

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.030

· 综述 ·

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.030>

中性粒细胞胞外诱捕网在动脉粥样硬化中的研究进展

吕强 综述 杨勇, 刘惠亮 审校

(武警总医院心内科, 北京 100039)

[摘要] 动脉粥样硬化作为一种炎症反应性疾病, 已成为心脑血管病领域的共识。而参与动脉粥样硬化炎症反应的细胞成分多种多样, 包括单核-巨噬细胞、树突状细胞、T淋巴细胞及中性粒细胞等。中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞活化时释放的网状物质, 它具有抗炎、促炎、促凝等多种生物活性, 并参与多种疾病的病理进程。研究发现: 中性粒细胞可以在某些刺激因子作用下活化并释放出NETs, 而NETs具有细胞毒性和血栓形成效应, 并且能够与巨噬细胞产生交互作用, 它作为将炎症和血栓形成联系起来的桥梁, 在动脉粥样硬化的病理进程中发挥了重要作用。

[关键词] 中性粒细胞胞外诱捕网; 动脉粥样硬化; 炎症反应

Research progress of neutrophil extracellular traps in atherosclerosis

LÜ Qiang, YANG Yong, LIU Huiliang

(Department of Cardiology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China)

Abstract It has become a consensus in the field of cardio-cerebrovascular disease that atherosclerosis is an inflammatory response disease, and inflammation cells involved in atherosclerotic are varied, including mononuclear-macrophages, dendritic cells, T lymphocytes and neutrophils, etc. Neutrophil extracellular traps (NETs) are mesh structure released by activated neutrophils. They have diverse biological activities, such as anti-inflammatory and proinflammatory effect, procoagulant activity. They also participate in pathological processes of many kinds of diseases. A number of studies found that neutrophils can be activated by some stimulating factor and release NETs. NETs have cytotoxic and pro-thrombotic effects, and the ability to interact with macrophages, they play an important role in atherosclerosis pathology as a link between inflammation and thrombosis.

Keywords neutrophil extracellular traps; atherosclerosis; inflammatory response

收稿日期 (Date of reception): 2016-12-14

通信作者 (Corresponding author): 刘惠亮, Email: lhl518@vip.sina.com

基金项目 (Foundation item): 武警总医院院级课题 (WZ2015013)。This work was supported by Hospital Level Scientific Research Project Foundation in General Hospital of Chinese People's Armed Police Force (WZ2015013), P. R. China.

在过去的几十年里,人们对动脉粥样硬化的认识日趋成熟,即动脉粥样硬化并不是仅仅基于脂质代谢紊乱,而是主要由血管壁的慢性炎症驱动,这个过程涉及多种细胞类型^[1]。动脉粥样硬化作为一种炎症反应,它可以从亚临床的大动脉内皮功能紊乱,逐渐演变成危及生命的严重疾病,比如心肌梗死或卒中。目前炎症反应是动脉粥样硬化病理进程的主要研究方向之一。动脉粥样硬化的危险因素如血脂异常等能够激活单核-巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞及T淋巴细胞等一系列炎性细胞,并刺激产生黏附分子、细胞因子和一系列炎性因子,引起内皮细胞的功能紊乱,从而引起动脉血管壁的损伤并最终导致动脉粥样硬化斑块的形成。近年来的研究^[2]显示:除了单核-巨噬细胞、T淋巴细胞、树突状细胞等免疫炎症细胞之外,中性粒细胞在动脉粥样硬化斑块形成和发展的过程中的作用也不容忽视。尤其是近年来关于中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)在动脉粥样硬化中的作用又有了一些新的认识,本文就NETs与动脉粥样硬化的关系作一综述。

1 NETs 概述

1.1 NETs 的产生及其机制

中性粒细胞是固有免疫系统的主要细胞成分,而形成NETs是中性粒细胞发挥其作用的重要机制之一。NETs最早于2004年由Brinkman等^[3]发现并报道。NETs的发现开辟了粒细胞系研究的一个新领域。NETs主要由核染色质、核组蛋白和颗粒抗菌蛋白等组成,其中核染色质作为骨架,它们共同构成了一种复杂的网状结构,可以理想地网罗住微生物。NETs的主要功能是捕获并杀死病原体,如细菌、真菌、病毒、原生动物的等。它可以防止病原体的扩散,并促进各种抗菌因子集中在感染部位有效地发挥作用。

