

肝素减轻中性粒细胞胞外诱捕网诱导的内皮细胞损伤

乔艳婷 蒋静 章志丹 马晓春

110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院重症医学科

通讯作者:章志丹,Email:13998318999@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.011

【摘要】 目的 明确中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)对内皮细胞的损伤作用,探讨肝素能否减轻 NETs 诱导的内皮细胞损伤,发挥对内皮细胞的保护作用。**方法** 提取健康志愿者外周血,利用 Percoll-Histopaque 密度梯度离心法提取中性粒细胞(PMN),应用佛波酯(PMA)刺激 PMN 产生 NETs,用免疫荧光染色联合荧光酶标仪对 NETs 进行定性及定量检测。用提取到的 NETs 诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),并分别加入重组 DNA 水解酶(rhDNase)拮抗及肝素干预,6 h 后应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定各组 HUVEC 活性。**结果** PMA 刺激 PMN 可以产生 NETs,免疫荧光染色显示在 PMN 周围可形成网状结构。荧光酶标仪检测显示,与对照组比较,经 PMA 刺激的 PMN 上清液中游离 DNA 含量($\mu\text{g/L}$)显著增加(2 h: 119.62 ± 14.83 比 24.27 ± 0.67 , 4 h: 146.67 ± 21.24 比 28.35 ± 2.98 , 均 $P < 0.05$)。应用 NETs 诱导 HUVEC,随着 NETs 含量的增加内皮细胞抑制率逐渐上升,加入 rhDNase 后,NETs 诱导的内皮细胞抑制率可被拮抗[10、20、30 $\mu\text{g/L}$ NETs 时内皮细胞抑制率分别为: $(8.65 \pm 0.51)\%$ 比 $(10.99 \pm 0.35)\%$, $(14.85 \pm 0.43)\%$ 比 $(16.85 \pm 0.49)\%$, $(26.06 \pm 3.51)\%$ 比 $(27.54 \pm 0.62)\%$, 均 $P < 0.05$]。在 NETs 诱导内皮细胞损伤后,加入 0.01、0.1、1 和 10 kU/L 肝素可明显降低细胞抑制率,且呈剂量依赖趋势,10 $\mu\text{g/L}$ NETs 时内皮细胞抑制率分别为 $(8.96 \pm 0.70)\%$ 、 $(5.32 \pm 1.36)\%$ 、 $(0.70 \pm 0.30)\%$ 、 $(0.75 \pm 0.20)\%$ 比 $(10.99 \pm 0.35)\%$, 20 $\mu\text{g/L}$ NETs 时内皮细胞抑制率分别为 $(15.57 \pm 0.62)\%$ 、 $(13.28 \pm 0.65)\%$ 、 $(6.91 \pm 0.15)\%$ 、 $(5.86 \pm 0.17)\%$ 比 $(16.85 \pm 0.49)\%$, 30 $\mu\text{g/L}$ NETs 时内皮细胞抑制率分别为 $(30.49 \pm 0.74)\%$ 、 $(29.41 \pm 1.41)\%$ 、 $(23.45 \pm 0.75)\%$ 、 $(21.72 \pm 1.52)\%$ 比 $(27.54 \pm 0.62)\%$, 且 1 kU/L 和 10 kU/L 的肝素对所有浓度 NETs 诱导内皮细胞抑制均有改善作用,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** NETs 能够诱导内皮细胞损伤,且 NETs 含量越高细胞损伤程度越重;肝素能够减轻 NETs 诱导的内皮细胞损伤,可能是肝素内皮细胞保护及改善脓毒症器官功能损伤作用的一种潜在机制。

【关键词】 中性粒细胞胞外诱捕网; 血管内皮细胞; 细胞损伤; 肝素

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2014021078)

Heparin reduces endothelial cell damage induced by neutrophil extracellular traps Qiao Yanting, Jiang Jing, Zhang Zhidan, Ma Xiaochun

Department of Critical Care Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: Zhang Zhidan, Email: 13998318999@163.com

