·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.041

中性粒细胞胞外诱捕网在新生儿感染中的临床应用进展*

赵智慧[1],封志纯[2]综述,赵文利[2,3△]审校

(1.泸州医学院附属医院儿科,四川泸州 646000;2.北京军区总医院附属八一儿童医院早产 NICU,北京 100000;3.成都军区总医院儿科,成都 610083)

关键词:中性粒细胞;婴儿,新生;感染;胞外抓捕网

中图分类号:R722.13 **文献标识码**:A **文章编号**:1671-8348(2014)29-3965-03

新生儿感染是新生儿死亡的主要原因之一。2010 年全世界有超过 300 万新生儿死于感染[1]。其中细菌感染以其发展迅猛、高致死率、致残率成为关注焦点。保护生命关键在于出生前 72 h。对新生儿细菌感染的早期发现、监测、诊断和干预成为新生儿医学的重要任务。分子生物学中 DNA 芯片作为一种快速检测及鉴定包括细菌在内的多种病原体检测方法,在 2009 年 12 月被 Lancet 报道,比传统培养法平均快 18 h。细胞生物学中关于中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)的系列研究进展给我们提供了新的思路。本文就 NETs 在新生儿感染的作用及临床应用研究进展综述如下。

1 NETs 在抗感染免疫中的作用

中性粒细胞是人体先天免疫系统的重要效应细胞,在抗感染免疫早期应答阶段发挥主力作用。除了胞内吞噬杀菌途径外,还分泌蛋白多肽、细胞因子影响免疫过程(特别是细胞免疫),并调节炎性反应强度。新近发现中性粒细胞通过 NETs 介导细胞死亡途径,在胞外杀灭病原体,参与感染早期免疫应答[2]。

1.1 NETs 产生及组成 Brinkmann 等[3]首次报道,在感染或炎症应答中,活化中性粒细胞核内组分会被释放到细胞外,形成纤维状结构,捕捉并杀灭细菌,并将此网状结构命名为 NETs。已经证实,感染状态下大量促炎因子,如 H_2O_2、佛波酯(PMA)、脂多糖(LPS)、白介素-8(IL-8)、干扰素 α/γ+补体 5a(IFN-α/γ+C5a)、肿瘤坏死因子(TNF)和血小板活化因子(PAF)等均可激活中性粒细胞,继而使 NADPH 氧化酶活化,产生大量活性氧簇(ROS),后者与 Toll 样受体 4(TLR4)结合,使中性粒细胞发生核膜分裂。弹性蛋白酶(NE)和髓过氧化物酶(MPO)移行核内,作用于组蛋白,使染色质解聚,另外肽基精氨酸脱亚氨酶 4(peptidyl arginine deiminase,PAD4)催化组蛋白精氨酸残基瓜氨酸化而促进染色质解聚。解聚后的染色质呈松驰的去致密状态,与细胞质和颗粒蛋白等混合,被释放到细胞外而产生 NETs[4]。

NETs 包含中性粒细胞源性循环游离 DNA(circulating free DNA from neutrophil excelluar traps,cf-DNA/NETs)、组蛋白以及细胞质蛋白酶颗粒。cf-DNA/NETs 是中性粒细胞激活后主动释放的网状染色质,构成 NETs 主要骨架。组蛋白有 H1、H2A、H2B、H3 和 H4。蛋白酶颗粒包括 NE、MPO、溶菌酶、组织蛋白酶 G、明胶酶、钙粒蛋白、乳铁蛋白、杀菌通透性增加蛋白、防御素等[5]。

1.2 中性粒细胞死亡程序-ETosis 2006 年 Fuchs 等[6]指出,中性粒细胞在活性氧参与下活化,而活化中性粒细胞死亡时释放 NETs 的过程是既不同于细胞凋亡(apoptosis),又不同于细胞坏死(necrosis)的第 3 种死亡新途径,称为胞外抓捕网式死亡(ETosis),表现为核膜崩溃、细胞核和细胞质基质混合、细胞器消失,并在胞外形成纤维样抓捕网结构,抓捕网中 DNA 呈细长丝状未断裂。2010 年报道了另一种不依赖活性氧的 ETosis。在应答金黄色葡萄球菌中,中性粒细胞不发生细胞溶解或细胞膜破裂,而是核内膜与外膜直接分离,芽生内含 DNA 的囊泡,被完整地拉伸到细胞外释放出染色质,整个过程仅需 5~60 min[7]。