NETs的产生过程称为NETosis,它有别于一般的细胞坏死和凋亡,是一种特殊的细胞死亡^[4]。这个过程分为多个步骤进行,首先细胞内的颗粒酶转移到细胞核并促进核染色质解凝聚,然后内膜系统崩解并释放出NETs。在NETosis过程中,细胞核膜和颗粒膜都会瓦解,但原生质膜得以保持其完整性,这与细胞凋亡或坏死不同。NETosis过程涉及到核膜解体和胞核与胞质物质的混合,并伴随着内膜系统和胞质细胞器的消失。更准确地说,整个过程中并没有观察到典型的细胞凋亡

特征,如膜泡、磷脂酰丝氨酸暴露、核染色质固缩和DNA碎片等。NETosis的特点是细胞内核染色质的快速解凝聚。NETosis与细胞坏死的区别是,除了核膜,后者质膜也失去了完整性。在NETosis过程中,NETs以质膜穿孔的形式被释放出胞外。

NETs的产生是一种NADPH依赖性的特殊的细胞死亡过程。在这一过程激活期间,中性粒细胞通过NADPH氧化酶的激活产生活性氧(ROS)。ROS通过中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)的介导参与NETs的产生和释放。在未激活的中性粒细胞内,NE和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)都是存储在胞质的嗜天青颗粒中。中性粒细胞被激活后会产生并释放ROS,致使NE从细胞质颗粒中转移到细胞核^[5],分解核小体组蛋白,并与MPO一起促进广泛的染色质解凝聚。最终细胞破裂并释放出NETs。ROS可能是通过干扰NE与蛋白多糖基质的结合而直接促进NE的释放,而蛋白多糖基质被认为具有下调蛋白酶活性的作用。

然而,关于NETs的产生机制尚未完全明了。目前的观点认为:NETosis过程并不是全部通过细胞死亡途径实现的。研究^[6]发现:NETs的产生至少有两种不同的机制,包括自杀性NETosis和活性细胞NETosis。当中性粒细胞接受了某些特定的刺激后,就会通过自杀性NETosis或者活性细胞NETosis途径产生NETs。而根据刺激来源的不同,NETs的产生机制也会相应地不同。例如,佛波醇12-肉豆蔻13-乙酸酯(phorbol-12-myristate 13-acetate, PMA)或者白介素-8(IL-8)等化学刺激可激活自杀性NETosis,而来自病原体或脂多糖的刺激则可激活活性细胞NETosis途径,在释放出NETs后,这些中性粒细胞仍旧具有活性及一般功能如白细胞招募、趋化性及吞噬作用等。关于NETs的确切产生机制及其信号通路,仍有待进一步研究。

1.2 NETs 的生物学作用

NETs的生物学作用较复杂,主要包括抗炎、促炎、促凝等作用。NETs自身独特的网状结构可以抑制病原微生物的扩散,并且其中含有的多种颗粒抗菌蛋白成分亦可直接杀死病原微生物。有研究^[7]表明:NETs可以通过促进细胞因子及趋化因子的降解而抑制炎症反应。同时,NETs也具有促炎作用^[8]。NETs中含有的循环游离DNA(circulating free DNA, cf-DNA)成分可以作为免疫原而激活免疫应答,进而放大机体的免疫反应,发挥促炎作用。因此,cf-DNA可以作为评

估机体炎症反应程度的潜在指标。此外, NETs还具有促进血栓形成的作用。有研究^[9]发现: NETs独特的网状结构可以为血栓的形成提供支架。红细胞、血小板、纤维蛋白等都可以附着在这个支架结构上并最终促进血栓形成。当使用DNase降解NETs的支架结构后即可有效阻止血栓形成。NETs亦可通过招募红细胞及促进纤维蛋白沉积而促进静脉系统的红色血栓形成。此外, NETs中含有的组蛋白H3, H4也可以通过直接激活血小板而促进血栓形成。在一项小鼠的体内实验^[10]中, 研究人员发现: NETs可以通过激活血液中的凝血因子XII而促进深静脉血栓形成。当对小鼠进行XII因子基因敲除或用DNase降解NETs后, 均能够有效抑制深静脉血栓的形成。有研究^[11]表明: NETs在形成过程中可产生并释放出组织因子, 而组织因子可以激活凝血级联反应。此外, NETs中含有的NE成分能够降低组织因子通路抑制剂(TF pathway inhibitor, TFPI)的活性^[12], 这进一步加强了组织因子促凝的作用。因此, 组织因子亦可能是NETs促进血栓形成的可能机制之一。通常来说导致血栓形成的因素包括内皮细胞或血管壁损伤、血流淤滞及高凝状态的形成, 而NETs可能是连接炎症反应与血栓形成的桥梁, 然而其促进血栓形成的具体作用机制目前尚不清楚, 仍有待进一步的研究。

