

中性粒细胞胞外陷阱网在动脉粥样硬化进展中的作用

左海奇, 李碧澄 综述, 田野 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 中性粒细胞胞外陷阱网; 动脉粥样硬化; 动脉粥样硬化性血栓

[摘要] 动脉粥样硬化是动脉血管壁长期渐进性的炎性病理过程。动脉粥样硬化斑块破裂及血栓形成所引起的急性心血管事件, 严重威胁人类健康及生命。近年来中性粒细胞在动脉粥样硬化中的作用受到广泛关注。活化的中性粒细胞向胞外释放网状结构, 即中性粒细胞胞外陷阱网。中性粒细胞胞外陷阱网在自身免疫疾病、急性肺损伤、深静脉血栓等疾病中具有致病作用。大量研究表明中性粒细胞胞外陷阱网与动脉粥样硬化及血栓形成相关, 其标志物可以作为冠心病的预测因子, 预测心脏主要不良事件及疾病预后。本文将就中性粒细胞胞外陷阱网在动脉粥样硬化进展中的作用进行综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Neutrophil extracellular traps have a role in the development of atherosclerosis

ZUO Hai-Qi, LI Bi-Cheng, TIAN Ye

(Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Neutrophil extracellular traps; Atherosclerosis; Atherothrombosis

[ABSTRACT] Atherosclerosis, which takes place in the walls of arteries, is a long-term progressive inflammatory pathological process. The rupture of atherosclerotic plaque and thus thrombosis may lead to acute cardiovascular events which threaten human health and life seriously. Recently, the role of neutrophils in atherosclerosis is attracted much attention. Activated neutrophils release web-like structures known as neutrophil extracellular traps (NETs). NETs affect the pathologic process in the patients with autoimmune diseases, acute lung injury, deep vein thrombosis, etc. A large number of studies indicate that NETs is associated with the formation of atherosclerosis and thrombosis. NETs, which act as predictive factors in coronary artery diseases, predict the major adverse cardiac events and the prognosis. This article is aimed to review the role of neutrophil extracellular traps in the development of atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是动脉血管壁长期渐进性的炎性病理过程, 严重威胁人类健康及生命。虽然目前对 As 进行预防和治疗的措施很多, 但其死亡率仍居中国疾病首位。As 引起的急性心血管事件主要与 As 斑块破裂后继发血栓形成有关。2004 年, Brinkmann 等^[1]首次发现活化的中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)可以向胞外释放一种网状结构物, 即中性粒细胞胞外陷阱网(neutrophil extracellular traps, NETs), PMNs 可以通过 NETs 发挥杀伤病原微生物的作用。此外,

NETs 在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、抗中性粒细胞胞浆抗体(antineutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关血管炎、费尔蒂综合征、急性肺损伤等疾病中的致病作用逐渐被研究者认识到^[2]。近年来又有学者发现 As 斑块^[3]和急性 ST 段抬高型心肌梗死(acute myocardial infarction with ST-segment elevation, STEMI)患者受累血管中的血栓^[4]有 NETs 的存在, 并已证实脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)降解 NETs 后, 可使 As 斑块缩小^[3]。本文将就 NETs 在 As 进展中发挥

[收稿日期] 2016-07-24

[修回日期] 2016-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81371709)

[作者简介] 左海奇, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制, E-mail 为 zhq1138724679@126.com。通讯作者田野, 博士后, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床研究, E-mail 为 yetian@ems.hrbmu.edu.cn。

的作用进行综述。

1 NETs 的结构及形成

NETs 具有独特的结构:以直径约 15~17 nm 平滑的核染色质纤维为支架,这些纤维支架上附着直径约 50 nm 的球状结构,主要为来源于 PMNs 的颗粒源性蛋白,如组蛋白、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、蛋白酶 G、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和抗菌肽 LL-37 等^[1],使用 DNase 而非蛋白水解酶能够导致 NETs 结构的解体,因此认为 DNA 构成了 NETs 的主要框架结构。

NETs 的形成过程称为 NETosis,它是不同于细胞凋亡和坏死的一种新的细胞死亡程序^[5]。NETosis 形成过程包括:诱导物通过受体活化中性粒细胞;细胞变平坦后黏附于基质,进而细胞内颗粒激活;细胞核染色质去浓缩化,分叶核消失,颗粒膜与核膜融合,颗粒内蛋白和染色质混合;最后,细胞膜破裂,附着颗粒蛋白的染色质纤维被释放到胞外^[5]。