【Abstract】 Objective Clarify the effect of neutrophil extracellular traps (NETs) on endothelial cell injury, and investigate whether the heparin can exert a protective effect on endothelial cells by reducing the endothelial cell injury induced by NETs. **Methods** Neutrophils (PMN) were obtained from healthy human peripheral blood by Percoll-Histopaque density gradient centrifugation, and was stimulated with phorbol ester (PMA) to induce NETs. The qualitative and quantitative analysis of NETs was detected by immunofluorescence staining combined with fluorescence detector. The NETs were used to induce human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. Recombinant DNA hydrolytic enzymes (rhDNase) and heparin intervention were added respectively. The activity of HUVEC was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method after 6 hours. **Results** PMA can stimulate PMN to produce NETs. Immunofluorescence staining showed the formation of reticular formation around the PMN. The concentration of cell-free DNA in the supernatant of PMN stimulated by PMA was significant increased compared with the control group through the detection of PicoGreen fluorescent labeling instrument (2 hours: 119.62 ± 14.83 vs. 24.27 ± 0.67 , 4 hours: 146.67 ± 21.24 vs. 28.35 ± 2.98 , both $P < 0.05$). Application of NETs to stimulate the HUVEC, cell damage was dose dependent and inhibition rate increased gradually. The endothelial cell inhibition induced by NETs can be antagonized after adding rhDNase [10 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(8.65 \pm 0.51)\%$ vs. $(10.99 \pm 0.35)\%$, 20 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(14.85 \pm 0.43)\%$ vs. $(16.85 \pm 0.49)\%$, 30 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(26.06 \pm 3.51)\%$ vs. $(27.54 \pm 0.62)\%$, all $P < 0.05$]. Heparin with different concentrations were added into the experimental group (0.01, 0.1, 1, 10 kU/L). We found that the endothelial cell inhibition rate decreased compared with control group [10 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(8.96 \pm 0.70)\%$, $(5.32 \pm 1.36)\%$, $(0.70 \pm 0.30)\%$, $(0.75 \pm 0.20)\%$ vs. $(10.99 \pm 0.35)\%$; 20 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(15.57 \pm 0.62)\%$, $(13.28 \pm 0.65)\%$, $(6.91 \pm 0.15)\%$, $(5.86 \pm 0.17)\%$ vs. $(16.85 \pm 0.49)\%$; 30 $\mu\text{g/L}$ NETs: $(30.49 \pm 0.74)\%$, $(29.41 \pm 1.41)\%$, $(23.45 \pm 0.75)\%$, $(21.72 \pm 1.52)\%$]

vs. $(27.54 \pm 0.62)\%$, all $P < 0.05$]. **Conclusions** NETs can induce endothelial cell injury, and the injury degree was increased with the concentration of NETs. Heparin can reduce endothelial cell injury induced by NETs, which may be a potential mechanism for the protective effect of heparin on sepsis.

[Key words] Neutrophil extracellular traps; Endothelial; Cell injury; Heparin

Fund program: Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014021078)

脓毒症是由病原体入侵机体引起全身免疫和炎症反应,继而出现威胁生命的器官功能障碍,是重症患者死亡的主要原因之一^[1]。中性粒细胞(PMN)是构成机体抵御细菌等病原微生物的第一道防线,以往认为 PMN 主要通过吞噬作用及脱颗粒作用杀灭病原菌。2004 年 Brinkmann 等^[2]首次报道了中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)。NETs 是由活化的 PMN 在感染部位释放非浓缩染色质作为网状支架,通过附着于纤维上的染色质和抗菌蛋白来杀灭病原菌^[2-5]。由于 NETs 的主要成分为游离 DNA^[6],正常情况下其可被体内 DNA 酶水解,避免了 NETs 对机体的损伤作用。当大量 NETs 释放入血时,血液中的 DNA 酶无法完全降解 NETs,而持续存在的 NETs 将会损害自身组织^[7-8]。血管内皮细胞与血液直接接触,在 NETs 的作用下,首当其冲受到损伤。已有研究证实,过量 NETs 造成的内皮细胞损伤是脓毒症发生发展过程中的重要环节,如能减轻 NETs 造成的内皮细胞损伤,将会对脓毒症的治疗有益。本研究拟通过佛波酯(PMA)刺激 PMN 提取 NETs 来诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),以明确 NETs 对内皮细胞的损伤作用;同时,通过给予不同剂量肝素进行干预,探讨肝素能否减轻 NETs 诱导的内皮细胞损伤,为肝素治疗脓毒症提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:人外周血 PMN 分离液 Histopaque-1119、Histopaque-1077、Percoll,以及 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、重组 DNA 水解酶(rhDNase)和 PMA 均购自美国 Sigma 公司;抗组蛋白 H3 瓜氨酸化(H3Cit)抗体、Alex Fluor® 488 标记山羊抗兔抗体购自英国 Abcam 公司;PicoGreen 双链 DNA 荧光定量测定试剂盒购自美国 Life Technology 公司;RPMI 1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素购自沈阳博瑞德生物科技有限公司。人外周血标本取自中国医科大学附属第一医院健康体检志愿者,无外伤和感染,各器官功能正常,乙型肝炎(乙肝)表面抗原阴性,签署知情同意书。HUVEC 购自上海拜利生物科技有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 HUVEC 培养:将 HUVEC 置于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养 24 h 后换液,待细胞铺满瓶底时加入 0.05% 胰酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化,将消化好的细胞按 1:2 接种传代培养。

1.2.2 NETs 的提取、定性及定量

1.2.2.1 Percoll-Histopaque 梯度离心法提取 PMN:将 6 mL Histopaque-1119 加入 15 mL 离心管中,上层加入 5 mL EDTA 抗凝血,离心 20 min 去上清;将粒细胞层移至新的离心管,并加入磷酸盐缓冲液(PBS)填充,离心 10 min 弃上清,加入 2 mL PBS 稀释细胞;依次加入 85%、80%、75%、70%、65% Percoll,上层加入 2 mL 粒细胞悬液,离心 20 min 提取粒细胞层至新的离心管,加入 PBS 填充,离心 10 min 弃上清,加入 RMIP 1640 培养液重悬细胞后计数。

