

中性粒细胞杀菌机理的最新研究进展

时小淋^{1a,2}, 王晓丰^{1b}, 刘鹏^{1a}, 程艳杰², 王明义^{1a}

(1. 大连医科大学附属威海市立医院 a 中心实验室; b 消化内科, 山东威海 264200;

2. 大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁大连 116000)

摘要:中性粒细胞作为外周血中最多的白细胞,在机体免疫应答抵抗外界感染中发挥重要作用。目前,普遍认为中性粒细胞主要通过活性氧杀菌途径、脱颗粒杀菌途径和胞外杀菌网络(Neutrophil Extracellular Traps, NETs)途径杀灭病原体,若其杀菌途径缺失或抑制将导致反复感染,若过度激活也将对机体造成损伤。该文主要针对中性粒细胞杀菌机理的最新研究进展作以综述,以期为后续的中性粒细胞过度激活后具体作用途径以及作用靶点的研究提供理论基础。

关键词:中性粒细胞;杀菌机制;活性氧分子;脱颗粒;胞外杀菌网络

中图分类号:R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2020)01-161-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.043

Recent Research Progress on Germicidal Mechanism of Neutrophils

SHI Xiao-lin^{1a,2}, WANG Xiao-feng^{1b}, LIU Peng^{1a}, CHENG Yan-jie², WANG Ming-yi^{1a}

(1a. Department of Central Laboratory; 1b. Department of Gastroenterology, Weihai Municipal Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Shandong Weihai 264200, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116000, China)

Abstract: Neutrophils, as the largest number of white blood cells in the peripheral blood, play an important role in the immune response to external infection. At present, it was generally believed that Neutrophil Extracellular Traps (NETs) mainly kill pathogens through reactive oxygen species sterilization pathway, degranulation sterilization pathway and NETs pathway. If the lack or inhibition of NETs pathway will lead to repeated infection, and if the excessive activation will also cause damage to the body. This paper reviews the latest research progress on the germicidal mechanism of neutrophils in order to provide a theoretical basis for the follow-up studies on the specific action pathway and target of neutrophil overactivation.

Keywords: neutrophils; sterilization mechanism; reactive oxygen species; degranulation; neutrophil extracellular traps (NETs)

在人体血液循环中约70%的白细胞为中性粒细胞,正常人骨髓每天可生成大量、新鲜的中性粒细胞^[1],作为先天免疫系统的“先头部队”,其在机体抵御病原微生物的入侵中起着重要作用^[2]。中性粒细胞“身兼”着趋化、吞噬、杀菌等多种功能,在机体被病原体感染后,能在多种趋化因子的作用下,逐渐向感染部位迁移,并通过多种途径对病原体进行诱杀,因此其免疫调节作用不容忽视^[3]。目前普遍认为中性粒细胞的杀菌机制主要包括:活性氧杀菌途径、脱颗粒杀菌途径和胞外杀菌网络(Neutrophil Extracellular Traps, NETs)途径^[4]。若杀菌途径缺陷或被抑制,机体会发生反复感染;但若盲目加强杀菌作用,

其过度激活也会损伤机体,引起多种自身免疫性疾病等,因此本文就中性粒细胞杀菌机理的最新研究进展作以综述,以期为后续中性粒细胞过度激活后的作用途径以及靶点的研究提供理论基础。

1 活性氧杀菌途径

1.1 活性氧杀菌途径的组成 中性粒细胞的活性氧杀菌途径可大致分为两种:一种是由髓过氧化物酶(MPO), H_2O_2 和血浆或细胞内的 Cl^- , I^- (卤族化合物)组成;另一种是由于6磷酸葡萄糖氧化旁路(HMP)的代谢加快, O_2 在还原型辅酶II(NADPH)氧化酶作用下接受NADPH上的一个电子后,还原为超氧阴离子($\cdot O_2^-$),生成氢氧自由基($\cdot OH$)、过

