



中性粒细胞胞外诱捕网与肺部 炎症性疾病的关系*

陈 熙^{1,3)} 肖 铜^{2,3)} 李园园¹⁾ 陈 琮^{2,3)} 胡成平^{1,3)**}

¹⁾ 中南大学湘雅医院呼吸与危重症医学科, 长沙 410008; ²⁾ 中南大学湘雅医院老年医学科, 呼吸内科, 长沙 410008;

³⁾ 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床研究中心, 长沙 410008)

摘要 中性粒细胞募集/浸润是肺部炎症性疾病的特征性表现, 是肺部抵抗病原微生物入侵的第一道防线, 主要通过吞噬作用杀灭病原微生物。然而, 新近的研究发现, 中性粒细胞被刺激后可形成一种以 DNA 为骨架并镶嵌有大量活性蛋白质的网状物质——中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs), 这种特殊形式的生物结构能捕获并杀灭病原微生物。尽管就 NETs 的生物学功能而言, 其对肺部炎症性疾病应该是有益的, 但是越来越多的研究表明, NETs 对肺上皮细胞和内皮细胞均具有直接的细胞毒性作用, 并可能促进肺部炎症性疾病的发生发展。为了系统地了解 NETs 与肺部相关炎症性疾病的关系, 本综述首先简述了 NETs 的结构、功能和形成过程, 然后分别叙述了 NETs 与哮喘、慢性阻塞性肺病、细菌性肺炎、肺结核、肺囊性纤维化、间质性肺疾病、流感病毒感染和急性肺损伤的关系。最后总结、展望了 NETs 在肺部炎症性疾病中的潜在研究方向和针对性治疗策略。

关键词 中性粒细胞, 中性粒细胞胞外诱捕网, 肺部炎症性疾病

中图分类号 R56

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0213

呼吸系统是许多病原微生物入侵机体的主要部位, 因此呼吸系统特别依赖于自身的先天性免疫监视, 即以中性粒细胞为主的固有免疫细胞。中性粒细胞募集到气道和肺组织是许多呼吸系统疾病的主要标志, 一般情况下中性粒细胞利用其生物活性物质来抵抗细菌和真菌入侵肺部, 但中性粒细胞的募集和活化也可见于病毒性呼吸系统感染^[1]。中性粒细胞有 3 种主要的直接抗病原微生物的作用机制: a. 中性粒细胞具有强大的吞噬能力, 其通过胞内的毒性颗粒蛋白质和活性氧而杀灭被吞噬的病原微生物; b. 中性粒细胞通过脱颗粒过程从其颗粒中分泌多种毒性蛋白质和酶, 如髓过氧化物酶、弹性蛋白酶和防御素等, 从而抵抗细胞外微生物; c. 除了吞噬和脱颗粒介导的抗病原微生物功能之外, 中性粒细胞还可通过形成胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 来捕获并杀灭病原微生物, NETs 可确保中性粒细胞即使在死亡后也能有效地杀灭病原体。

NETs 于 2004 年首次被 Brinkmann 等^[2] 研究报

道, 他们在体外利用佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 或白介素 8 (interleukin-8, IL-8) 等刺激被分离出的中性粒细胞, 发现可形成一种独特的网状生物学结构, 进而命名为 NETs, 并发现其有杀灭细菌的作用。NETs 的形成是近些年发现的宿主抵御病原体的一种新机制。当机体受到感染或刺激诱导炎症时, 中性粒细胞被激活从而通过一系列的信号调控机制形成并释放以 DNA 为骨架并镶嵌有大量活性蛋白质的 NETs。尽管 NETs 的主要生物学作用为杀灭病原微生物, 但是根据炎症反应的部位、时间、范围和严重程度, NETs 也可能对机体造成潜在的损害。因此, NETs 形成过多或不被及时清除, 会对正常细胞或组织造成损伤, 促进炎症/疾病的发生发展。鉴于肺部在病理情况下可募集大量

* 国家自然科学基金资助项目 (81600025)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-89753728, E-mail: huchengp2829@126.com

收稿日期: 2018-07-31, 接受日期: 2019-04-23

的中性粒细胞以及 NETs 特殊的生物学功能, 深入研究和了解 NETs 将有助于我们进一步理解呼吸道疾病发生发展的病理过程并为呼吸系统疾病的治疗提供新的思路. 因此, 在本篇综述中我们将系统地分析和总结 NETs 在肺部相关疾病中的作用.

