

中性粒细胞胞外诱捕网及其在重症急性胰腺炎中的研究进展

杨 求 薛东波

摘 要 重症急性胰腺炎(SAP)是与高病死率相关的严重腹部疾病,在疾病发展过程中出现全身性炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS),最终导致患者死亡。传统上认为,中性粒细胞在SAP病理中的功能是伴随炎症过程的趋化因子和细胞因子级联反应的激活。近年来研究发现,一种新型的抗菌机制——中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)及其在SAP中的作用引起了科学界的广泛关注。在SAP中,NETs在炎症刺激状态下损害正常胰腺组织,其与炎症细胞的活化有关,并最终引起炎症级联反应,同时SAP也触发NETs的形成。本文主要总结了NETs与SAP之间的关联(包括NETs与SAP的发生——细胞内胰蛋白酶的活化相关,NETs与SAP的进展——全身性炎症反应综合征相关,NETs与SAP患者凝血功能异常相关,NETs与SAP的局限化——参与胰腺坏死组织屏障的形成相关等)以及与涉及NETs的SAP多器官功能的损伤,旨在为后续的相关研究以及临床应用提供参考。

关键词 中性粒细胞胞外诱捕网 重症急性胰腺炎 NETs 形成机制 MODS SIRS

中图分类号 R657.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.07.006

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种病死率极高的急腹症。当免疫系统功能增强时,引起的人体全身性炎症反应综合征将会导致MODS的产生。研究表明,SAP患者炎症损伤与中性粒细胞的活化与趋化密切相关,活化的中性粒细胞还可以通过释放NETs来参与捕获并杀灭病原菌^[1]。NETs由多种成分组成,其网状结构上附着的蛋白主要参与炎症反应^[2]。NETs是一种全新的导致细胞死亡的机制,其存在可以补充吞噬作用机制,能够防止细菌逃逸,从而更好地杀灭病原体,保护宿主。在来自SAP小鼠模型的胰腺组织中,NETs加剧了胰腺组织的损伤。通过明确NETs与SAP之间的相关性,将有助于通过调控NETs来改善SAP患者的病情。因此,由于NETs与SAP之间的相互作用,针对NETs的研究可能会成为SAP治疗的关键点。

一、NETs的组成成分及作用

NETs是由去聚化的染色质DNA构成的基本骨架,其表面附着瓜氨酸化组蛋白(CitH3)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、组织蛋白酶G(CG)、髓过氧化物酶(MPO)、胞外冷诱导RNA结合蛋白(eCIRP)

和其他蛋白质^[3]。此结构使NETs可以通过这些毒性蛋白捕获并杀死病原微生物、真菌和寄生虫等^[4]。

当用脂多糖(LPS)或其他诱导NETs形成的物质刺激多核中性粒细胞(PMN)时,PMN将首先失去核小叶并使染色质解聚以形成游离的DNA纤维网,这种结构的释放将导致核膜破裂,细胞质中的蛋白质将黏附至DNA纤维上,最终,NETs将在细胞膜破裂后释放^[5]。在体外,由DNA纤维组成的NETs的网状结构通过将抗菌蛋白附着到这些入侵病原菌上结合并杀死病原体。在患有败血性血管内血栓形成的个体中观察到DNA与细菌缠结形成的血栓的存在,这证实了DNA纤维网可防止细菌在体内逃逸。研究表明,NE、MPO和组蛋白等几种特殊蛋白质除具有抗菌活性外,其与NETs的形成也密切相关,MPO和NE的缺乏会阻断NETs的形成^[2]。

二、NETs的形成机制

根据是否需要活性氧(ROS),将NETs的形成机制分为ROS依赖性和非ROS依赖性途径。

1. ROS依赖性NETs的形成:PMA诱导NETs形成的途径取决于ROS。PMA与细胞膜上的蛋白激酶C受体(PKC受体)结合并激活PKC。激活的PKC启动Raf-MEK-ERK(MAPK)途径,并随后激活NADPH氧化酶(NOX),从而导致ROS产生^[6]。ROS激活MPO,触发NE从嗜酸性颗粒活化转运到细胞核。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81770634)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科、教育部肝胆外科重点实验室