基金项目:威海市医学微生物与免疫学重点实验室;威海市科技发展计划;H. pylori 分泌系统结合区分子结构和功能研究(2016GNS029)。

作者简介:时小淋(1994-),女,硕士研究生,技师,研究方向:感染性免疫,E-mail:616081896@qq.com。

通讯作者:程艳杰,女,硕士,教授,研究方向:传染性疾病的筛查,E-mail:2845662180@qq.com。

王明义(1973-),男,博士,教授,研究方向:感染性免疫,E-mail:wangmingyi1973@outlook.com,为共同通讯作者。

氧化氢(H_2O_2)和单线态氧($^1\text{O}_2$)^[6]。其中 $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 和 $^1\text{O}_2$ 又被称为活性氧(ROS)^[7]。

1.2 活性氧杀菌途径的作用机理 中性粒细胞的活性氧杀菌途径,总体来说指的是ROS的杀菌作用以及MPO与 H_2O_2 在卤族元素等因子的作用下形成醛后形成的高效杀菌作用^[5]。

被病原体激活后的中性粒细胞会发生“呼吸爆炸”,耗氧量增加至数倍甚至数十倍^[5,6],宿主细胞吞噬病原体时,中性粒细胞质膜部分内陷,将病原体吞入细胞后形成吞噬小体,由于局部质膜的构象改变,导致原本无活性的NAD(P)H氧化酶被激活,然后催化氧分子变为 $\cdot\text{O}_2$ ^[5,7]。 $\cdot\text{O}_2$ 又在脂质上形成过氧化物而破坏生物膜。 $\cdot\text{O}_2^-$ 除了能直接攻击细菌外,其在细胞内还能形成 $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 等物质^[7]。 $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ 都是作用强烈的氧化剂,不仅可以氧化蛋白中的某些氨基酸残基和碳水化合物,更能分解核酸,对致病菌也有极大的杀伤作用。而 H_2O_2 本身就有杀菌作用,还能与 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成 OH , $^1\text{O}_2$ 加强杀菌效果^[8]。此外,中性粒细胞中含有的大量MPO能与 H_2O_2 , 卤族元素共同发挥杀菌作用,被称为过-过-卤系统,其作用机制是使氨基酸氧化脱羧,产生氨、醛类,同时造成病原体表面的氧化和卤化,肽链被分裂,病原体的蛋白质结构破坏^[5]。

2 脱颗粒杀菌途径

2.1 脱颗粒杀菌途径的组成 中性粒细胞内存在很多与杀菌有关的颗粒,分别为嗜天青颗粒、特异性颗粒和三级颗粒。中性粒细胞特有的颗粒为嗜天青颗粒,不仅含有大量MPO,还有一系列具有杀菌作用的中性粒细胞丝氨酸蛋白酶(NSPs)-组织蛋白酶G(CG)、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、蛋白酶3(PR3)和其他杀菌物质^[3-5]。特异性颗粒则含有乳铁蛋白、溶酶体等。溶酶体中又有大量水解酶、溶酶蛋白等物质。三级颗粒的特点是含有明胶酶^[8-9]。

2.2 脱颗粒杀菌途径作用机理 中性粒细胞的脱颗粒杀菌途径主要指的是上述颗粒及其内容物在杀伤致病菌中的作用^[10]。已有文献表明,NE不仅可破坏外膜蛋白A直接杀灭大肠埃希菌,还能裂解福氏志贺氏菌的某些迁移蛋白,防止福氏志贺氏菌进入细胞内。与此类似,CG能裂解金黄色葡萄球菌的黏附因子A。PR3则能切割hCAP-18生成抗菌肽LL-37。而在体内,NE, CG和PR3共同发挥协同作用杀灭吞噬液泡内的肺炎链球菌^[11-12]。乳铁蛋白不仅能结合铁元素减少细菌对铁的吸收,影响细菌的生长,还可与细菌细胞壁的脂多糖结合,将细菌氧化使其裂解,还能够针对 H^+ -ATP酶并干扰胞膜上的质子传递,从而对微生物造成致命的威胁^[13-14]。此外,乳铁

蛋白还能够参与ROS的产生^[15]。溶酶体的抗菌谱虽窄,但是它能水解作为细菌细胞壁的组成成分的N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的肽链,以起到对某些革兰氏阳性菌的杀伤作用^[5]。