1 NETs及其形成过程 (NETosis)

NETs 是存在于胞外的一种纤维网状结构, 其在基因组 DNA 的基础上还包含组蛋白、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 和组织蛋白酶 G 等抗菌活性蛋白质^[3]. 电镜下观察 NETs 的结构发现主要为直径 15~17 nm 的 (DNA 骨架) 平滑纤维和直径为 25 nm 的镶嵌在纤维上的球形 (蛋白质) 区域组成^[2]. 应用 DNA 染料染色后可发现感染部位 NETs 的网状结构, 而以 DNase 处理后, NETs 结构的完整性则被破坏. 与之相反, 应用蛋白裂解酶处理 NETs, 其 DNA 结构仍可保持完整性, 说明 DNA 的确是 NETs 的主要结构^[2]. NETs 特有的三维网状结构可以发挥良好的捕获细菌、真菌和病毒等病原微生物的功能, 可防止病原体扩散、促进抗菌因子聚集于感染部位而有效地发挥作用, 并且 NETs 可依赖自身大量的抗菌蛋白质发挥病原体杀灭作用. 然而, NETs 同时也是一把“双刃剑”, 如在肺部组织中形成过多或不被机体及时降解, NETs 中诸多的活性蛋白质对肺组织和细胞也会起到损伤/破坏作用, 进而加重炎症反应甚至促进肺部疾病的发展.

NETs 的形成过程称之为 NETosis, 它是一种中性粒细胞凋亡和坏死之外的另一种死亡途径, 其主要包括核膜的破裂、染色体的解聚、相关蛋白质的嵌入、胞膜的破裂以及 NETs 的排出, 整个过程不需要半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 的参与且不伴随 DNA 的片段化^[4]. 诸多物质如病原微生物、LPS、PMA 和活化的血小板等均可刺激中性粒细胞 NETs 的形成^[5]. 随着研究的深入, 目前认为中性粒细胞的 NETosis 可通过如下 3 种模式发生: a. 自杀式 NETosis, 是目前了解最多也是最主要的一种模式. 当中性粒细胞被刺激后, 通过蛋白激酶 C 激活 Raf/MERK/ERK 信号通路, 导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶活化进而刺激活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 促使肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptidylarginine

deiminase 4, PAD4) 催化组蛋白瓜氨酸化, 进而使得核染色体解聚^[6]. 同时, 胞内作为 PAD4 辅酶的钙离子浓度升高, 加速核染色体解聚. 并且, 胞内嗜天青颗粒释放 MPO 和 NE 进入细胞核, 进一步促进核染色体解聚. 随后核膜破裂, 解聚后的染色体进入胞质并被颗粒蛋白等加以修饰. 最终胞膜破裂, NETs 以弹射方式释放至细胞外. 综上可知, ROS 的产生和 PAD4 介导的核染色体解聚是发生自杀式 NETosis 的必要条件^[7-8]. b. 细胞核 DNA 释放式 NETosis, 不依赖于 Raf/MERK/ERK 信号通路的激活和 ROS 的产生, 且细胞核膜和胞膜的完整性得以保留, 释放 NETs 后的中性粒细胞仍可吞噬病原微生物并且寿命不受影响, 补体 C3 蛋白和 Toll 样受体可促发此种形式的 NETosis^[6]. c. 线粒体 DNA 释放式 NETosis, 依赖于 ROS 的产生, 当中性粒细胞受到 LPS 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 刺激后可发生此种类型的 NETosis^[6].

2 NETs与哮喘

支气管哮喘是临床上常见的一种慢性气道炎症性疾病. 传统观点认为嗜酸性粒细胞在哮喘的发病过程中发挥关键作用, 因此既往有大量的研究报道了嗜酸性粒细胞在哮喘中的作用和机制, 并且在一定程度上证明了嗜酸性粒细胞确实是促使哮喘这种慢性气道炎症发生发展的重要效应细胞^[9]. 但随着对哮喘发病机制的逐步认识, 近年来发现中性粒细胞同样在哮喘的发病过程中发挥着不容忽视的重要作用^[10-11]. 因而当前的研究观点认为可以根据哮喘患者诱导痰中的炎症细胞类型将其分为 4 型: 嗜酸性粒细胞性哮喘、中性粒细胞性哮喘、混合细胞性哮喘和寡细胞性哮喘^[12]. 而中性粒细胞性哮喘 (neutrophilic asthma, NA) 在上述 4 种哮喘类型中占比超过了 20%^[13], 且 NA 与临床上重症和难治性哮喘等关联密切^[14-15].

研究发现, 中性粒细胞可以在人过敏性哮喘气道中产生 NETs^[16], 中性粒细胞性哮喘与非中性粒细胞性哮喘相比, 诱导痰中的细胞外 DNA 和 NETs 组分的含量明显较高, 且其含量与气道内中性粒细胞水平呈正相关, 而与肺功能、呼吸系统症状以及疾病控制呈负相关^[17]. 另有研究表明 NETs 可以损伤气道上皮并引发炎症反应, 从而加重哮喘的严重程度^[18]. 在小鼠动物实验模型中的研究发现, 仙

台病毒感染通过将中性粒细胞募集到肺泡形成 NETs 而诱发哮喘^[19]. 且在马动物实验模型中的研究结果也发现, 中性粒细胞性重症哮喘马的气道中 NETs 的含量明显升高^[20]. 既往已有研究报道哮喘患者气道内 LPS 和 IL-8 的水平明显升高, 并且目前已知 LPS 和 IL-8 可诱发中性粒细胞的 NETosis, 表明哮喘患者气道内 NETs 的形成可能与过量的 LPS 和 IL-8 存在有关^[2, 18, 21]. 综上可知, NETs 在气道内的积聚加剧了哮喘病的疾病进展.