1.3 NETs 的作用

1.3.1 NETs 捕杀细菌等病原体 NETs 具有防御病原体扩散并捕杀病原体的作用。伴随中性粒细胞趋化 NETs 定位于感染部位,其网络状染色质结构使其具强大粘性,更有效地捕获病原体,而防御病原体扩散。同时,细菌一旦陷入 NETs 内,局部高浓度多种抗菌蛋白就能将其杀灭[6]。组蛋白、丝氨酸蛋白酶和 MPO 在 NETs 杀菌过程中发挥主要作用,组蛋白是 NETs 含量最多的蛋白,具有强大杀菌作用,组蛋白杀菌能力是同等剂量的其他杀菌剂如防御素的 100 多倍。组蛋白能杀灭革兰阳性和阴性细菌,如鼠伤寒沙门氏菌、肠道沙门氏菌、弗氏志贺菌、化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌和炭疽芽孢杆菌等[8],并且组蛋白片段还可以结合细菌 DNA 并干扰回旋酶活性阻止细菌繁殖。丝氨酸蛋白酶能分解细菌细胞膜,而 MPO 催化次氯酸形成而杀灭细菌。此外,NETs 对其他病原体如真菌[9]、寄生虫[10]和病毒[11]也有杀灭作用。新近报道,通过 TLR-7 和 TLR-8,免疫缺陷型病毒(HIV)-1 可诱导 NETs 产生而被灭活。但部分病原菌如 A 型链球菌和肺炎链球菌等,在特定毒力因子帮助下能逃逸 NETs 的杀灭作用。

1.3.2 NETs 细胞毒性 Saffarzadeh 等[12]发现 NETs 可直接引起人上皮细胞与内皮细胞死亡,提示 NETs 具有细胞毒性作用。这种作用也与 NETs 中主要杀菌物质有关,组蛋白是 NETs 细胞毒性作用的主要毒力因子,丝氨酸蛋白酶能分解宿主细胞外基质蛋白引起组织损伤,而 MPO 催化形成次氯酸能致膜脂质过氧化而损伤细胞膜结构。

2 新生儿中性粒细胞和 NETs 的特点

中性粒细胞功能对于新生儿,尤其是早产儿特别重要。深入认识新生儿中性粒细胞功能状态,并探讨促进其功能的方法可能是早期预防和治疗新生儿感染的新策略。

2.1 新生儿中性粒细胞的特点 新生儿生后第 1 天白细胞数

* **基金项目**:中国博士后科学基金资助项目(2013M532139)。 **作者简介**:赵智慧(1986-),住院医师,硕士,主要从事新生儿科临床工作。

△ **通讯作者**,E-mail:rosewenly@sina.com。

为(15～20)×10^9/L,分类以中性粒细胞为主,此后数量下降,至 5 天后接近婴儿值,分类在 4～6 d 与淋巴细胞相近,以后转为淋巴细胞占优势。同时,新生儿感染性疾病却是新生儿死亡的主要原因之一。新生儿生后早期远远高于其他人群的中性粒细胞数量与起高发的感染形成一种矛盾现象。该现象的一个主要原因在于新生儿生后早期中性粒细胞虽然数量巨大,但却功能低下或有功能障碍[2]。

2.2 新生儿 NETs 特点 新生儿中性粒细胞产生 NETs 的能力低下,胞外杀菌作用较低。在感染性疾病早期,炎症部位中性粒细胞生成 NETs[13]。Yost 等[14]研究发现与成人中性粒细胞经刺激孵化 60 min 后能清楚地形成 NETs 相反,分离自脐带血的足月新生儿中性粒细胞形成极少 NETs,早产儿中性粒细胞不能形成 NETs。并且足月新生儿中性粒细胞对大肠埃希菌的总杀菌力低于成人中性粒细胞。事实上新生儿中性粒细胞胞内杀菌力并不减弱,而胞外杀菌力显著降低,推测新生儿中性粒细胞杀菌作用降低与其形成 NETs 能力低下有关。新生儿中性粒细胞产生 NETs 较成人迟缓。据报道健康成人中性粒细胞受刺激后 10～30 min 内就能产生 NETs,NETs 产生时间与刺激剂浓度有关。Yost 等[15]研究发现,足月新生儿中性粒细胞在 LPS 等刺激下孵化 2 h 几乎没有产生 NETs,同样研究条件下胎龄小于 30 周的早产儿中性粒细胞不能产生 NETs。相似研究显示,LPS 刺激新生儿中性粒细胞 2 h 才开始产生 NETs[16],刺激 3 h 后产生 NETs 能力几乎与成人相同。新生儿中性粒细胞产生 NETs 相对延迟,并且胎龄越小,延迟程度越重,提示其原因可能与产生 NETs 的调节机制不成熟有关。上述研究均显示,在受刺激后的早期时间段内新生儿中性粒细胞不能产生 NETs,或者产生 NETs 迟缓 2～3 h。