3 胞外杀菌网络途径

3.1 胞外杀菌网络途径的组成 中性粒细胞的NETs最初是由BRINKMANN等^[16]发现。核酸物质及颗粒蛋白构成了NETs, DNA是NETs的主体部分,构成了骨架以固定各种蛋白。嗜天青颗粒、特异性颗粒和三级颗粒,构成了颗粒蛋白^[17]。

3.2 胞外杀菌网络途径的作用机理 NETs是以“自杀式”的模式杀灭病原体来保护机体,中性粒细胞的染色质发生伸展、凝聚解体,核膜崩解后DNA及杀菌颗粒物质释放、黏附在解凝聚状态的染色质上,最终核膜破裂、中性粒细胞死亡,NETs被释放出来^[18]。

NETs的杀菌作用机制主要是通过以下两点发挥作用的:①DNA形成的特殊骨架结构能限制或延缓病原体在宿主体内的传播,起到了物理屏障作用;还能减少杀菌物质的弥散,发挥了类似“富集”的效应,增加了局部杀菌物质的浓度;②中性粒细胞含有的各级颗粒也释放出各种杀菌蛋白^[19]。值得一提的是,NETs的杀菌作用是在中性粒细胞的吞噬作用开始前就已启动,且在细胞死亡之后继续发挥作用^[20]。已有文献报道,NETs能够杀灭多种细菌、真菌,甚至是寄生虫^[21]。有趣的是,相关实验发现,ROS的存在是NETs生成的前提^[22]。

4 中性粒细胞杀菌途径的缺失或抑制

中性粒细胞活性氧杀菌途径在宿主抵抗致病菌侵袭的过程中发挥着重要作用,一旦此项杀菌功能缺失,将导致机体抵抗外界感染能力的锐减^[23]。如人类遗传病慢性肉芽肿(chronic granulomatous disease, CGD),其特点是由于NADPH氧化酶的某种成分缺失而导致ROS的产生缺乏,所以CGD患者的中性粒细胞的吞噬作用和脱颗粒功能虽正常,但不能以正常速度杀死宿主细胞所吞入的细菌等,病人常出现频繁而致命的感染^[24]。

中性粒细胞脱颗粒杀菌途径若缺失或被抑制,杀菌能力也将锐减。帕-勒氏综合征(Papillon-Lefèvre syndrome, PLS)是一种罕见的常染色体隐性遗传疾病,其患者在出生一年后就表现出对细菌感染的发生率增加,相关研究发现,PLS患者的NSPs严重降低,患者的体外杀菌能力减弱^[25]。慢性粒细胞白血病(CML)患者因其嗜天青颗粒和吞噬空泡不能发生融合,以至于无法产生 H_2O_2 , 杀菌能力大幅度下降;而骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)患者部分或完全缺失颗粒内含酶,这也是CML

和MDS患者易被病原体感染的原因之一^[5]。

多项实验证实,NETs骨架可被脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)降解,能避免病原体被NETs捕捉杀灭^[22,26]。BEITER等^[26]人发现含有DNase的肺炎链球菌较普通菌株更易从呼吸道扩散到肺和血液当中而引起肺炎,体外实验证明用DNase抑制剂抑制了DNase的活性后,病原体的致病性明显降低^[22]。

5 中性粒细胞杀菌途径的过度激活

中性粒细胞杀菌功能受损时,机体易受感染,但当中性粒细胞被过度激活时,也会损伤组织,引起多种疾病^[23]。对患有哮喘的大鼠肺组织进行切片、染色后观察,发现其支气管壁及血管壁周围MPO阳性的细胞明显增多,说明MPO参与了哮喘的发病^[27]。当机体内ROS含量增加后,氧化应激状态即加重,机体血管内皮发生损伤,诱导多种细胞因子的产生,这些因子在RA的发生及发展中起重要作用^[28]。此外,ROS升高后将导致DNA氧化、结构改变,这会诱导自身抗体产生,进而诱发SLE等疾病^[29]。