3 NETs与慢性阻塞性肺病

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以气道内气流受限, 不完全可逆并呈进行性发展为特征的疾病^[22]. COPD 的主要病理改变为气道重塑, 主要表现为气道上皮损伤、皮下组织纤维化、气道平滑肌增生、黏液腺增生和化生, 以及血管损伤及重构等^[23], 被认为是气道以中性粒细胞为主的炎症细胞和结构细胞之间相互作用的结果. 研究发现, COPD 的患者不仅其气道痰液中中性粒细胞的比例明显升高并与疾病严重程度正相关^[24], 而且其诱导痰、支气管肺泡灌洗液和气道上皮中也均发现中性粒细胞的水平升高, 并在急性加重期升高尤为明显^[25]. 此外, 还有研究表明中性粒细胞浸润与 COPD 气道慢性炎症和重塑密切相关^[26-27]. 因此, 气道内中性粒细胞性炎症是 COPD 的一个重要病理特点.

对于 COPD 患者而言, 气道内聚集的中性粒细胞可通过释放 NETs 及其相关活性物质引起慢性气道炎症和肺实质破坏. 通过对 COPD 患者的痰液标本进行研究发现, 与健康对照组人群比较, 无论 COPD 患者是处于稳定期还是急性加重期, 其痰液中 NETs 的水平均明显升高, 且急性加重期 COPD 患者痰液中 NETs 的含量升高更为显著^[28-30], 进一步分析表明 NETs 的水平还与 COPD 患者的气流受限严重程度相关^[30], 说明 NETosis 是 COPD 病理过程中的重要环节^[31]. 此外, 已知吸烟是导致 COPD 的最为常见的原因, 有超过 50% 的 COPD 发病由吸烟导致^[32], 且 90% 的 COPD 患者死亡与吸烟直接相关^[33]. 香烟烟雾刺激不仅可导致中性粒细胞聚集/浸润于气道, 而且研究发现尼古丁作为香烟烟雾的一种重要成分, 可以通过介导尼古丁乙酰胆碱受体并以剂量依赖性方式诱导中性粒细胞释放 NETs^[34]. 另有研究发现, 香烟烟雾提取物

(cigarette smoke extract, CSE) 诱发中性粒细胞形成的 NETs 不仅能刺激支气管上皮细胞分泌 IL-6 和 IL-8^[35], 而且还可诱导浆细胞样树突状细胞的成熟与活化, 启动 T 细胞介导的免疫应答^[36]. 提示 NETs 在吸烟所致的 COPD 病理的过程中同样具有重要的促进作用.

我们课题组利用 LPS 诱导构建小鼠 COPD 模型的研究发现, LPS 可诱导小鼠气道内 NETs 的形成, 而通过雾化吸入 DNase I 可降解 NETs 以减轻 LPS 诱导的小鼠气道炎症和黏液分泌过多, 且这种减少的机制可能经由 TLR4/NF- κ B 信号通路介导^[37]. 但 NETs 导致 COPD 发生发展的分子机制较为复杂, 有待进一步深入研究阐明.

4 NETs与细菌性肺炎

临床上最常见的细菌性肺炎是社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP). 肺炎链球菌是 CAP 最常见的致病因素, 发病率和死亡率都很高, 其次是流感嗜血杆菌^[38-39]. 在 CAP 发生发展期间, 大量中性粒细胞被募集到感染部位而引发炎症反应, 并且产生过量的 NETs. 研究表明, 有 3 种不同的肺炎链球菌菌株 (血清型 3、4 和 19F) 能够诱导小鼠肺部 NETs 的形成, 且与肺组织病理学病变的严重程度相关^[40]. 进一步研究发现肺炎链球菌 α -烯醇化酶可能介导肺炎链球菌诱导 NETs 形成的过程^[41]. 但是, 肺炎链球菌自身能够抵抗 NETs 的杀菌作用. 肺炎链球菌能表达一种膜定位内切酶 EndA, 它能够在体外降解 NETs 并促进细菌从上呼吸道扩散到肺部再进而扩散至血液^[42-43]. 除了表达 EndA, 肺炎链球菌还能通过使菌体表面带正电荷来保护自身以免被 NETs 捕获和杀伤^[44]. 因此, 在肺炎链球菌感染过程中释放的 NETs 可能只起到了破坏肺组织的作用, 而并不能发挥杀菌活性.