除致病微生物以外,其他多种因素如脂多糖、(12-)十四酸佛波酯(-13-)乙酸盐、干扰素(interferon, IFN)、MPO、激活的血小板、内皮细胞、白细胞介素 8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等均能刺激 PMNs 产生 NETs^[6]。虽然确切的分子生物学机制尚未明确,但越来越多的证据表明 NETs 的形成和调控与活性氧的产生,以及组蛋白瓜氨酸化相关。有学者认为 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)途径产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)是 NETs 形成的先决条件,慢性肉芽肿患者的 PMNs 不能形成 NETs 与其 NOX 发生突变抑制了 ROS 产生相关^[7]。NOX 主要通过以下几个途径产生 ROS 诱导 NETosis 的发生,如蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的活化^[8]、RAF/MEK/ERK 信号通路的激活^[9]以及最近发现的 SK3 钾通道的激活介导的钙内流^[10]。在肽基精氨酸脱亚胺酶(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)作用下,中性粒细胞弹性蛋白酶降解组蛋白 H1,并且利用 PAD4 催化组蛋白 H3 或 H4 的精氨酸转化为瓜氨酸,进而消除残基上的正电荷,削弱组蛋白与 DNA 的结合,解开染色质致密结构阻断 NETosis 的发生^[5]。实验发现 PAD4 在 NETs 的形成必不可

少,SLE 鼠模型中 PAD4 抑制剂的使用减少了 NETs 的形成,并且预防皮肤、肾脏、血管的病变^[11]。另外,NE 通过分离组蛋白及协同 MPO 使核染色质解聚^[12]。由此可见,ROS、PAD4、NE 等在 NETs 形成中发挥重要作用。

2 NETs 与 As

最近有研究表明在 SLE 患者中,NETs 包含的 MMP-9 活化内皮细胞的前基质金属蛋白酶 2(pro-matrix metalloproteinase-2, pro-MMP-2),使内皮细胞表达活化的 MMP-2 并与 MMP-9 结合后引起内皮功能失调及损伤^[13](见图 1)。在 As 早期,损伤的内皮细胞募集单核细胞向内皮下转移,单核细胞进一步分化成巨噬细胞吞噬氧化脂质,转化成泡沫细胞,形成早期脂质条纹。除单核细胞外,近年来 PMNs 在 As 中的作用受到广泛关注。文献[14-15]发现在 As 早期阶段 PMNs 主要是通过释放危险信号分子(如抗菌肽 LL-37)发挥促 As 病变作用,抗菌肽 LL-37 存在于 NETs 中,其通过诱导内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1),使巨噬细胞聚集从而促进 As 病变(见图 1)。

在 As 进展期,NETs 激活 As 病变中的类浆树突样细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)的自身免疫,引起 IFN- I 大量合成释放,进而加强炎症反应促进 As 进展^[3,16]。研究证实使用 pDCs 抗体处理,可使 IFN- I 引起的炎症反应减弱,并使斑块负荷减轻^[16]。同时,Goossens 等^[17]发现阻断 IFN- I 信号通路能够防止病损部位巨噬细胞的聚集及坏死核心的形成,从而抑制斑块进展。此外,在破裂的 As 斑块中,IFN- I 信号通路的表达上调^[17]。IFN- I 以 IFN- α 和 IFN- β 为主。其中,IFN- α 激活 CD4⁺T 细胞产生 IFN- γ ,它通过 TNF 配体诱导的凋亡途径杀伤血管平滑肌细胞,降低 As 斑块的稳定性^[18]。IFN- β 则在增强内皮细胞与巨噬细胞的黏附的同时,促进 PMNs 向 As 易形成部位聚集,并促进巨噬细胞向斑块内聚集,共同促进斑块进展^[17](图 2)。