通讯作者:薛东波,教授,电子信箱:xuedongbo@hrbmu.edu.cn

NE 转运到细胞核中水解染色质上的组蛋白,使染色质去组装形成游离的 DNA 复合物。组蛋白瓜氨酸化,这是由蛋白质精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 介导的,最终导致染色体解聚形成 NETs^[7]。

多数病原微生物、炎症细胞因子和化学物质通过以下途径驱动 NETs 的形成,通过不同的上游受体[例如细菌致病因子的 Toll 样受体(TLR)、整联蛋白的 G 蛋白偶联受体(GPCR)等],从而激活 NOX 而形成的信号通路。作为该途径中最重要的物质,由 PMN 产生或由病原体分泌的 ROS 直接诱导 NE 从细胞质颗粒转移到细胞核,从而激活 NETs 形成所需的下游反应。

ROS 依赖的 NETs 的形成同时也受到自噬的调节。通过Ⅲ型组织相容性复合体(MHC)蛋白受体,调节 NETs 的形成,自噬的抑制会阻止佛波酯(PMA)或 LPS/IL-8 诱导的 NETs 形成,这表明自噬在 NETs 形成中的重要作用^[8]。

2. 非 ROS 依赖性 NETs 的形成:钙离子是主要参与非 ROS 依赖性 NETs 形成的关键物质。钙离子载体直接激活 PAD4 和钙蛋白酶以诱导 NETs 释放而没有 ROS 生成,由于 PAD4 的活化取决于钙离子的存在,因此钙离子缺乏会破坏 NETs 的形成。除了钙离子的参与外,据报道核因子 κ B(NF- κ B)还可以在不产生 ROS 的情况下调节尿酸诱导的 NETs 形成,表明 NETs 形成所需的下游核信号转导受 NF- κ B 调节^[9]。在没有 NADPH 氧化酶活化和 ROS 产生的情况下,也观察到了由血小板诱导的 NETs 形成。经 LPS 激活后,血小板表面的糖蛋白 I b(GP I b)与嗜中性粒细胞上的 β_2 -整联蛋白(CD18)结合,然后激活 Src 激酶 PI₃K-ERK 途径,加速细胞周期进程,最终形成 NETs^[10]。

三、NETs 与 SAP 之间的关联

中性粒细胞在与 SAP 相关的炎症损伤中起着至关重要的作用^[11]。在严重水肿或坏死的胰腺区域发现嗜中性粒细胞浸润增加。NETs 及其活化的中性粒细胞来源的成分也在受损 SAP 动物模型的组织中检测到,并加剧了 SAP 的恶化和炎症组织损伤^[11]。这些结果证实了 NETs 与 SAP 之间的联系。研究表明,SAP 患者的炎症性损害是由活化的 NETs 及其组成成分引起的^[12]。

1. NETs 与 SAP 的发生——细胞内胰蛋白酶的活化相关:在 SAP 小鼠模型胰腺组织中发现了 NETs 的存在,其在体内诱导胰蛋白酶活化、炎症反应和组

织损伤,SAP 胰腺组织与 NETs 共存会增加胰蛋白酶的活性^[13]。无细胞组蛋白包括那些源自 NETs 的毒性蛋白,破坏胰腺腺泡细胞质膜,导致腺泡细胞质泄漏和细胞死亡。抑制 eCIRP 显著降低了 NETs 诱导的来自腺泡细胞的胰蛋白酶原分泌,这表明与 NETs 相关的 eCIRP 参与了炎症性胰腺的蛋白水解激活。

2. NETs 与 SAP 的进展——全身性炎症反应综合征相关:SAP 的特征是胰蛋白酶原的异常激活后全身炎症的级联激活。酶原激活导致胰腺组织自消化和胰腺损伤。NETs 组成成分中的 eCIRP,可作为一种新型的损伤相关分子模式(DAMP),通过蛋白水解消化(例如炎症性细胞因子降解)在 NETs 中降解潜在有害的 DAMPs^[14]。受损的腺泡细胞释放 DAMP 来促进细胞因子 IL-1 β 的产生和细胞表面模式识别受体(包括 TLR)的激活,最终导致 SAP 患者发生全身性炎症反应综合征,SIRS 持续性发生将会导致多个器官衰竭。