不可分型流感嗜血杆菌 (缺乏荚膜) 也是肺炎的重要病因, 主要发生于慢性支气管炎和慢性阻塞性肺病患者^[45], NETs 的持续存在同样可能加重这些患者的肺炎情况. 研究发现, 不管是活性的或还是灭活的流感嗜血杆菌在体外均能诱导中性粒细胞释放 NETs, 其机制可能是由流感嗜血杆菌的脂寡糖与中性粒细胞表面的 Toll 样受体 4 结合而介导. 但是, 流感嗜血杆菌不仅不会被刺激形成的 NETs 杀死而且还能在 NETs 中存活^[46]. 进一步研究证明这些细菌可表达特定蛋白质分子如过氧化物还原蛋白-谷氧还原蛋白和过氧化氢酶, 使其能抵抗宿主体

内的氧化物质并可在NETs中存活^[47]。此外,研究还发现不可分型流感嗜血杆菌存在于呼吸道表面的生物膜群落,而NETs也是构成这些生物膜的一个组成部分^[48]。

5 NETs与结核

结核病目前仍然是人类的主要健康问题之一。结核病是由结核分枝杆菌感染引起,主要影响肺部,其发病率和死亡率居高不下^[49]。结核分枝杆菌通常通过感染者咳嗽或打喷嚏而呼出的微小液滴传播,一旦进入人体肺部,通常会被肺泡巨噬细胞吞噬并杀死。然而,部分结核分枝杆菌可在巨噬细胞内存活,从而形成潜伏感染,并诱导肺实质形成肉芽肿。虽然巨噬细胞一般被认为是携带结核分枝杆菌的主要细胞,但越来越多的证据表明被迅速募集到被感染肺组织的中性粒细胞同样可存储结核分枝杆菌。研究发现,人中性粒细胞能够在体外吞噬结核分枝杆菌,但不能将其杀灭^[50],而且中性粒细胞还是活动性肺结核患者痰和肺泡灌洗液中的主要免疫细胞类型^[51]。因此,中性粒细胞在活动性肺结核病中可能发挥保护结核分枝杆菌的作用从而促进肺结核的病理进程。

研究发现,中性粒细胞被不同基因型的结核分枝杆菌(H37Rv和*M. canettii*)刺激时均可形成NETs,但其能够捕获结核分枝杆菌却发挥不了杀灭作用^[52]。结核分枝杆菌诱导NETs形成的效应可能由其分泌的早期分泌抗原6介导,该抗原负责将结核分枝杆菌从吞噬体逃逸至细胞质中,其与NETs中的重要活性蛋白MPO存在共定位情况^[53-54]。在活动性肺结核患者的肉芽肿内,中性粒细胞被结核分枝杆菌刺激可释放大量的钙卫蛋白^[55],这些蛋白质也是NETs的组成成分^[56]。另有研究发现,结核分枝杆菌在体外可诱导中性粒细胞释放含有基质金属蛋白酶8(matrix metalloproteinase, MMP-8)的NETs,且与健康受试者相比,来自肺结核病患者的诱导痰中含有更多的NETs,进一步分析表明肺结核患者中MMP-8的分泌水平与肺组织的破坏程度正相关^[57]。总而言之,对于肺结核患者而言,由结核分枝杆菌长期、反复刺激中性粒细胞而持续形成的NETs,为结核分枝杆菌对肺组织的破坏起到了协助作用。

6 NETs与肺囊性纤维化

肺囊性纤维化是一种常染色体隐性遗传的先天性家族性疾病,常发病于北美洲白色人种,而在其他人种当中罕见。肺囊性纤维化以外分泌腺病变为基础,由于支气管中的黏液分泌过多、黏稠且排出困难,导致支气管阻塞,使得细菌(如铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌)易于生长繁殖,进而引起支气管和肺组织反复感染,最终导致肺囊性纤维化。随着病情的进展,肺囊性纤维化的患者常出现右心肥大,继发性心力衰竭。肺囊性纤维化的炎症细胞浸润以中性粒细胞为主。中性粒细胞能通过多种方式如吞噬作用、产生活性氧、脱粒作用和形成NETs等抗菌,但这些抗菌方式在肺囊性纤维化的疾病进程中均不能正常发挥作用^[58-60]。

NETs在囊性肺纤维化中的抗菌作用非常有限。尽管实验室培养的以及从临床囊性肺纤维化患者体内分离的铜绿假单胞菌均能强烈触发NETs释放^[61],但从晚期肺纤维化患者气道中分离获得的铜绿假单胞菌对NETs具有抗性^[62-63]。另有研究表明只有约25%的中性粒细胞形成的NETs在体外可杀死金黄色葡萄球菌^[64]。与健康对照相比,肺囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中的游离DNA含量明显升高^[65],最初认为这些游离DNA来源于凋亡和坏死的细胞,但研究表明,其大多数来自于NETs,且NETs与肺囊性纤维化患者的较差肺功能有关^[66-67]。在临床上,DNase已被用于肺囊性纤维化患者的治疗,通过雾化吸入,可改善肺囊性纤维化儿童患者的肺功能,并对儿童和成人患者的疾病恶化率均有降低作用^[68-70]。由于DNase的主要作用是通过切割过量的细胞外DNA以降低痰液黏稠度而助于排痰,因此可以认为DNase在肺囊性纤维化患者治疗过程中发挥功效的主要靶标就是NETs。

