

# 中性粒细胞网的研究进展

赵赛男 李文卿综述 胡雁审校

(中山大学光华口腔医学院口腔生物学教研组 广州 510055)

**[摘要]** 中性粒细胞通过吞噬、脱颗粒和形成中性粒细胞网(NET)等方式抵抗微生物感染。自 NET 被发现后, 研究者们即从一个全新的视角来诠释固有免疫控制和杀伤微生物的机制。本文就 NET 的结构、形成和在疾病中的作用以及微生物逃逸 NET 的作用作一综述。

**[关键词]** 中性粒细胞网; 中性粒细胞; 固有免疫

**[中图分类号]** Q-1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.04.021

**Research progress on neutrophil extracellular traps** Zhao Sainan, Li Wenqing, Hu Yan. (Dept. of Oral Biology, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

**[Abstract]** It is believed that neutrophils have three major strategies to resist microbial infection, including phagocytosis, degranulation, and neutrophil extracellular traps(NET) formation. The discovery of NET introduces a brand-new perspective for the researchers from which they make analysis of the mechanism of innate immune system trapping and killing microorganisms. The thesis aims to give a review of NET's structure and formation, as well as the fuction in disease and the escape of microorganisms from NET.

**[Key words]** neutrophil extracellular trap; neutrophil; innate immune

中性粒细胞在固有免疫中发挥着重要的作用, 而且是机体防御系统的第 1 道防线。最近发现的中性粒细胞的第 3 种抗微生物策略, 即中性粒细胞网(neutrophil extracellular trap, NET)<sup>[1]</sup>可结合并杀伤细菌、真菌和寄生虫等各种微生物。

## 1 中性粒细胞网的结构

NET 是由激活的中性粒细胞释放到细胞外的纤维状结构, 中性粒细胞被活化剂激活之后约 10 min 开始释放 NET。NET 由颗粒和核成分组成, 数种 DNA 嵌入染料都可使 NET 有较强的染色, 脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)可降解 NET, 即 DNA 是 NET 的主要组成部分。在高分辨率扫描电子显微镜下, NET 由直径 15~17 nm 的平滑纤维和直径约 25 nm 的球状域组成; 在透射电子显微镜下, NET 周围没有膜包围<sup>[2]</sup>。Urban 等<sup>[3]</sup>发现, NET 由修饰的核小体和经过严格筛选的蛋白质组成, 而且数种 NET 蛋白质是未刺激的中性粒细胞的细胞质, 其完整的蛋白质组分

还不清楚。

## 2 中性粒细胞网的形成

白细胞介素(interleukin, IL)-8、佛波醇-豆蔻酸-乙酸酯或者脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可活化中性粒细胞, 诱导 NET 的产生<sup>[2]</sup>。成熟的中性粒细胞相对于未成熟的中性粒细胞高表达干扰素靶基因, 表达于成熟中性粒细胞的干扰素 $\alpha$ 和 $\beta$ 型能够在补体因子 5a(C5a)刺激中性粒细胞后促进 NET 的形成, 如果没有干扰素, C5a 刺激中性粒细胞后则不能形成 NET<sup>[4]</sup>。用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和 Toll 样受体 4 或者补体 5a(C5a)刺激中性粒细胞, 有活性的中性粒细胞可产生 NET。通过激光共聚焦扫描显微镜和 PCR 数据表明线粒体 DNA 的释放不会出现程序性细胞死亡, DNA 荧光染料不能进入活化的中性粒细胞证明, NET 形成后细胞膜是完整的, 即中性粒细胞释放线粒体 DNA 不依赖细胞死亡<sup>[5]</sup>。

也有研究显示, NET 形成是一种新型的活化细胞死亡的结果。激活的中性粒细胞受到刺激后, 中性粒细胞的细胞核变形, 其常染色质和异染色质变得均匀, 随后核膜和颗粒膜裂解, 使 NET 形成混合性物质; 最后细胞膜破裂 NET 释放出来,

[收稿日期] 2010-01-21; [修回日期] 2011-03-11

[基金项目] 广东省科技计划基金资助项目(2009B060700095)