因此新生儿生后早期虽然中性粒细胞虽数量巨大,但产生 NETs 能力低下并且迟缓,提示胞外杀菌能力低下,导致细菌不能在入侵早期被中性粒细胞为主的先天免疫杀灭控制,这可能是新生儿感染发病率高的原因之一。这也提示新生儿发育性免疫缺陷的复杂性与中性粒细胞胞外防御机制的重要性。

3 cf-DNA/NETS 在感染性疾病中的临床应用

大量临床应用研究显示,中性粒细胞来源血循环游离 DNA(cf-DNA/NETs)有望成为新生儿感染精准、快速的新诊断方法、判断预后的新标志和抗感染治疗策略的新靶点。对于 cf-DNA 的临床应用价值应该重新评价。

3.1 cf-DNA/NETs 的检测 cf-DNA/NETs 是循环中 NETs 的主要成分。定量分析 cf-DNA/NETs 可以采用显微技术和 DNA 染色计数,通过检测与弹性蛋白酶(NE)和髓过氧化物酶(MPO)等中性粒细胞蛋白紧密结合的染色质,而区别源于其他细胞死亡后释放的染色质[13]。Margraf 等[17]利用 DNA 绿色荧光染料(PicoGreen)建立了血浆 cf-DNA/NETs 快速定量检测方法,能够特异性地检测血浆中的 cf-DNA/NETs,该技术为临床研究 cf-DNA/NETs 与疾病的关系提供了平台。

3.2 cfDNA/NETS 的临床应用价值 cf-DNA/NETs 含量反映了 NETs 的生成,反映创伤患者中性粒细胞高反应性,随炎性反应强度而变化,而与组织损伤无关。目前,cf-DNA/NETs 作为监测炎症过程的重要标志物已进行了多项成人临床研究[17],例如化脓性关节炎、多器官衰竭、败血症、多发性创伤和烧伤患者等,显示早期检测有利于对脓毒血症关节炎的早期诊断和早期手术治疗;cf-DNA/NETs 可能是预测烧伤患者死亡率的一种快速有价值的标志物。在 1 项针对 37 例严重创伤患者的前瞻性试点研究中,将多发性创伤患者 cf-DNA/NETs 的时间动态变化与 C 反应蛋白(CRP)、IL-6、白细胞(WBC)计数和 MPO 进行比较,发现最初高水平 cf-DNA /NETs(＞800 ng/mL)在第 5～9 天再次增高者与随后的脓毒症、多器官功能衰竭(MOF)和死亡相关;同时 IL-6 显著升高,但不能提示第二次爆发的炎性反应。Meng 等[18]类似研究显示血浆 cf-DNA/NETs 值在多发性创伤后第 5～9 天发展为脓毒血症患者中再度升高。监护室重症患者中性粒细胞过度活化促进了“炎症二次打击”的发展,包括密切相关的全身炎症反应综合征(SIRS)、组织损害、器官衰竭、脓毒血症,约 33%脓毒血症患者有至少一个器官衰竭,尤其是急性肺损害和急性呼吸窘迫综合征,以及急性肾功能衰竭,其中中性粒细胞似乎对组织损害负主要责任[19]。故 cf-DNA/NETs 有望成为 ICU 中评估损伤严重程度和/或早期预测炎症二次打击、器官功能衰竭及脓毒血症发生和判断预后的新标志。

cf-DNA/NETs 还可能在创伤后病理生理过程中发挥预测作用。异常高水平 cf-DNA/NETs 可能也促进毛细血管内血液凝固、微循环障碍和组织损伤。Meng 等[18]研究还发现在多发性创伤后发展为脓毒血症的患者早期血浆 cf-DNA/NETs 和 DNase 明显高于无脓毒血症患者和健康志愿者,彼此之间有强相关性。提示机体适当释放 DNase 能够对 NETs 抗菌作用进行抑制,或者削弱脓毒血症患者体内过量的 NETs 对自身组织的破坏。而新近研究发现,在器官衰竭和脓毒血症患者中血浆 DNAse 水平是降低的,这可能是中性粒细胞在危重疾病患者中具有更长寿命的原因。而中性粒细胞产生 NETs 失能,如慢性肉芽肿病患者,可能与免疫麻痹和脓毒血症相关。而通过基因治疗恢复 NETs 形成能力成为慢性肉芽肿病的新的治疗方法[20]。因此 cf-DNA/NETs 还可能是新的抗感染治疗策略重要靶点。目前,尚未见 cf-DNA/NETs 作为监测炎症过程的重要标志物用于新生儿疾病的临床研究。