7 NETs与间质性肺疾病

间质性肺疾病的病理基础为弥漫性的肺实质和肺泡炎症以及间质纤维化,主要临床表现为进行性加重的活动性呼吸困难、限制性通气障碍、肺弥散功能降低和顽固性低氧血症。同时,间质性肺疾病也是一种以中性粒细胞浸润为主的非感染性炎症性疾病。研究发现,特发性肺纤维化(一种常见的间质性肺疾病)患者的支气管肺泡灌洗液中活化的中

性粒细胞增加, 且与患者的早期死亡率相关^[71]. 并发有间质性肺疾病的自身免疫性疾病患者血液中 NETs 的两种主要成分, 游离 DNA 和抗菌肽 LL-37 的水平明显升高, 且 DNase 的活性明显降低, 提示 NETs 的慢性刺激导致了间质性肺疾病的发生^[72]. 有间质性肺病并发症的皮肤炎患者中也可检测到升高的循环 NETs 水平, 提示异常升高的 NETs 可能参与了皮肤炎患者间质性肺病的发病^[73].

对间质性肺疾病患者的活检组织进行检测发现肌成纤维细胞附近有 NETs 聚集, 而体外研究表明 NETs 可促进肺成纤维细胞的活化, 并能促使其分化为肌成纤维细胞, 用 DNase 降解 NETs 后, 这种促纤维化作用明显下降^[74]. 另有研究发现 NE 抑制剂可通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 和肺部炎症细胞募集来减轻博来霉素诱导的肺纤维化^[75]. NE 在体外对肺成纤维细胞的增殖和肌成纤维细胞的分化都有促进作用, 说明 NETs 导致间质性肺疾病的作用很可能是由其中的 NE 所介导^[76]. 总之, 这些研究均提示 NETs 在间质性肺疾病的发生发展中发挥着关键作用.

8 NETs与流感病毒感染

流感病毒感染是呼吸系统最为常见的病症之一, 其中以甲型流感病毒最为流行. 就临床抽血检验而言, 单纯的流感病毒感染通常的表现是淋巴细胞升高而中性粒细胞比例无明显变化. 然而, 在肺组织的局部, 病毒感染同样可导致中性粒细胞的浸润. 研究表明流感病毒感染刺激的 NETs 形成依赖于 PAD4 对组蛋白的消除^[77]. 而流感病毒诱导的 NETs 形成过程可被抗菌肽 LL-37 加强^[78-79]. 中性粒细胞被流感病毒感染刺激而形成的 NETs 对机体既可起到保护作用又能发挥损伤作用. NETs 上所含的抗菌蛋白 α 防御素 1 能够通过抑制被流感病毒感染细胞中的蛋白激酶 C 而直接抑制流感病毒的复制^[80]. NETs 上的 α 防御素可以让被 NETs 隔离的病毒颗粒失活, 从而阻止流感病毒感染肺组织中的靶细胞^[81]. 然而, 在流感病毒急性感染、病毒大量复制的过程中, 肺组织内产生过量的 NETs 对机体而言却是有害的. 研究发现, 被流感病毒感染后, NETs 中所含的过量的组蛋白和 MMP-9 沉积于肺泡, 可导致肺泡毛细血管损伤和小气道阻塞^[82], 使得损伤的肺组织易于继发细菌感染.

9 NETs与急性肺损伤

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由各种原因导致的肺毛细血管内皮和肺泡上皮的损伤, 造成弥漫性肺泡和肺间质水肿, 进而导致呼吸功能不全, 主要临床表现为急性进行性低氧血症和呼吸窘迫, 病情发展至严重阶段则被称为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS). 严重感染是导致急性肺损伤的最常见因素. 由于肺是全身炎症期间最敏感的靶器官^[83], 所以急性肺损伤是严重脓毒症的一种常见并发症, 其在临床上具有很高的发病率和死亡率^[84]. 研究表明, 与健康对照相比, 发生严重急性呼吸窘迫综合征的脓症患者血清中游离 NETs 的含量明显升高^[85]. 我们课题组通过收集临床标本进行研究发现, ARDS 患者支气管吸出物中 NETs 的水平与病情的严重程度正相关, 且发现在 ALI 小鼠模型的支气管肺泡灌洗液中 NETs 的含量明显高于对照组, 靶向抑制 NETs 形成可显著减弱 ARDS 的强度^[86]. 我们课题组的研究还发现, 在 LPS 诱导的小鼠 ALI 的组织中也可检测到 NETs 的形成, 而利用 DNase I 进行治疗能显著降低 NETs 的水平, 从而得以有效防止急性肺损伤^[87]. 另有研究发现在脓毒症小鼠的肺泡腔和肺毛细血管中均能观察到 NETs^[88], 且 NETs 的过度释放与心脏、肝脏和肺部的急性损伤直接相关, 而联合 rhDNase (人工重组 DNA 酶) 和抗生素治疗脓毒症小鼠可显著降低这些器官的损伤^[85].

