释放到胞外,形成 NETs,这种 NETs 的形成最终导致细胞死亡,通常被描述为溶解性 NET 释放或 NETosis,此过程一般需要 3~8 h,是 NETs 形成的主要方式^[5]。

1.2 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 的降解

NETs 可以被脱氧核糖核酸酶 (DNase) 降解,生理量的 DNase 不足以在体外完全降解 NETs,树突状细胞和巨噬细胞在 NETs 的降解中发挥着重要作用,巨噬细胞以依赖抗菌肽 LL-37 复合物的方式吞噬 NETs,巨噬细胞对 NETs 的降解依赖于 TREX1 (也称为 DNase III)、DNase1 和 DNase1L3,其中, DNase1L3 由树突状细胞产生, DNase1L3 与 DNase1 一起成为重要的细胞外 NETs 降解核酸酶, TREX1 参与巨噬细胞吞噬 NETs 后的细胞内降解^[6]。关于 NETs 这些细胞外结构的具体清除机制,目前所知甚少。因此,探索 NETs 清除和降解的机制可能有助于理解炎症反应和自身免疫性疾病,并为未来的治疗提供新思路。

2 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 与感染性肺部疾病

2.1 抑制 NETs 可有效控制病毒感染

在感染性肺部疾病中,NETs 的产生增强和清除不足是导致组织损伤的关键驱动因素,当前的 COVID-19 大流行背景突出了探索 NETs 的重要性。COVID-19 危重患者血清诱导 NETs 释放^[7], NETs 与炎症反应严重程度和免疫介导的微血栓相关,并且可预测不良预后^[8]。

首先,在病毒入侵和轻微症状的初始阶段,NETs 的主要成分 NE 从细胞表面切割 S 蛋白进入细胞,增强病毒的感染性^[9]。同时中性粒细胞产生过量的 ROS,加重免疫反应。ROS 进一步促进 NETs 的产生,NETs 捕获病毒并阻止其传播。在涉及凝血异常和呼吸道症状的第二阶段,NETs 的细胞外阳离子组蛋白,发挥细胞毒活性,促进 IL-1 β 的生成,并通过激活 TLR2、TLR4 和 TLR9 介导促炎作用^[10]。NETs 能增强各种细胞因子的产生,包括 IL-1 β 和 TNF- α ,以增强炎症反应。此外,IL-1 β 和 TNF- α 作为主要激活因子,诱导 IL-6 水平升高^[11]。NETs 成分也可以通过炎症小体激活物和损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 介导补体激活促进炎症反应,导致细胞凋亡和纤维化,近期发现, SARS-CoV-2 可通过血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 和丝氨酸蛋白酶活性轴刺激中性粒细胞释放 NETs,

NETs 直接诱导肺上皮细胞死亡^[12]。在全身血栓形成和炎性反应的第三阶段,随着炎性反应进一步增强,更多的中性粒细胞被招募,巨噬细胞清除 NETs 的能力受损,二者共同导致了高水平的 NETs。NETs 的抗菌肽 LL-37 和 MPO 引起免疫细胞趋化并使巨噬细胞极化成 M1 型巨噬细胞,巨噬细胞分泌促炎物质加重炎性反应和肺损伤^[13]。此外,NETs 通过 TLR4/TLR9/NF- κ B 信号通路触发巨噬细胞中 NLRP3 炎性小体激活和 IL-1 β 释放,随后,大量的细胞因子又反过来促进了 NETs 的产生^[14]。表明作用于巨噬细胞的 NETs 与促炎细胞因子的增加有关,而促炎细胞因子导致了 NETs 形成的失调,进一步形成细胞因子风暴,维持异常的全身炎性反应。

事实上,抑制中性粒细胞和 NETs 在各种流感病毒相关急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)中具有保护作用,其他大流行性病毒,包括 H1N1 流感、SARS 冠状病毒和中东呼吸综合征冠状病毒,都与感染部位的中性粒细胞浸润和 ARDS 的发展有关。因此,抑制 NETs 是治疗包括 COVID-19 在内的病毒性感染的一个潜在治疗靶点。