NETs除了具有以上基础生物学作用以外, 还参与多种疾病的病理进程, 其中自身免疫性疾病和肿瘤是目前研究的重点。目前的多项研究显示: NETs在自身免疫性疾病中扮演了重要角色, 这些疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、硬皮病、脉管炎、白塞氏病等等。针对这些自身免疫性疾病特别是系统性红斑狼疮的大量研究, 使得人们对NETs在自身免疫性疾病中的复杂作用机制有了一些新的见解^[13-14], 即NETs的降解不足是促进这些疾病的重要原因。而NETs的降解不足可能是由于DNase1的激活障碍或活性减低。有假设^[13-14]认为: anti-NETs抗体和DNase1抑制因子的存在或某种未知的机制阻碍了NETs的降解。有趣的是, 红斑狼疮患者体内可检测出核染色质和嗜中性粒细胞蛋白抗体。此外, 抗NETs抗体和NETs可能形成免疫复合物, 这也可能是促进这些疾病的原因。总之, 已有的实验证据^[15-16]表明: 自身免疫性疾病的特点是NETs的形成和清除失衡。另外, NETs在癌症生物学和肿瘤进展中的作用已经得到证实。中性粒细胞在肿瘤进展中的作用越来越受到人们重视, 而NETs几乎在肿瘤发

展与进展的每一个阶段中都发挥了关键作用。目前, NETs已经成为了肿瘤生物学的一个新的研究领域。

2 NETs与动脉粥样硬化

NETs就像一把双刃剑, 既可以保护机体免受病原微生物的侵袭, 发挥抗炎作用, 又可以参与多种疾病的病理进程, 例如深静脉血栓形成、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化性疾病等。动脉粥样硬化斑块破坏和管腔内血栓形成是急性冠脉综合征和缺血性中风共有的特点^[17-19]。而NETs含有的细胞外DNA具有细胞毒性和血栓形成效应^[12], 它具有将炎症和血栓形成联系起来桥梁作用。Borisof等^[20]进行了一项研究, 旨在阐明细胞外DNA形成和冠状动脉粥样硬化血栓形成前状态之间的关系。在此项研究中, 282例疑诊冠心病的受试者接受了冠状动脉CT检查和NETosis体内标志物测量, 结果显示: NETosis标志物(双链DNA、核小体、瓜氨酸化组蛋白H4和MPO-DNA复合物)与冠状动脉疾病的严重程度、血栓前状态以及主要不良心血管事件的发生都是独立相关的, 提示NETs形成参与并促进动脉粥样硬化进程。

既往有组织学研究^[21]显示在人和鼠的动脉粥样硬化病变的病灶内有NETs的存在。并且, 在急性心肌梗死患者的新鲜溶解的血栓标本中亦观察到中性粒细胞和NETs的存在^[22]。由此可见, NETs的存在与动脉粥样硬化病变息息相关。为了阐明NETs在动脉粥样硬化演变中的具体作用及其机制, 研究者们进行了大量的论证和研究。有研究^[23]表明: NETs促进动脉粥样硬化形成的机制可能涉及血浆树突细胞的自体免疫激活。从机制上来讲, 自体DNA(包括NETs中的DNA和从死亡细胞中释放的DNA)复合物和中性粒细胞产生的颗粒蛋白(如抗菌肽)能够刺激血管壁中的血浆树突细胞活化并产生强烈的I型干扰素反应, 从而导致动脉粥样硬化形成。与此一致的是, 在小鼠的体内试验中, 通过特异性的抗体减少血浆树突细胞已被证明能够减轻斑块负荷和I型干扰素反应^[24]。此外, 有证据^[25]表明: NETs可以直接激活并损伤内皮细胞。另外有研究^[26]表明: NETs可以直接诱导上皮细胞和内皮细胞死亡, 这可能与NETs的细胞毒性作用有关。而NETs的细胞毒性与其中所含的组蛋白、MPO和NE等成分密切相关, 当使用抑制剂抑制这些蛋白的活性后, NETs的细胞毒性作用明显降低。而且NETs中的自体DNA成分可以刺激机体自