10 总结与展望

目前已有许多证据表明 NETs 在各种肺部炎症性疾病当中均有存在, 尽管在疾病的早期阶段 NETs 有捕获和杀灭病原微生物的作用, 对防止病原微生物在肺部的扩散至关重要, 但是越来越多的研究发现, 呼吸道和肺组织中过量或持续存在的 NETs 会对肺造成不同程度的损伤, 导致肺功能受损、加速疾病进展. NETs 在肺部炎症性疾病发生发展的过程中, 理论上来说应该存在一个“有害”与“有益”的临界点, 如何发现和利用这个临界点是今后 NETs 在肺部炎症性疾病当中的研究重点. 目前重组人 DNase 是在少数肺部炎症性疾病中针对 NETs 的唯一治疗方法, 但长期使用会产生严重的副作用. 因此, 针对 NETs 进行靶向治疗的新药研发也是将来的重要研究方向.

参 考 文 献

- [1] Cortjens B, Van Woensel J B, Bem R A. Neutrophil extracellular traps in respiratory disease: guided anti-microbial traps or toxic webs?. *Paediatr Respir Rev*, 2017, **21**: 54-61
- [2] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, **303** (5663): 1532-1535
- [3] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18** (2): 134-147
- [4] Remijsen Q, Kuijpers T W, Wirawan E, *et al.* Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*, 2011, **18** (4): 581-588
- [5] Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, *et al.* Neutrophils Discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*, 2016, **7**: 484
- [6] Delgado-Rizo V, Martinez-Guzman M A, Iniguez-Gutierrez L, *et al.* Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol*, 2017, **8**: 81
- [7] Jorch S K, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*, 2017, **23** (3): 279-287
- [8] Hakkim A, Fuchs T A, Martinez N E, *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol*, 2011, **7** (2): 75-77
- [9] Korevaar D A, Westerhof G A, Wang J, *et al.* Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*, 2015, **3** (4): 290-300
- [10] Gao H, Ying S. Pathological roles of neutrophil-mediated inflammation in asthma and its potential for therapy as a target. *J Immunol Res*, 2017, **2017**: 3743048
- [11] Qu J, Li Y, Zhong W, *et al.* Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. *J Thorac Dis*, 2017, **9** (1): E32-e43
- [12] Green R H, Pavord I. Stability of inflammatory phenotypes in asthma. *Thorax*, 2012, **67** (8): 665-667
- [13] Simpson J L, Scott R, Boyle M J, *et al.* Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*, 2006, **11** (1): 54-61
- [14] Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, **158** (Suppl 1): 96-102
- [15] Alam R, Good J, Rollins D, *et al.* Airway and serum biochemical correlates of refractory neutrophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, **140** (4): 1004-1014.e13
- [16] Dworski R, Simon H U, Hoskins A, *et al.* Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, **127** (5): 1260-1266
- [17] Liu T, Wang F P, Wang G, *et al.* Role of neutrophil extracellular traps in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)*, 2017, **130** (6): 730-736
- [18] Pham D L, Ban G Y, Kim S H, *et al.* Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy*, 2017, **47** (1): 57-70
- [19] Akk A, Springer L E, Pham C T. Neutrophil extracellular traps enhance early inflammatory response in Sendai virus-induced asthma phenotype. *Front Immunol*, 2016, **7**: 325
- [20] Vargas A, Boivin R, Cano P, *et al.* Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res*, 2017, **18** (1): 207
- [21] Wright T K, Gibson P G, Simpson J L, *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*, 2016, **21** (3): 467-475
- [22] Zhou A, Zhou Z, Zhao Y, *et al.* The recent advances of phenotypes in acute exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, **12**: 1009-1018
- [23] Durrani S R, Viswanathan R K, Busse W W. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, **128** (3): 439-448; quiz 449-450
- [24] Quint J K, Wedzicha J A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, **119** (5): 1065-1071
- [25] Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, *et al.* Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2005, **25** (4): 640-646
- [26] Mardh C K, Root J, Uddin M, *et al.* Targets of neutrophil influx and weaponry: therapeutic opportunities for chronic obstructive airway disease. *J Immunol Res*, 2017, **2017**: 5273201
- [27] Hoenderdos K, CondliFFE A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, **48** (5): 531-539
- [28] Dicker A J, Crichton M L, Pumphrey E G, *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, **141** (1): 117-127
- [29] Pedersen F, Marwitz S, Holz O, *et al.* Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients. *Respir Med*, 2015, **109** (10): 1360-1362
- [30] Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W, *et al.* Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir Res*, 2015, **16**: 59
- [31] Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner W D, *et al.* New aspects on the structure of neutrophil extracellular traps from chronic obstructive pulmonary disease and *in vitro* generation. *PLoS One*, 2014, **9** (5): e97784
- [32] Eklund B M, Nilsson S, Hedman L, *et al.* Why do smokers diagnosed with COPD not quit smoking? - a qualitative study. *Tob Induc Dis*, 2012, **10** (1): 17
- [33] Tashkin D P, Murray R P. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2009, **103** (7): 963-974