2.2 细菌降解 NETs 实现免疫逃逸

NETs 在几种与细菌相关的肺部疾病中发挥抗感染的作用,一些细菌已经进化出了避免被 NETs 捕获和杀死的策略。例如:铜绿假单胞菌是临床上导致院内感染的重要条件^[15],严重的铜绿假单胞菌感染在免疫功能低下的个体中普遍存在,包括中性粒细胞减少、严重烧伤、囊性纤维化和慢性阻塞性肺疾病患者,此外,铜绿假单胞菌导致的机械通气相关肺炎在危重患者导致高发病率和病死率。铜绿假单胞菌分泌大量的胞外蛋白酶,使其能够逃脱宿主的免疫攻击,如弹性蛋白酶和碱性蛋白酶(AprA)。AprA 是一种由 I 型分泌系统分泌的金属蛋白酶。首先,AprA 降解 NETs 组分,帮助介导铜绿假单胞菌的免疫逃逸。其次,AprA 诱导产生抗体,抗体作为激动剂,又增强 AprA 的活性,进一步帮助逃脱,但铜绿假单胞菌逃脱 NETs 杀伤的更加确切的机制尚不明确^[16]。因此,针对其他铜绿假单胞菌产生的酶抗体是否也有类似的效应,还有待进一步研究。

3 中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)与慢性气道炎性疾病

3.1 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)

COPD 发病率、病死率和所致的经济负担是全球共同关注的重大问题,中性粒细胞被认为是 COPD 患者气道炎性反应的关键介质。尤其是 Ig 样凝集素 F (SiglecF) 中性粒细胞在加重气道炎性反应中发挥重要作用。空气污染物通过细胞外三磷酸腺苷传递 DAMP 信号诱导中性粒细胞上 SiglecF 的表达,中性粒细胞释放 NETs 和产生半胱氨酰白三烯来促进 2 型和 3 型免疫应答,加重 COPD 气道炎性反应^[17]。

目前,使用支气管扩张剂和糖皮质激素是治疗 COPD 主要的治疗方法。在慢性炎性反应的整个过程中,COPD 患者的严重程度与气道内 NETs 水平呈正相关,因此,新型 NETs 靶向疗法可能是治疗 COPD 的一种富有前景的方法,但直接靶向 NETs 是否能抑制 COPD 患者的病情发展,目前尚不清楚。

3.2 支气管哮喘

支气管哮喘是一种慢性气道炎性反应起关键作用的异质性疾病,当各种过敏原刺激机体时,循环中的中性粒细胞在 IL-6、IL-8 等细胞因子的诱导下聚集到气道浸润并激活^[18]。LPS 诱导形成的 NETs 可以直接或间接地损伤了肺上皮紧密连接蛋白 occludin,加剧中性粒细胞为主导的过敏性气道炎性反应的严重程度,由此推断 NETs 可能是通过破坏肺上皮的紧密连接参与严重哮喘发病机制^[19]。NETs 也刺激巨噬细胞分泌 IL-1 β ,促进中性粒细胞在气道的浸润,浸润的中性粒细胞产生 NETs,可放大 NETs 和巨噬细胞造成的组织损伤,诱导和加重中性粒细胞型哮喘(neutrophil-dominated asthma, NA),即 NETs 通过巨噬细胞促进 NA 发病^[20]。此外,嗜酸细胞胞外陷阱(eosinophil extracellular traps, EETs)与嗜酸粒细胞型哮喘严重程度有关,EETs 通过整合免疫和神经信号以推动哮喘进展^[21]。