体免疫激活和双链DNA抗体形成,从而促进动脉壁炎症反应及动脉粥样硬化病变的形成。如果从临床应用角度出发的话,以上这些关键的致病因素可能成为新型的治疗靶点。

在最近的一项研究^[27]中,研究者对接受了冠状动脉血栓及动脉内膜切除术的ST段抬高型急性冠脉综合征患者进行了分析,结果提示NETs有促进冠状动脉血栓形成的作用。此外,罪犯血管病变部位的NETs负荷与梗塞的面积呈正相关,与ST段回落程度呈负相关。事实上,在罪犯血管的病变部位,核小体、双链DNA、中性粒细胞弹性蛋白酶、MPO等NETosis的所有标记物都有所增加。国内亦有研究^[28]表明:急性脑梗死患者血浆中的游离中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil-derived circulating free DNA, cf-DNA/NETs)浓度显著增高,且其浓度水平与急性脑梗死病情严重程度相关,通过免疫荧光染色和电镜扫描发现,在获取的动脉血栓标本中均存在NETs成份,提示NETs在急性脑梗死动脉血栓形成中发挥重要作用。

值得注意的是,在最近的一项研究结果^[29]基础上,NETs和动脉粥样硬化的关系再次被探讨和强调^[30]。在动脉粥样硬化模型鼠体内,胆固醇结晶是NETs形成的触发因子。胆固醇晶体首先引起中性粒细胞释放NETs,NETs进一步促进巨噬细胞释放细胞因子,从而扩大斑块内的免疫细胞聚集和炎症反应。因此,危险信号如胆固醇结晶等可能通过与中性粒细胞的交互作用驱动无菌炎症反应,从而促进动脉粥样硬化进程。这项研究针对中性粒细胞和巨噬细胞之间是如何沟通这个问题提供了新的见解,并引入了一个新的概念:炎症小体和NETs之间的交互作用。胆固醇结晶介导的NETosis作为巨噬细胞炎症小体的刺激器,这是一个新的概念,使我们进一步认识了中性粒细胞在单核细胞招募中所发挥的作用。NETosis刺激的巨噬细胞活化不同于炎症消退过程中的巨噬细胞-中性粒细胞交互作用,事实上,胆固醇晶体的存在高度影响了这些细胞的相互作用。而在这整个链式反应中,NETs是不可或缺的一环,它在动脉粥样硬化的形成过程中扮演了极为重要的角色。

3 结语

自NETs被发现以来,针对NETs的研究从未间断,越来越多的研究显示NETs参与了多种疾病的病理进程,而NETs在动脉粥样硬化病理进程中的作用也越来越引起国内外研究者的重视,并且在

这个领域中开展了大量的研究。关于NETs在导致机体损伤和动脉粥样硬化的确切机制及其信号通路方面,仍然有待更深入更细致的研究,但其研究意义重大,可能为动脉粥样硬化性疾病的临床诊断和治疗带来新的思路和方法。

参考文献

1. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410-1422.
2. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2012, 110(6): 875-888.
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535.
4. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(2): 231-241.
5. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(3): 677-691.
6. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it?[J]. *Blood*, 2013, 122(16): 2784-2794.
7. Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines[J]. *Nat Med*, 2014, 20(5): 511-517.
8. Margraf S, Lögters T, Reipen J, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis[J]. *Shock*, 2008, 30(4): 352-358.
9. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(36): 15880-15885.
10. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(4): 819-835.
11. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, et al. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited[J]. *Anesth Analg*, 2012, 114(2): 275-285.
12. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases[J]. *Nat Med*, 2010, 16(8): 887-896.
13. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(21): 9813-9818.
14. Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases?[J]. *Front Immunol*, 2013, 3: 428.

15. Demers M, Wagner DD. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(3): 277-283.
16. Cedervall J, Olsson AK. NETosis in cancer[J]. *Oncoscience*, 2015, 2(11): 900-901.
17. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1262-1275.
18. Finn AV, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1282-1292.
19. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2001, 16(5): 285-292.
20. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyle MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8): 2032-2040.
21. Megens RT, Vijayan S, Lievens D, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(3): 597-598.
22. de Boer OJ, Li X, Teeling P, Mackaay C, et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(2): 290-297.
23. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, et al. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2012, 125(13): 1673-1683.
24. Macritchie N, Grassia G, Sabir SR, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): 2569-2579.
25. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2011, 187(1): 538-52.
26. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32366.
27. Mangold A, Alias S, Scherz T, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1182-1192.
28. 王欢. 中性粒细胞胞外诱捕网在急性脑梗死动脉血栓形成中作用的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
WANG Huan. Neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with acute ischaemic stroke[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015.
29. 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.
30. Nahrendorf M, Swirski FK. Immunology. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis[J]. *Science*, 2015, 349(6245): 237-238.

本文引用: 吕强, 杨勇, 刘惠亮. 中性粒细胞胞外诱捕网在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(2): 403-407. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.030

Cite this article as: LÜ Qiang, YANG Yong, LIU Huiliang. Research progress of neutrophil extracellular traps in atherosclerosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(2): 403-407. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.030