- [34] Hosseinzadeh A, Thompson PR, Segal B H, *et al.* Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol*, 2016, **100** (5): 1105-1112
- [35] Sabbione F, Keitelman I A, Iula L, *et al.* Neutrophil extracellular traps stimulate proinflammatory responses in human airway epithelial cells. *J Innate Immun*, 2017, **9** (4): 387-402
- [36] Qiu S L, Zhang H, Tang Q Y, *et al.* Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*, 2017, **72** (12): 1084-1093
- [37] Zou Y, Chen X, Xiao J, *et al.* Neutrophil extracellular traps promote lipopolysaccharide-induced airway inflammation and mucus hypersecretion in mice. *Oncotarget*, 2018, **9** (17): 13276-13286
- [38] Rendon A, Rendon-Ramirez E J, Rosas-Taraco A G. Relevant cytokines in the management of community-acquired pneumonia. *Curr Infect Dis Rep*, 2016, **18** (3): 10
- [39] Pletz M W, Rohde G G, Welte T, *et al.* Advances in the prevention, management, and treatment of community-acquired pneumonia. *F1000Res*, 2016, **5**: F1000 Faculty Rev-300
- [40] Moorthy A N, Rai P, Jiao H, *et al.* Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during *in vivo* pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget*, 2016, **7** (15): 19327-19340
- [41] Mori Y, Yamaguchi M, Terao Y, *et al.* alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *J Biol Chem*, 2012, **287** (13): 10472-10481
- [42] Beiter K, Wartha F, Albiger B, *et al.* An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, 2006, **16** (4): 401-407
- [43] Zhu L, Kuang Z, Wilson B A, *et al.* Competence-independent activity of pneumococcal EndA [corrected] mediates degradation of extracellular DNA and Nets and is important for virulence. *Plos One*, 2013, **8** (7): e70363
- [44] Wartha F, Beiter K, Albiger B, *et al.* Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*, 2007, **9** (5): 1162-1171
- [45] Murphy T F, Brauer A L, Schiffmacher A T, *et al.* Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **170** (3): 266-272
- [46] Juneau R A, Pang B, Weimer K E, *et al.* Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 2011, **79** (1): 431-438
- [47] Juneau R A, Pang B, Armbruster C E, *et al.* Peroxiredoxin-glutaredoxin and catalase promote resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* 86-028NP to oxidants and survival within neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 2015, **83** (1): 239-246
- [48] Hong W, Juneau R A, Pang B, *et al.* Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J Innate Immun*, 2009, **1** (3): 215-224
- [49] Dorhoi A, Kaufmann S H. Versatile myeloid cell subsets contribute to tuberculosis-associated inflammation. *Eur J Immunol*, 2015, **45** (8): 2191-2202
- [50] Corleis B, Korbel D, Wilson R, *et al.* Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell Microbiol*, 2012, **14** (7): 1109-1121
- [51] Eum S Y, Kong J H, Hong M S, *et al.* Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*, 2010, **137** (1): 122-128
- [52] Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, *et al.* Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009, **89** (1): 29-37
- [53] Houben D, Demangel C, Van Ingen J, *et al.* ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol*, 2012, **14** (8): 1287-1298
- [54] Francis R J, Butler R E, Stewart G R. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT -6 is a leukocidin causing Ca^{2+} influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation. *Cell Death Dis*, 2014, **5**: e1474
- [55] Gopal R, Monin L, Torres D, *et al.* S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, **188** (9): 1137-1146
- [56] Urban C F, Ermert D, Schmid M, *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *Plos Pathog*, 2009, **5** (10): e1000639
- [57] Ong C W, Elkington P T, Brilha S, *et al.* Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. *Plos Pathog*, 2015, **11** (5): e1004917
- [58] Downey D G, Bell S C, Elborn J S. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax*, 2009, **64** (1): 81-88
- [59] Pohl K, Hayes E, Keenan J, *et al.* A neutrophil intrinsic impairment affecting Rab27a and degranulation in cystic fibrosis is corrected by CFTR potentiator therapy. *Blood*, 2014, **124** (7): 999-1009
- [60] Gray R D, Hardisty G, Regan K H, *et al.* Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax*, 2018, **73** (2): 134-144
- [61] Rada B. Neutrophil extracellular trap release driven by bacterial motility: Relevance to cystic fibrosis lung disease. *Commun Integr Biol*, 2017, **10** (2): e1296610
- [62] 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. *Plos One*, 2011, **6** (9): e23637
- [63] Martinez-Aleman S R, Campos-Garcia L, Palma-Nicolas J P, *et al.* Understanding the entanglement: neutrophil extracellular traps (NETs) in cystic fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, **7**: 104
- [64] Fuchs T A, Abed U, Goosmann C, *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 2007, **176** (2): 231-241
- [65] Kirchner K K, Wagener J S, Khan T Z, *et al.* Increased DNA levels