4 结 语

综上所述,人体内形成 NETs 是一种重要的先天免疫应答机制,然而,体内异常大量的 NETs 也是导致组织损伤的病理因素之一。中性粒细胞功能对于新生儿,尤其是早产儿特别重要。新生儿中性粒细胞形成 NETs 迟缓及细胞外杀菌能力低下与新生儿感染性疾病发病率高有关。这为人类研究新生儿中性粒细胞功能缺乏与寻找新的治疗策略提供了新的研究思路。而在具体新生儿疾病中性粒细胞是如何被活化,何时发挥作用,如何发挥杀菌作用,局部 NETs 形成情况,cf-DNA/NETs 动态变化,是否有价值成为新的治疗靶点,cf-DNA/NETs 的诊断、预测、预后价值,以及不同胎龄新生儿中性粒细胞在严重感染时免疫应答规律、发育形成 NETs 所需时间、在体内抗感染能力如何,均有待进一步研究。关于新生儿中性粒细胞的基础和临床研究应该深入探索,cf-DNA/NETs 作为监测炎症过程的重要标志物或许成为一种新的选择。

参考文献:

[1] Anonymous. Management of early neonatal infections: a work in progress[J]. Lancet, 2012, 380(9844): 780-781.

[2] Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide Generation[J]. Cell Res, 2011, 21(2): 290-304.

[3] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663):1532-1535.
[4] Rada B, Jendrysik MA, Pang L, et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase[J]. PLoS One, 2013, 8(1):1371-1383.
[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] 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] Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus[J]. J Immunol, 2010, 185(12):7413-7425.
[8] Lögters T, Margraf S, Altrichter J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps[J]. Med Microbiol Immunol, 2009, 198(4):211-219.
[9] Mccormick A, Heesemann L, Wagener J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus[J]. Microbes Infect, 2010, 12(12/13):928-936.
[10] Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, et al. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps[J]. Infect Immun, 2012, 80(2):768-777.
[11] Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1[J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(1):109-116.
[12] 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):1371-1385.
[13] Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, et al. Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4):1-18.
[14] Yost CC, Cody MJ, Harris ES, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates[J]. Blood, 2009, 113(25):6419-6427.
[15] Yost CC, Zimmerman GA, Cody MJ, et al. Impaired neutrophil extracellular trap(NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates[J]. Blood, 2009, 113(25):6419-6427.
[16] Marcos V, Nussbaum C, Vitkov L, et al. Delayed but functional neutrophil extracellular trap formation in neonates[J]. Blood, 2009, 114(23):4908-4911.
[17] 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.
[18] Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, et al. Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2(23):1155-1163.
[19] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917):885-891.
[20] Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis[J]. Blood, 2009, 114(13):2619-2622.

(收稿日期:2014-07-01 修回日期:2014-08-09)

·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.042

蒿甲醚及其制剂的临床应用研究进展*

张亚红,王丽娟,甘淋玲 综述,朱照静△审校
(重庆医药高等专科学校药学院 400030)

关键词:疟疾;药用制剂;蒿甲醚;临床应用
中图分类号:R944.9 **文献标识码**:A **文章编号**:1671-8348(2014)29-3967-04

蒿甲醚(artemether,ARM)是青蒿素的甲基醚衍生物,其抗疟疾的效果是其先导化合物青蒿素的 6 倍。蒿甲醚于 1995 年收入 WHO 的基本药物目录,FDA 于 2009 年批准复方蒿甲醚片(蒿甲醚 20 mg/苯芴醇 120 mg),该制剂是现今治疗疟疾的基于青蒿素的组合疗法(ACT)的主要药物。蒿甲醚属国家重要保护品种,目前在国内上市销售的剂型包括片剂、胶丸、胶囊和注射剂,此外还有与苯芴醇组成的复方制剂,其适应证主要为各类疟疾。此外,蒿甲醚的药理作用还包括抗血吸虫、抗肿瘤等,本文就近年来蒿甲醚及其制剂的临床应用研究进展作一综述。

1 蒿甲醚制剂的研究进展

1.1 临床应用的蒿甲醚制剂 目前临床上使用的蒿甲醚剂型

* **基金项目**:重庆市卫生局 2012 年医学科研计划项目(2012-2-261)。 **作者简介**:张亚红(1981-),讲师,硕士,主要从事药物制剂及药物分析研究。 △ **通讯作者**,E-mail:zhaojing6271@126.com。