中性粒细胞产生的过多NSPs也会对机体组织造成损伤, $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶是人体内重要的内源性NSPs抑制剂,它能有效地抑制NE、CG的活性,其缺失与慢性阻塞性肺疾病的发生密切相关^[30]。DABEK等^[31]人发现CG与溃疡性结肠炎的发病相关,CG可以使肠上皮细胞顶侧的蛋白酶激活受体-4(PAR-4)得到激活进而导致上皮屏障被破坏,促进炎症反应的发生。

NETs虽然有着强大的杀菌功能,但当NETs生成的同时也会产生大量的自身抗原,若不及时去除也能对机体造成损伤^[2]。囊性纤维病患者痰液中含有大量的DNA和弹性蛋白,在对患者采取吸入DNase疗法后,患者的症状和肺功能得到了改善,提示NETs可能与疾病的发生发展有关^[32]。流感病毒引起肺炎时,刺激中性粒细胞产生的NETs,在破坏肺泡后引起肺泡毛细血管的弥漫性损伤,造成肺水肿,引起急性呼吸窘迫综合征样病理征象^[2]。

6 展望

中性粒细胞是人体抵抗外界感染的重要免疫细胞,可以吞噬杀灭入侵的致病病原体,通过“呼吸爆发”、脱颗粒、NETs等途径对病原体进行诱杀,因此其免疫调节作用不容忽视。若中性粒细胞杀菌途径缺陷或受抑制,将导致机体发生反复且严重的感染,甚至致死。但若盲目加强中性粒细胞的杀灭病原体作用,以至于中性粒细胞被过度激活后,也会损伤机体,造成各种自身免疫性疾病等,但是对于中性粒细胞过度激活后具体的作用途径以及作用靶点目前还尚未完全明确,因此对于明确此点对感染性疾病的

治疗具有极大的指导意义。因此临床对于中性粒细胞的杀伤作用应该合理利用,以达到对人体的最优利用。

参考文献:

- [1] 颜彬. IL-6联合G-CSF通过调控中性粒细胞的脱颗粒功能诱导其产生促瘤活性[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
YAN Bin. IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils by modulaintg their degranulation function[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [2] GLENNON-ALTY L, HACKETT A P, CHAPMAN E A, et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 125: 25-35.
- [3] EL-BENNA J, HURTADO-NEDELEC M, MARZAIOLI V, et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation[J]. Immunological Reviews, 2016, 273(1, SI): 180-193.
- [4] SAHA P, YEOH B S, OLVERA R A, et al. Bacterial siderophores hijack neutrophil functions[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2017, 198(11): 4293-4303.
- [5] 傅承彬, 周云庆, 吴咏楠. 中性多形核粒细胞的杀菌机理[J]. 蚌埠医学院学报, 1993, 18(4): 276-278.
FU Chengbin, ZHOU Yunqing, WU Yongnan, et al. Germicidal mechanism of neutrophils[J]. Journal of Bengbu Medical College, 1993, 18(4): 276-278.
- [6] WITKO-SARSAT V, RIEU P, DESCAMPS-LATSCHA B, et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects [J]. Laboratory Investigation, 2000, 80(5): 617-653.
- [7] HAMPTON M B, KETTLE A J, WINTERBOURN C C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing [J]. Blood, 1998, 92(9): 3007-3017.
- [8] 邢宇坤, 张伟. 中性粒细胞呼吸爆发的产生机制及其炎症效应[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(1): 1-6.
XING Yukun, ZHANG Wei. Mechanisms of neutrophil respiratory burst and its inflammatory effects [J]. Basic Medical Sciences and Clinics, 2004, 24(1): 1-6.
- [9] 刘晓晔. 微血管内皮细胞对嗜中性粒细胞杀菌功能的影响[D]. 北京: 北京农学院, 2014.
LIU Xiaoye. Effects of microvascular endothelial cells on neutrophil bacterial killing [D]. Beijing: Beijing Agricultural College, 2014.
- [10] STAPELS D A, GEISBRECHT B V, ROOIJAKERS S H. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. [J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 23: 42-48.