因此,NETs 主要通过加强 As 的免疫炎症反应,促进其进展。

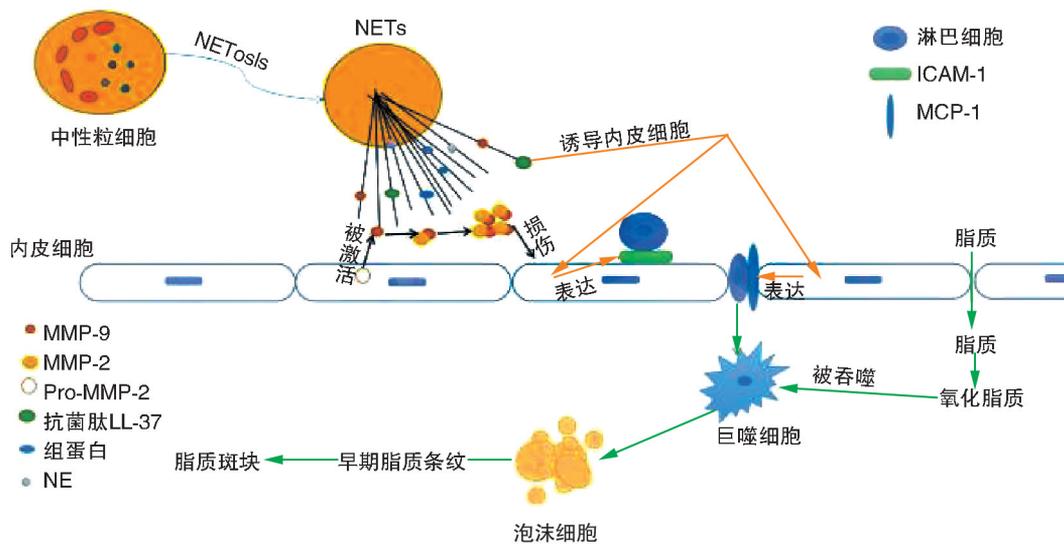


图 1. NETs 在 As 早期的作用

Figure 1. The role of neutrophil extracellular traps in early period of atherosclerosis

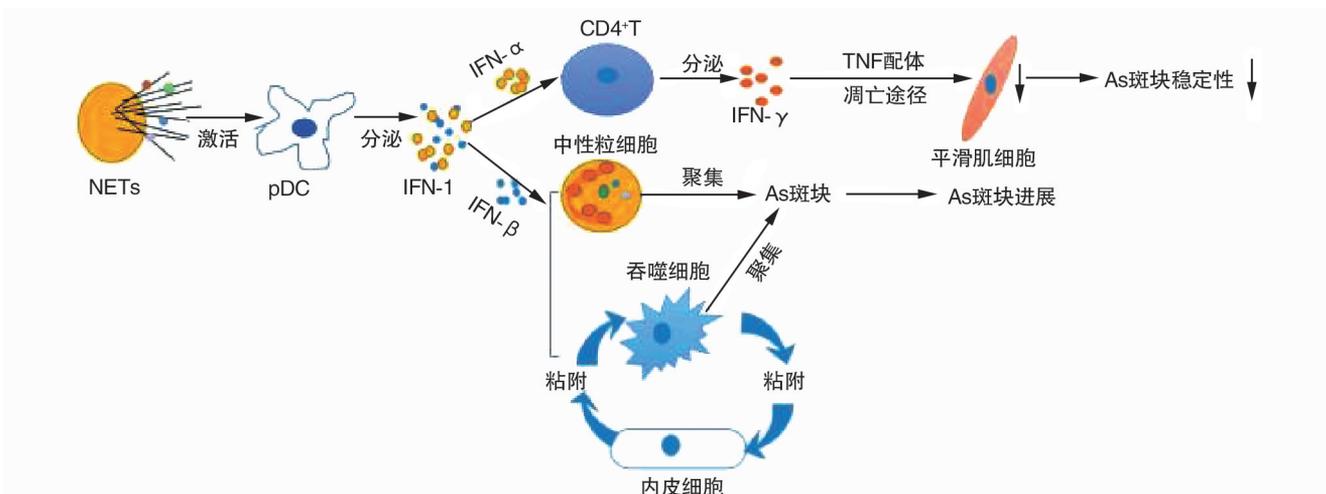


图 2. NETs 在 As 进展期的作用

Figure 2. The role of neutrophil extracellular traps in advanced period of atherosclerosis

3 NETs 与 As 所致血栓形成

研究表明 NETs 激活 pDCs 增加斑块负荷,减少胶原沉积,恶化斑块内环境造成 As 斑块不稳定^[16]。As 易损斑块破裂后引起血小板活化、聚集,活化的血小板衍生的趋化因子异聚体刺激 PMNs 释放 NETs^[6]。而这些 NETs 又可进一步活化血小板,并刺激血小板聚集^[19]。血小板聚集后造成血管管腔狭窄,使得局部聚集的凝血酶达到有效浓度,进一步使纤维蛋白原转变为纤维蛋白,促进血栓形成。NETs 与其主要组成部分,如 DNA、组蛋白、丝氨酸蛋白酶及 MMPs 等^[1],能够激活血小板和凝血的级联反应,进而促进血栓形成。