在治疗方面,研究发现哮喘以循环中 CITH3 增加为特征,这可能与细胞胞外陷阱(ETs)形成有关。抑制 ETs 可能是特定哮喘表型(如中性粒细胞哮

喘)的治疗选择,这也为治疗哮喘提供了新的思路。

4 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 与肿瘤相关性肺部疾病

在小鼠和人类中,中性粒细胞是主要的白细胞群体,中性粒细胞在肿瘤生长和转移过程中发挥着重要作用。晚期肺癌和结肠癌患者体内循环 NETs 水平升高,利用小鼠肺癌和结肠癌模型,发现阻断 NETosis 显著抑制肺和肝脏的自发转移。此外,乳腺癌细胞分泌的组织蛋白酶 C (tumor-secreted protease cathepsin C, CTSC) 通过调节中性粒细胞的募集和 NETs 的形成促进了乳腺到肺的转移。同时揭示了一个有趣的新途径,CTSC 激活中性粒细胞膜结合蛋白酶 3 (PR3),从而促进 IL-1 β 加工和 NF- κ B 活化,最终上调 IL-6 和 CCL3 促进中性粒细胞募集。CTSC-PR3-IL-1 β 轴诱导 ROS 的产生和 NETs 的形成,这可促进肿瘤细胞在肺部的转移,抑制 CTSC 可以抑制实验性肺转移^[22]。但目前尚不清楚靶向 CTSC-PR3-IL-1 β -NET 通路的疗效是否仅限于防止肺转移,还是也可以防止其他组织的转移,该研究为今后的临床相关研究指明了方向。

除了发现 NETs 在癌转移中发挥作用外,肺癌细胞释放损伤相关分子模式高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1),HMGB1 也促进了 NETs 的形成^[23]。肺癌中细胞外 RNA 和 NETs 存在交互作用,非小细胞肺癌细胞比正常肺泡细胞有更高水平的和 NETs 相关的 lncRNA,经 NETs 刺激后,lncRNA 表达明显增

加,共 12 种 NETs 相关的 lncRNA 可以作为预测非小细胞肺癌患者生存的分子标志物^[24]。

综上所述,表明 NETs 靶向治疗可能限制转移和原发性肺癌,这些已在小鼠模型中得到证实。但同时,人类中性粒细胞和小鼠中性粒细胞释放 NETs 的能力明显不同,在研究肿瘤 NETosis (中性粒细胞的炎性细胞死亡方式)时应考虑物种间差异,并且目前为止还没有临床试验来评估靶向 NETs 对癌进展的影响。这些开创性的发现还需开展临床试验,以确定 NETs 靶向疗法是否可以减少转移。

5 问题与展望

自发现 NETs,关于 NETs 的形成和作用机制在肺部疾病中的研究越来越多,新型冠状病毒疫情的暴发更进一步推动了该方面的研究。NETs 发挥着双刃剑作用:NETs 在疾病的早期阶段发挥抗感染作用,然而,在疾病的晚期阶段,NETs 的抗菌成分不再能够对抗感染,而是造成自身组织损伤,因此,维持 NETs 平衡成为治疗肺部疾病的关键,促进研发更多潜在药物,如选择性 NETs 形成抑制剂或 NETs 相关蛋白抑制剂等,可以防止 NETs 对患者的有害影响,这可能将成为新兴的治疗手段。此外,目前的体外研究,多数是以非生理因素如 PMA 触发的实验结果,很可能不能代表体内的情况,并且在同一疾病的不同阶段,对 NETs 的研究很少,因此,进行更多的关于 NETs 对不同时期肺部疾病的研究也有助于加强对肺部疾病发病机制的理解,指导未来治疗的发展。

参考文献:

- [1] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science (American Association for the Advancement of Science), 2004, 303: 1532-1535.
- [2] Yang L, Shen X, Sun H, *et al.* Neutrophil extracellular traps in hepatocellular carcinoma are enriched in oxidized mitochondrial DNA which is highly pro-inflammatory and pro-metastatic[J]. J Cancer, 2022, 13: 1261-1271.
- [3] Nicchi S, Giusti F, Carello S, *et al.* Moraxella catarrhalis evades neutrophil oxidative stress responses providing a safer niche for nontypeable Haemophilus influenzae[J]. iScience, 2022, 25:103931.doi: 10.1016/j.isci.2022.103931.
- [4] Liu L, Mao Y, Xu B, *et al.* Induction of neutrophil extracellular traps during tissue injury: Involvement of STING and Toll-like receptor 9 pathways[J]. Cell Prolif, 2019, 52: e12579.doi: 10.1111/cpr.12775.
- [5] Chen KW, Monteleone M, Boucher D, *et al.* Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps[J]. Sci Immunol, 2018, 3. doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676.