- [11] BURGNER S S, FRANCOIS LEBORGNE N G, SNIPAS S J, et al. Cathepsin G inhibition by serpinb1 and serpinb6 prevents programmed necrosis in neutrophils and monocytes and reduces GSDMD-Driven inflammation [J]. Cell Reports, 2019, 27 (12): 3646-3656, e5
- [12] TENG Tieshan, JI Ailing, JI Xinying, et al. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered [J]. Journal of Immunology Research, 2017, 2017(3): 9671604.
- [13] EMBLETON N D, BERRINGTON J E, MCGUIRE W, et al. Lactoferrin: antimicrobial activity and therapeutic potential [J]. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine, 2013, 18(3): 143-149.
- [14] MAYEUR S, SPAHIS S, POULIOT Y, et al. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2016, 24 (14): 813-836.
- [15] GRIGORIEVA D V, GORUDKO I V, SOKOLOV A V, et al. Myeloperoxidase stimulates neutrophil degranulation [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2016, 161(4): 495-500.
- [16] BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? [J]. The Journal of Cell Biology, 2012, 198(5): 773-783.
- [17] KHANDPUR R, CARMONA-RIVERA C, VIVEKANANDAN-GIRI A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. [J]. Sci Transl Med. 2013, 5(178): 178ra40.
- [18] PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease [J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(2): 134-147.
- [19] ALFLEN A, ARANDA LOPEZ P, HARTMANN A K, et al. Neutrophil extracellular traps impair fungal clearance in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis [J]. Immunobiology, 2019, pii: S0171-2985(19)30289-X.
- [20] SOLLBERGER G, TILLEY DO, ZYCHLINSKY A. Neutrophil Extracellular Traps: the biology of chromatin externalization [J]. Developmental Cell, 2018, 44(5): 542-553.
- [21] JENNE C N, KUBES P. Virus-induced NETs-critical component of host defense or pathogenic mediator? [J]. PLoS Pathogens, 2015, 11 (1): e1004546.
- [22] BUCHANAN J T, SIMPSON A J, AZIZ R K, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps [J]. Current Biology, 2006, 16(4): 396-400.
- [23] HOENDERDOS K, LODGE K M, HIRST R A, et al. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury [J]. Thorax, 2016, 71 (11): 1030-1038.
- [24] RAWAT A, BHATTAD S, SINGH S. Chronic granulomatous disease [J]. Indian Journal of Pediatrics, 2016, 83(4): 345-353.
- [25] PHAM C T, IVANOVICH J L, RAPTIS S Z, et al. Papillon-lefèvre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans [J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2004, 173(12): 7277-7281.
- [26] BEITER K, WARTHA F, ALBIGER B, et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps [J]. Current Biology, 2006, 16(4): 401-407.
- [27] 杨晓红, 徐庆雷, 马小波, 等. 老年哮喘患者支气管肺泡灌洗液中粒细胞巨噬细胞集落刺激因子水平变化及意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(6): 70-73.
- YANG Xiaohong, XU Qinglei, MA Xiaobo, et al. Level of granulocyte macrophage colony stimulating factor in bronchoalveolar lavage fluid from elderly patients with asthma bronchial and their significance [J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(6): 70-73.
- [28] CECCHI I, ARIAS DE LA ROSA I, MENEGATTI E A, et al. Neutrophils: novel key players in rheumatoid arthritis. current and future therapeutic targets [J]. Autoimmunity Reviews, 2018, 17(11, SI): 1138-1149.
- [29] GERGELY P, GROSSMAN C, NILAND B, et al. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis and Rheumatism, 2002, 46(1): 175-190.
- [30] MCCARTHY C, REEVES E P, MCELVANEY N G. The role of neutrophils in alpha-1 antitrypsin deficiency [J]. Annals of the American Thoracic Society, 2016, 13(Suppl 4): S297-S304.
- [31] DABEK M, FERRIER L, ANNAHAZI A, et al. Intracolonic infusion of fecal supernatants from ulcerative colitis patients triggers altered permeability and inflammation in mice: role of cathepsin G and protease-activated receptor-4 [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2011, 17(6): 1409-1414.
- [32] LEE W L, GRINSTEIN S. The tangled webs that neutrophils weave [J]. Science, 2004, 303(5663): 1477-1478.

收稿日期:2019-11-12

修回日期:2019-12-07