[作者简介] 赵赛男(1985—), 女, 河北人, 硕士

[通讯作者] 胡雁, Tel: 020-83861260

但这种细胞死亡程序明显不同于程序性细胞死亡。其一，因为 DNA 没有断裂，在细胞死亡之前没有磷脂酰丝氨酸的暴露；其二，中性粒细胞形成 NET 和程序性细胞死亡在形态学特征方面有较大的不同，中性粒细胞形成 NET 后核膜完全破裂，大部分颗粒溶解，细胞核和细胞质以及颗粒成分混合在一起，而程序性细胞死亡出现核浓缩、核碎裂和细胞质空泡化；其三，胱氨蛋白酶是程序性细胞死亡的刽子手，但却没有参与 NET 的形成过程；其四，活化的中性粒细胞形成 NET 有赖于还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)<sup>[6]</sup>。此外一些受体，例如 Fc $\gamma$  受体和病原体模式识别受体(如 Toll 样受体或凝集素受体)对 NET 的形成是必不可少的<sup>[7]</sup>，这些受体激活后，可激活蛋白激酶 C，蛋白激酶 C 始动信号转录级联反应，从而诱导还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶复合物的组装和激活<sup>[8]</sup>。即 NET 的形成要依赖 ROS，而且 ROS 在启动该程序中起到核心作用<sup>[1]</sup>。

### 3 中性粒细胞网与疾病

NET 在固有免疫中发挥着非常重要的作用。即 NET 可结合和杀伤各种微生物，可能通过形成物理屏障来抑制微生物，在加强抗菌协同作用的同时减少宿主组织的损伤。金黄色葡萄球菌、A 组链球菌和肺炎链球菌等革兰阳性细菌，志贺杆菌和伤寒沙门菌等革兰阴性细菌以及白色假丝酵母菌都可与 NET 结合，通过在局部提供高质量分数的抗菌蛋白质来诱捕和杀伤微生物，从而防止炎症向周围健康组织扩散。

#### 3.1 细菌性疾病

中性粒细胞可杀死革兰阳性和阴性细菌。慢性牙周炎是牙周组织慢性炎症性疾病，其特征是龈沟中有大量的中性粒细胞。NET 和龈沟渗液液的结合，构成了清除慢性牙周炎龈沟细菌的一种新型的防御机制<sup>[9]</sup>，NET 可保护上皮并且在较大程度地降低细菌的攻击。

分支杆菌可诱导中性粒细胞产生 NET，NET 可捕获分支杆菌但不能将其杀死<sup>[10]</sup>。同样，在肺炎双球菌性肺炎中，NET 可捕获肺炎双球菌且不能够将其杀死<sup>[11]</sup>。在人类阑尾炎和链球菌性坏死性筋膜炎以及志贺菌病试验模型等病理条件下，都有 NET 的形成，且 NET 在抗感染过程中发挥作用。

#### 3.2 真菌性疾病

白色假丝酵母菌是人类霉菌病中最常见的病原体。假丝酵母菌病可从轻微的皮肤和黏膜表面感染发展成为严重的播散性系统性疾病。播散性假丝酵母菌病主要发病于免疫功能缺陷的个体。白色假丝酵母菌有数种不同的毒力特性，其中之一就是具有酵母细胞形式和菌丝细胞形式相互转变的能力。酵母形式具有较高的增殖能力，而菌丝形式在侵入和破坏组织方面发挥重要作用。研究证明真核生物病原体白色假丝酵母菌可诱导 NET 的形成并对 NET 介导的杀伤作用敏感，中性粒细胞可形成 NET 来捕获和杀伤白色假丝酵母菌丝和酵母型细胞<sup>[7]</sup>。

Urban 等<sup>[12]</sup>使用蛋白质组学方法确定了 24 种 NET 相关蛋白，其中包括细胞质钙网蛋白复合体(也叫做 Mrp8/14-复合物或者 S100A8/A9)。细胞质钙网蛋白复合体属于 S100 钙结合蛋白家族，形成异二聚体钙网蛋白，大量存在于中性粒细胞、单核细胞和早期分化阶段的巨噬细胞。钙网蛋白是 NET 结合蛋白中的主要蛋白质，NET 释放的抗真菌钙网蛋白异二聚体是主要的抗真菌成分。如果 NET 缺乏钙网蛋白，将导致其抗真菌活性完全消失。钙网蛋白对于小鼠有效抗皮肤、肺和系统性白色假丝酵母菌感染必不可少，从这些动物的组织切片可检测到 NET 和 NET 相关钙网蛋白。钙网蛋白缺陷的小鼠与野生型小鼠相比较，钙网蛋白缺陷小鼠的抗感染能力弱，即钙网蛋白对于感染的清除非常重要。研究证实，钙网蛋白在体外具有抗菌活性，在体内可有效防御白色假丝酵母菌感染。因此，这对研究免疫系统如何抵抗真菌病原体具有重要的作用。