- [6] Lazzaretto B, Fadeel B. Intra- and extracellular degradation of neutrophil extracellular traps by macrophages and dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2019, 203:2276-2290.
- [7] Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19[J]. *JCI Insight*, 2020. doi: 10.1172/jci.insight.138999.
- [8] Mehta P, McAuley DF, Brown M, *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression [J]. *Lancet*, 2020, 395: 1033-1034.
- [9] Thierry AR. Anti-protease treatments targeting plasmin (ogen) and neutrophil elastase may be beneficial in fighting COVID-19 [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100: 1597-1598.
- [10] Kasetty G, Papareddy P, Bhongir R, *et al.* Osteopontin protects against lung injury caused by extracellular histones[J]. *Mucosal Immunol*, 2019, 12: 39-50.
- [11] Pons S, Fodil S, Azoulay E, *et al.* The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection[J]. *Critical Care*, 2020, 24. doi: 10.1186/s13054-020-03062-7.
- [12] Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, *et al.* SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology[J]. *JEM*, 2020, 217. doi: 10.1084/jem.20201129.
- [13] Song C, Li H, Li Y, *et al.* NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization [J]. *ECR*, 2019, 382: 111486. doi: 10.1016/j. yexcr. 2019.06.031.
- [14] Liu D, Yang P, Gao M, *et al.* NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound[J]. *Clin Sci*, 2019, 133: 565-582.
- [15] 鄂顺梅, 鲁洋, 曾建明, 等. 铜绿假单胞菌的信号分子 3-oxo-C12-HSL 促进小鼠 MH-S 肺泡巨噬细胞自噬[J]. *基础医学与临床*, 2018; 38, 803-808.
- [16] Jing C, Liu C, Liu Y, *et al.* Antibodies against pseudomonas aeruginosa alkaline protease directly enhance disruption of neutrophil extracellular traps mediated by this enzyme [J]. *Front. Oncol*, 2021. doi: 10.3389/fimmu. 2021.654649.
- [17] Shin JW, Kim J, Ham S, *et al.* A unique population of neutrophils generated by air pollutant-induced lung damage exacerbates airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021. doi: 10.1016/j.jaci.2021.09.031.
- [18] Varricchi G, Modestino L, Poto R, *et al.* Neutrophil extracellular traps and neutrophil-derived mediators as possible biomarkers in bronchial asthma [J]. *CEM*, 2021. doi: 10.1007/s10238-021-00750-8.
- [19] Ma Q, Qian Y, Jiang J, *et al.* IL-33/ST2 axis deficiency exacerbates neutrophil-dominant allergic airway inflammation [J]. *Clin Transl Immunol*, 2021, 10. doi: 10.1002/cti2.1300.
- [20] Chen X, Li Y, Qin L, *et al.* Neutrophil extracellular trapping network promotes the pathogenesis of neutrophil-associated asthma through macrophages [J]. *Immunol Invest*, 2021, 50: 544-561.
- [21] Lu Y, Huang Y, Li J, *et al.* Eosinophil extracellular traps drive asthma progression through neuro-immune signals [J]. *NCB*, 2021, 23: 1060-1072.
- [22] Xiao Y, Cong M, Li J, *et al.* Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39: 423-437.
- [23] Zhou J, Yang Y, Gan T, *et al.* Lung cancer cells release high mobility group box 1 and promote the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18: 181-188.
- [24] Fang C, Liu F, Wang Y, *et al.* A innovative prognostic symbol based on neutrophil extracellular traps (NETs)-related lncRNA signature in non-small-cell lung cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 17864-17879.