3. NETs 与 SAP 患者凝血功能异常相关:凝血纤维蛋白溶解异常导致弥散性血管内凝血(DIC)可能对急性胰腺炎的严重程度起重要作用。胶原蛋白或二磷酸腺苷(ADP)等经典的血小板激动剂引起的血小板活化会诱导 NETs 的生成。NETs 除发挥抗菌活性外,还可以引发促凝、促血栓形成。NETs 能够促进凝血酶的生成,反过来,激活的血小板促进 NETs 的形成^[15]。NETs 的 DNA 纤维网和 NE 可以激活凝血因子(XII 和 Xa 因子),并结合血小板,导致血小板减少,最终导致 DIC,因此,NETs 与 SAP 严重程度之间的关系由 DIC 的发生率可以表明。NETs 可能是导致 SAP 患者 DIC 发生的关键因素。

4. NETs 与 SAP 的局限化——参与胰腺坏死组织屏障的形成相关:在早期急性炎症性损伤后,SAP 患者的胰腺炎症不会停止在稳定阶段。相反,会引起局部并发症,例如胰腺坏死、胰腺假性囊肿的形成。NETs 在坏死胰腺组织、胰腺假性囊肿中的存在,表明 NETs 参与了这些结构的形成。由于 NETs 促进渗液中蛋白质的聚集,形成将炎症物质限制在一个部位的屏障,从而减少了对周围组织的损害。细胞外 DNA 和染色质相关蛋白有助于凝结并增强在 NETs 表面形成的纤维蛋白凝块。通过缓慢迁移和增殖成纤维细胞,该屏障最终可以转化为纤维化组织^[16]。

四、NETs 对 SAP 患者身体其他器官造成的损伤

SAP 的特征是胰蛋白酶原异常激活后全身炎症的级联激活。故而中性粒细胞可能发生趋化性并迁

移到身体各种组织以形成 NETs。SAP 的许多致命并发症,已显示与 NETs 的形成密切相关。因此,在 SAP 患者体内,NETs 不仅存在于胰腺组织中并对其造成伤害,而且还会对其他相关器官造成更严重的损害。

1. 肺部损伤:在 SAP 患者体内,NETs 中的 DNA 纤维网在肺细小支气管中起支架作用,并与痰液结合形成痰液螺栓,由 NE 诱导的气道上皮产生过多的黏蛋白与痰液螺栓形成的复合物阻塞微小支气管,为细菌的生长和定殖创造了合适的环境,最终引起急性肺损伤。SAP 会导致嗜中性粒细胞过度激活,过度活化的嗜中性粒细胞可能导致多器官功能不全综合征的发展,而肺部是该综合征的主要靶点。活化的中性粒细胞释放 NE、ROS 和其他促炎性介质,进一步激活 NETs 的形成,从而导致肺损伤^[17]。MPO 诱导肺泡上皮细胞中的 DNA 链断裂,从而破坏肺泡正常气体交换,引起急性肺损伤。

2. 肾脏损伤:NETs 的形成与 DAMP 相关,DAMP 在多种疾病模型中引发炎症反应。此外,在人类和实验性胰腺炎中,多种 DAMP 被视为与胰腺炎相关的“危险信号”,例如高迁移率族 1 号盒(HMGB1)已显示对实验性 SAP 具有重要作用,并可能在 SAP 后参与肾脏损伤^[18]。中和 HMGB1 可显著改善 SAP 病程及肾脏损伤。研究表明,NETs 的形成受 NF- κ B 通路的调节。在 SAP 小鼠体内,丁酸钠通过抑制 NF- κ B 通路和调节 HMGB1 来减轻 SAP 小鼠的器官损伤^[19]。Shi 等^[20]认为富含氢的盐水通过抑制活性氧(ROS)和 NF- κ B 途径对牛磺胆酸钠诱导的 SAP 的肾脏损伤起到保护作用。