3.1 DNA 与组蛋白

DNA 是 NETs 的主要结构成分^[1]。有研究发现 NETs 带负电荷的 DNA 是凝血因子 X II 的激活剂,NETs 通过激活凝血因子 X II 引发内源性凝血途径研究^[20]。组蛋白是带正电荷的蛋白质,也是 NETs 中最丰富的蛋白质。组蛋白呈剂量依赖性触发血小板的激活和凝血酶的产生,实验发现组蛋白剂量增加后,血小板显示出很多活化特征,如血小板的聚集、磷脂酰丝氨酸的暴露、P 选择素的表达^[21-22]。组蛋白依赖血小板 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 和 TLR4 的信号激活血小板,并且 ERK、AKt、p38 和核坏死因子-β 几个经典细胞内途径在血小板激活的信号通路发挥重要作用^[22]。与凝血

途径交叉,组蛋白活化的血小板释放多磷酸盐,加强凝血酶的活化^[22]。而且,当组蛋白与DNA复合组成NETs时,其促进血小板激活和凝血酶产生的能力进一步扩大化^[22]。除了上述机制,有学者发现组蛋白通过分隔血栓调节蛋白和蛋白酶C(一种天然的抗凝剂),阻断依赖血栓调节蛋白的蛋白酶C的活化,促进凝血酶的激活^[23]。因此,DNA、组蛋白通过促进血小板的活化及凝血酶的激活诱导血栓形成。

3.2 丝氨酸蛋白酶

丝氨酸蛋白酶包括NE和蛋白酶G。NE和蛋白酶G在组织因子(tissue factor,TF)的活化、纤维蛋白的形成和血栓的稳定方面发挥作用^[24]。作为NETs中含量最高的非组蛋白的蛋白质,它们可能通过多种方式参与凝血途径。丝氨酸蛋白酶的功能之一是抑制组织因子途径抑制剂(tissue factor pathway inhibitor,TFPI)^[24]。NE通过蛋白酶水解TFPI使其失活,从而解除TFPI对TF/Xa抑制作用,引发凝血过程^[24]。此外,Wohner等^[25]发现NE与MMP-9协同作用使动脉中膜的蛋白聚糖网络降解,暴露胶原后导致血管假性血友病因子(von willebrand factor,VWF)和血小板的黏附,进一步促发凝血反应。而蛋白酶G通过裂解蛋白酶活化受体4(protease activated receptor 4,PAR4)使血小板活化,如形态改变、糖蛋白Ⅱb-Ⅲa的活化等,亦可诱导血栓的形成^[26]。

3.3 组织因子

近年来PMNs是否通过TF诱导血栓形成一直备受争议,而NETs中TF的表达证实了PMNs在血栓形成中的作用^[27]。2015年,Stakos等^[4]研究证明STEMI患者罪犯血管中的血栓包含PMNs和表达活性TF的NETs,实验发现STEMI患者循环血的PMNs表达胞内TF,而NETs介导TF的暴露,在As斑块破裂处的NETs中检测到活性TF的表达^[4]。罪犯血管中NETs表达的TF需要DNA激活凝血级联反应,一旦DNase降解NETs后,与TF途径相关的凝血酶形成及血小板活化会被抑制,凝血酶通过PAR1的细胞信号通路活化血小板,进而促进血栓形成^[4]。

NETs及其成分通过上述机制活化血小板、激活凝血酶,其对血栓的形成发挥重要作用。此外,NETs为捕获红细胞和聚集血小板提供支架,带负电荷的NETs与血浆蛋白绑定,如纤维蛋白原、纤维蛋白和VWF,具有稳定血栓的作用^[28]。