- in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **154**(5): 1426-1429
- [66] Dwyer M, Shan Q, D'ortona S, *et al.* Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun*, 2014, **6**(6): 765-779
- [67] Marcos V, Zhou-Suckow Z, Onder Yildirim A, *et al.* Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm*, 2015, **2015**: 408935
- [68] Quan J M, Tiddens H A, Sy J P, *et al.* A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*, 2001, **139**(6): 813-820
- [69] Fuchs H J, Borowitz D S, Christiansen D H, *et al.* Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*, 1994, **331**(10): 637-642
- [70] Hubbard R C, McElvaney N G, Birrer P, *et al.* A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1992, **326**(12): 812-815
- [71] Kolahian S, Fernandez I E, Eickelberg O, *et al.* Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, **55**(3): 309-322
- [72] Zhang S, Shu X, Tian X, *et al.* Enhanced formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps in dermatomyositis and polymyositis: a potential contributor to interstitial lung disease complications. *Clin Exp Immunol*, 2014, **177**(1): 134-141
- [73] Peng Y, Zhang S, Zhao Y, *et al.* Neutrophil extracellular traps may contribute to interstitial lung disease associated with anti-MDA5 autoantibody positive dermatomyositis. *Clin Rheumatol*, 2018, **37**(1): 107-115
- [74] Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, *et al.* Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*, 2014, **233**(3): 294-307
- [75] Takemasa A, Ishii Y, Fukuda T. A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J*, 2012, **40**(6): 1475-1482
- [76] Gregory A D, Kliment C R, Metz H E, *et al.* Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J Leukoc Biol*, 2015, **98**(2): 143-152
- [77] Hemmers S, Teijaro J R, Arandjelovic S, *et al.* PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One*, 2011, **6**(7): e22043
- [78] Neumann A, Berends E T, Nerlich A, *et al.* The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J*, 2014, **464**(1): 3-11
- [79] Tripathi S, Verma A, Kim E J, *et al.* LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. *J Leukoc Biol*, 2014, **96**(5): 931-938
- [80] Salvatore M, Garcia-Sastre A, Ruchala P, *et al.* alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism (s). *J Infect Dis*, 2007, **196**(6): 835-843
- [81] Porto B N, Stein R T. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing?. *Front Immunol*, 2016, **7**: 311
- [82] Narasaraaju T, Yang E, Samy R P, *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*, 2011, **179**(1): 199-210
- [83] Seeley E J, Matthay M A, Wolters P J. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, **303**(5): L355-363
- [84] Sadowitz B, Roy S, Gatto L A, *et al.* Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, **9**(12): 1169-1178
- [85] Czaikoski P G, Mota J M, Nascimento D C, *et al.* Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One*, 2016, **11**(2): e0148142
- [86] Li H, Zhou X, Tan H, *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI / ARDS. *Oncotarget*, 2018, **9**(2): 1772-1784
- [87] Liu S, Su X, Pan P, *et al.* Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci Rep*, 2016, **6**: 37252
- [88] Tanaka K, Koike Y, Shimura T, *et al.* *In vivo* characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e111888

Relationship Between Neutrophil Extracellular Traps and Pulmonary Inflammatory Diseases*

CHEN Xi^{1,3)}, XIAO Jian^{2,3)}, LI Yuan-Yuan¹⁾, CHEN Qiong^{2,3)}, HU Cheng-Ping^{1,3)**}

¹⁾Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾Department of Geriatric Medicine, Department of Respiratory, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract Neutrophil recruitment / infiltration is a characteristic manifestation of pulmonary inflammatory diseases and is the first line of defense against pathogenic microbial invasion in the lungs, killing pathogenic microorganisms mainly through phagocytosis. However, new research has found that neutrophils can form a network called neutrophil extracellular traps (NETs) that are DNA-based and inlaid with a large amount of active protein. This biological structure can capture and kill pathogenic microorganisms. Although it is beneficial for lung inflammatory diseases in terms of the biological function of NETs, more and more studies have shown that NETs have direct cytotoxic effects on lung epithelial cells and endothelial cells, and may promote the lung inflammatory diseases. In order to systematically understand the relationship between NETs and lung-related inflammatory diseases, this review first briefly describes the structure, function and formation process of NETs, and then describes the relationship of NETs and asthma, chronic obstructive pulmonary disease, bacterial pneumonia, tuberculosis, cystic fibrosis, interstitial lung disease, influenza virus infection and acute lung injury, finally summarizes the potential research directions and targeted treatment strategies of NETs in pulmonary inflammatory diseases.

Key words neutrophil, neutrophil extracellular traps, pulmonary inflammatory disease

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0213

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81600025).

** Corresponding author.

Tel: 86-731-89753728, E-mail: huchengp2829@126.com

Received: July 31, 2018 Accepted: April 23, 2019