3. 心脏损伤:当 SAP 中的胰蛋白酶进入心脏血液中,NETs 可强化胰蛋白酶的活性,损伤心肌细胞。在 SAP 早期,调节 NETs 的 NF- κ B 过度活化,激活单核-吞噬细胞及中性粒细胞系统,释放大炎症因子,导致冠状动脉内皮的损伤,SAP 时活化的中性粒细胞释放微粒小泡,里面含有调节 NETs 形成的 MPO,MPO 可催化产生大量的 ROS,也可以破坏冠状动脉内皮细胞。经过 NETs 进一步激活的胰蛋白酶致使 SAP 患者血液处于高凝状态,将血小板活化,活化后的血小板与 NETs 结合凝集成血栓,堵塞血管^[21]。研究表明,冠状动脉中与 NETs 相关的血栓经常引发心肌梗死,在 SAP 患者中已观察到^[22]。在 SAP 患者体内,受损的血管内皮上浸润的 T 辅助细胞在 NETs 的作用下进一步激活,加重炎症浸润,增加了动脉粥样硬化斑块脱落的风险^[23]。

4. 肠黏膜屏障功能异常:肠屏障功能异常在 SAP 的病理生理中起着关键作用,受损的肠屏障可能成为其他并发症的源头,包括 SIRS 和 MODS,这进一步加剧了 SAP。越来越多的文献表明 NF- κ B 和 NLRP3 促进炎症反应,而 NF- κ B/NLRP3 炎症体途径的激活是通过 NETs 介导的,进一步引发炎症细胞因子的释放^[24]。Yang 等^[25]研究认为虫草素通过调节 NF- κ B 和 NLRP3 炎症体的活化,抑制 NETs 的活性,从而减缓 SAP 的症状,同时抑制促炎性细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的产生。SAP 可使肠黏膜通透性增加,坏死腺泡细胞释放的大量 HMGB1 可影响肠黏膜的物理屏障功能。研究表明,在 SAP 患者的肠道中,NETs 破坏肠的微生态平衡,从而导致肠屏障受损,肠黏膜通透性增加,内毒素产生增加以及肠菌群失衡。

五、展 望

NETs 自被发现以来就引起了科学界的极大兴趣,研究人员进行了大量研究以检查其结构、功能和形成机制。在确认这些结构具有强大的抗菌功能的同时,多项研究还发现 NETs 参与了多个器官中许多非感染性疾病的病理生理过程,例如急性炎症性疾病和血栓性疾病等。NETs 及其成分在 SAP 引起的炎症应激下对正常组织的损害以及炎症细胞的激活引起炎症级联的过程中起着重要的作用。此外,NETs 的形成是由胰液成分或 SAP 释放的炎症细胞因子引起的,它们可能通过胰腺腺泡损伤或胰管阻塞而诱发 SAP。因此,NETs 和 SAP 的产生可能形成恶性循环。针对这一关系,对于 NETs 与 SAP 的功能、机制和关系以及针对 NETs 的干预措施吸引了众多研究人员的关注。今后新的检测技术和药物的开发将大大加速针对 NETs 的 SAP 患者的临床治疗。

参考文献

- 1 Raed M, Milladur R, Dler T. Targeting peptidylarginine deiminase reduces neutrophil extracellular trap formation and tissue injury in severe acute pancreatitis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 124-135
- 2 Martinod K, Witsch T, Farley K, et al. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis[J]. Thromb Haemost, 2016, 14(3): 551-558
- 3 赵洁, 张根生, 崔巍. 中性粒细胞胞外诱捕网在急性肺损伤及急性呼吸窘迫综合征气道炎症中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(7): 664-670
- 4 刘春晓, 胡庆华. 中性粒细胞胞外诱捕网及其参与的免疫炎症性疾病研究进展[J]. 药学研究, 2020, 39(7): 405-410
- 5 Neubert E, Meyer D, Rocca F. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 37-67