#### 3.3 寄生虫性疾病

Baker 等<sup>[12]</sup>发现，NET 与恶性疟原虫感染有关，NET 的形成和抗核 IgG 抗体所形成的双链 DNA 分子可能能够诱导儿童疟原虫感染，在成年人则可激发其机体保护机制来抵抗病原体感染。

#### 3.4 其他疾病

先兆子痫是一种严重的与妊娠有关的疾病，涉及母体固有免疫系统的激活。推测是由于炎性合体滋养微粒的释放和来自异常胎盘的细胞因子引起的，且涉及滋养细胞分化异常。Gupta 等<sup>[13]</sup>通过流式细胞仪测量 CD11b 的表达，证明了胎盘源性因子 IL-8 和胎盘源性炎性碎片 (syncytiotrophoblast microvillous membrane, STBM) 可激活外周

中性粒细胞并产生 NET，通过电子显微镜和荧光显微镜检测到在胎盘组织切片中体内外激活的中性粒细胞产生的 NET。即胎盘源性的 IL-8 和 STBM 可有效激活中性粒细胞并触发 NET 的形成，先兆子痫胎盘的绒毛间有大量 NET 的形成；因此，NET 可能是激活的中性粒细胞的主要部分，而且在先兆性子痫中其数量的增加可能在其发病机制中发挥了重要作用。这同时也表明，NET 不仅可诱捕细菌、真菌等病原微生物，也可诱捕例如 STBM 样的小的微粒。

在体内败血症模型中，活化的血小板诱导中性粒细胞在肝脏的血窦和肺产生 NET。经 LPS 进行处理和 Toll 样受体-4 激活的血小板，黏附于肝脏血窦的中性粒细胞。在体外，这种相互作用，数分钟内引起中性粒细胞产生 NET，并且在流动的情况下可结合细菌；在体内，NET 结合的细菌较中性粒细胞或巨噬细胞通过吞噬作用结合的细菌多。这表明在败血症模型中，NET 诱捕细菌较吞噬作用更有效。

#### 4 病原体逃逸 NET

由于 NET 的结构骨干是由染色质组成的，故 NET 可被 DNase 破坏，即 NET 在体外经 DNase 处理后，不能杀死微生物。诸多病原菌可产生 DNase，如人类细菌病原体 A 组链球菌的所有菌株都至少产生一种细胞外 DNase，而且大多数菌株都可产生数种不同的酶，从而使链球菌逃逸 NET 的作用。在用患有坏死性筋膜炎的 DNase 灭活的 A 组链球菌小鼠模型进行的试验中，DNase 缺陷细菌所致的皮肤病损与野生型菌株相比较要小 1%；与之相反，将表达 DNase 的菌株加入到 DNase 缺陷菌株，其所致的皮肤病损范围扩大而且细菌在体内扩散。

同样在肺炎链球菌，与此相似的机制也被证明。肺炎双球菌可被 NET 诱捕，但是 NET 不能将其杀死。其细胞表面表达 endA 编码的核酸内切酶是许多肺炎球菌菌株共同的特点。EndA 可使肺炎双球菌降解 NET 的 DNA 骨架，从而逃逸 NET 的杀伤。此外，肺炎是肺炎球菌逃脱 NET 作用的结果，加速了肺炎双球菌从上呼吸道到肺和从肺到血液中的扩散<sup>[11]</sup>。细菌的毒力因子不仅可通过降解 NET 而使细菌逃逸 NET 的诱捕和杀伤，细菌还可通过形成包膜来减少被捕获的机会，可通

过增加细胞表面的正电荷来抵抗 NET 介导的杀伤。

#### 5 参考文献

- [1] Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NET :A new strategy for using old weapons[J]. Trends Immunol, 2009, 30(11) : 513-521.
- [2] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663) :1532-1535.
- [3] Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(10) :1000639.
- [4] Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(42) :44123-44132.
- [5] Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(11) : 1438-1444.
- [6] 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.
- [7] Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(4) :668-676.
- [8] Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide :Why neutrophils die to make NET[J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(8) :577-582.
- [9] Vitkov L, Klappacher M, Hannig M. Extracellular neutrophil traps in periodontitis[J]. J Periodont Res, 2009, 44(5) :664-672.
- [10] Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Tuberculosis (Ed-inb), 2009, 89(1) :29-37.
- [11] Beiter K, Wartha F, Albiger B, et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps[J]. Curr Biol, 2006, 16(4) :401-407.
- [12] Baker VS, Imade GE, Molta NB, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age[J]. Malar J, 2008, 7 :41.
- [13] Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, et al. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia [J]. Hum Immunol, 2005, 66(11) :1146-1154.

(本文编辑 汤亚玲)