4 NETs与冠心病

2013年,Borisoff等^[29]发现NETs的标志物(双链DNA、核小体和MPO-DNA复合体)对于冠心病的有预测作用,它们能够预测疾病的严重程度。在282名冠状动脉疾病的患者中,冠状动脉粥样硬化严重的患者相关标志物水平明显升高,而且这些标志物也与凝血功能的活跃程度相关^[29]。血浆核小体的水平与冠状动脉狭窄风险显著相关,MPO-DNA复合体则被认为可以预测高危心脏事件的发生^[29]。2015年,一项关于NETs与STEMI患者预后关系的临床研究得出结论:STEMI患者罪犯血管的中性粒细胞高度活化并在病损部位经历NETosis,冠状动脉NETs的含量和DNase的活性与患者ST段回落(ST-segment resolution,STR)及心肌梗死面积相关^[30]。在冠状动脉病损部位,NETs标志物表达水平升高,并且这些标志物的水平与冠脉血栓中NETs的含量相关^[30]。由于冠状动脉血栓富含NETs,DNase通过降解NETs可以加速血栓的溶解^[30]。此外,Mehta等^[31]提出无复流现象是预测心脏不良临床预后的强有力因素。STR是评价无复流最简单的方法,Mangold等^[30]研究证明了NETs的含量与STR成反比。由此可见,血栓中NETs的含量与无复流现象密切相关。

As疾病的防治策略仍处于不断探索阶段,有很多学者不断探究其新靶点,如microRNA、LncRNA、载脂蛋白模拟肽的应用^[32]。而本文介绍的NETs或许能够成为As的又一治疗新靶点,NETs是一把双刃剑,它虽然杀伤病原微生物防止感染进一步扩散,但也能促进As及血栓的形成。目前NETs形成的确切机制仍不明确,刺激NETs形成的启动子、关键信号途径有待进一步探索,此外,NETs促进As进展的确切机制尚不明确,期待在未来进一步揭开。由此设想:用DNase或PAD4抑制剂阻断NETs形成或许可以为As提供新的治疗策略,防止心血管事件的发生。当关键通路明确后可进一步开发NETs的靶向治疗药物防治As。

[参考文献]

- [1] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532-535.
- [2] 尹晓雪,王琪,刘彦虹,等.中性粒细胞胞外诱捕网在非感染性炎症疾病中的作用[J].*免疫学杂志*,2015,31(6):537-540.
- [3] Megens RT, Vijayan S, Lievens D, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*,

- 2012, 107(3): 597-598.
- [4] Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in the culprit artery of acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(22): 1405-414.
- [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] Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1612-620.
- [7] Bianchi MA, Hakkim V, Brinkmann U, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis [J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2619-622.
- [8] Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, et al. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2013, 10(1): 1759-764.
- [9] Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(2): 75-77.
- [10] Douda DN, Khan MA, Grasmann H, et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(9): 2817-822.
- [11] Knight JS, Subramanian V, Alexander A, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2199-206.
- [12] Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, et al. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis [J]. *Cell Rep*, 2014, 8(3): 883-896.
- [13] Carmelo CR, Zhao WP, Yalavarthi S, et al. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(7): 1417-424.
- [14] Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, et al. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7): 1551-557.
- [15] Döring Y, Drechsler M, Wantha S, et al. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice [J]. *Circ Res*, 2012, 110(8): 1052-056.
- [16] 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): 1673-683.
- [17] Goossens P, Gijbels MJ, Zerneck A, et al. Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions [J]. *Cell Metab*, 2010, 12(2): 142-153.
- [18] Niessner A, Sato K, Chaikof EL, et al. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha [J]. *Circulation*, 2006, 114(12): 2482-489.
- [19] Knight JS, Zhao W, Luo W, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 2981-993.
- [20] Von Brühl ML, Stark K, Steinhilber 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.
- [21] Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, et al. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 110(5): 1035-045.
- [22] Semeraro F, Ammolto CT, Morrissey JH, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4 [J]. *Blood*, 2011, 118(7): 1952-961.
- [23] Ammolto CT, Semeraro F, Xu J, et al. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(9): 1795-803.
- [24] Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases [J]. *Nat Med*, 2010, 16(8): 887-896.
- [25] Wohnner N, Keresztes Z, Sötönyi P, et al. Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(7): 1624-631.
- [26] Faraday N, Schunke K, Saleem S, et al. Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation in vivo by blood neutrophils [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 1440-447.
- [27] Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis—the journey of TF through NETs. *Front Immunol*, 2012, 3(3): 385.
- [28] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15880-885.
- [29] Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen 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): 2032-040.
- [30] Mangold A, Alias S, Scherz T, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and dnase activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1182-192.
- [31] Mehta RH, Harjai KJ, Cox D, et al. Clinical and angiographic correlates and outcomes of suboptimal coronary flow in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(10): 1739-746.
- [32] 李靛, 谢巍, 唐朝克, 等. 我国动脉粥样硬化基础研究近三年进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1182-188.

(此文编辑 朱雯霞)