- 6 曹维嘉, 邵子玮, 段孟洮, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 及其在相关炎症性疾病的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(5): 635 – 638
- 7 Kenny EF, Herzig A, Kruger R, *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways [J]. *Elife*, 2017, 69(2): 24 – 37
- 8 Fuhrmann J, Clancy KW, Thompson PR, *et al.* Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(11): 5413 – 5461
- 9 Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK, *et al.* PI₃K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 109(4): 314 – 341
- 10 Zhu L, Li JY, Zhang YM, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Shengjiang decoction in rats with acute pancreatitis for protecting against multiple organ injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(46): 8169 – 8181
- 11 Szatmary P, Liu T, Abrams ST, *et al.* Systemic histone release disrupts plasmalemma and contributes to necrosis in acute pancreatitis [J]. *Pancreatol*, 2017, 17(6): 884 – 892
- 12 Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, *et al.* Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets [J]. *Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 153 – 162
- 13 Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *J Cell Biol*, 2019, 191(3): 677 – 691
- 14 Saluja A, Dudeja V, Dawra R, *et al.* Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1979 – 1993
- 15 Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(6): 27 – 32
- 16 Targeting peptidylarginine deiminase reduces neutrophil extracellular trap formation and tissue injury in severe acute pancreatitis [J]. *Cell Physiol*, 2018, 28(5): 24 – 30
- 17 Wang T, Zou W, Niu C, *et al.* Brg1 inhibits E-cadherin expression in lung epithelial cells and disrupts epithelial integrity [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(10): 1117 – 1126
- 18 Habtezion A, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Acute pancreatitis: a multifaceted set of organelle and cellular interactions [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1941 – 1950
- 19 Qingqing Ruan, Hong Lu, Hengyue Zhu, *et al.* A network-regulative pattern in the pathogenesis of kidney injury following severe acute pancreatitis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125(5): 12 – 18
- 20 Shi Q, Liao KS, Zhao KL, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuates acute renal injury in sodium Taurocholate-induced severe acute pancreatitis by inhibiting ROS and NF- κ B pathway [J]. *Mediat Inflamm*, 2015, 68(5): 43 – 50
- 21 卫明, 宋妍婷, 于宝琪, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在心血管疾病中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2020, 51(5): 347 – 352
- 22 Sanghvi S, Waqar F, Effat M. Coronary thrombosis in acute pancreatitis [J]. *J Thromb Thrombol*, 2019, 47(1): 157 – 161
- 23 Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, *et al.* Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis [J]. *Science*, 2015, 349(6245): 316 – 320
- 24 Yu J, Ni L, Zhang X. Surfactant protein D dampens lung injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling in acute pancreatitis [J]. *Shock*, 2019, 51(5): 557 – 568
- 25 Yang J, Zhou Y, Shi J. Cordycepin protects against acute pancreatitis by modulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation via AMPK [J]. *Life Sci*, 2020, 251(11): 76 – 84

(收稿日期: 2021-01-28)

(修回日期: 2021-02-10)

(上接第 21 页)

- 12 Fathollahi A, Daneshgari F, Hanna-Mitchell AT. Melatonin and its role in lower urinary tract function: an article review [J]. *Curr Urol*, 2015, 8(3): 113 – 118
- 13 Aparicio-Soto M, Alarcon-De-La-Lastra C, Cardeno A, *et al.* Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(1): 134 – 144
- 14 Tripathi DN, Jena GB. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF- κ B during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat [J]. *J Pineal Res*, 2010, 48(4): 324 – 331
- 15 Dobrek L, Baranowska A, Thor PJ. Indirect autonomic nervous system activity assessment with heart rate variability in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis treated with melatonin or agomelatine [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(5): 368 – 373
- 16 Dagher A, Curatolo A, Sachdev M, *et al.* Identification of novel non-invasive biomarkers of urinary chronic pelvic pain syndrome: findings from the Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network [J]. *BJU Int*, 2017, 120(1): 130 – 142
- 17 Lai HH, Shen B, Vijairania P, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor treatment decreases bladder pain in cyclophosphamide cystitis: a Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network animal model study [J]. *BJU Int*, 2017, 120(4): 576 – 583
- 18 Tooke K, Girard B, Vizzard MA. Functional effects of blocking VEGF/VEGFR2 signaling in the rat urinary bladder in acute and chronic CYP-induced cystitis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(7): F43 – F51
- 19 Chen YT, Chiang HJ, Chen CH, *et al.* Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(3): 248 – 261
- 20 Chung JW, Chun SY, Lee EH, *et al.* Verification of mesenchymal stem cell injection therapy for interstitial cystitis in a rat model [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0226390

(收稿日期: 2021-01-22)

(修回日期: 2021-02-19)