1.2.2.2 体外诱导 PMN 形成 NETs:将 PMN 接种至 24 孔板,每孔 4×10^5 个,CO₂ 培养箱中培养 1 h,随后用 100 nmol/L PMA 处理细胞,对照组给予等体积 PBS;分别于 2 h、4 h 收集细胞上清液,用于检测游离 DNA。将多聚赖氨酸预先处理的无菌玻片置于 24 孔板中,按每孔 4×10^5 个接种 PMN,给予 PMA 刺激;分别于 2 h、4 h 弃去细胞上清液,每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 30 min,用于细胞免疫荧光染色。

1.2.2.3 NETs 免疫荧光染色:经细胞透膜、封闭、抗 H3Cit 一抗(稀释 1:100)4℃孵育过夜、PBS 清洗、二抗(稀释 1:200)37℃孵育 1 h、DAPI 避光染色 5~10 min、90% 甘油封片,激光共聚焦免疫荧光成像。

1.2.2.4 细胞上清游离 DNA 检测:按照 PicoGreen 双链 DNA 荧光定量测定试剂盒检测细胞上清中游离 DNA 含量。稀释标准品储液和样品,每孔 50 μL 加入到 96 孔板,每孔加入 100 μL 稀释的 PicoGreen,标准品终浓度依次为 1 000、100、80、40、20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 μg/L。室温避光 2~5 min,用荧光酶标仪检测信号强度,激发光波长 480 nm,发射光波长 520 nm。为防止荧光淬灭尽快上机。

1.2.3 NETs 及肝素诱导 HUVEC

1.2.3.1 实验分组:将 HUVEC 分为对照组、NETs 组、NETs+rhDNase 组、肝素组、NETs + 肝素组。分别给予 NETs 10、20、30 $\mu\text{g/L}$, 肝素 0.01、0.1、1、10 kU/L , rhDNase 20 $\mu\text{g/L}$, 处理 6 h 后观察细胞活性。

1.2.3.2 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞活性:取各组细胞上清液, 加入含 0.5% MTT 的培养液培养 4 h, 待结晶形成时终止培养, 加入溶解液溶解结晶物, 将溶解液加至 96 孔板中, 在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处测量各孔吸光度 (A) 值。

1.3 统计学分析:使用 SPSS 21.0 软件处理数据, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMA 刺激 PMN 生成 NETs 的定性定量分析

2.1.1 免疫荧光染色定性 NETs (图 1):用 PMA 刺激 PMN 后可见到 PMN 外网状结构 (主要由 DNA、组蛋白组成) 生成, 随时间延长网状结构逐渐增多 (从显微结构和成分上可鉴定为 NETs)。

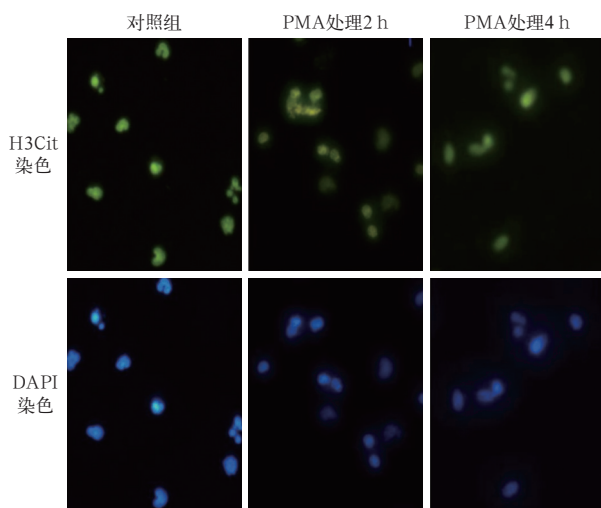
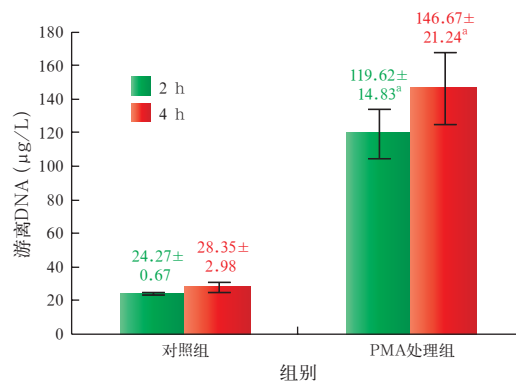


图 1 免疫荧光染色鉴定中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 组蛋白经 H3Cit 染色呈绿色, DNA 经 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色呈蓝色; 对照组细胞周围无网状结构, 经 100 nmol/L 佛波酯 (PMA) 刺激中性粒细胞 (PMN) 2 h、4 h 后, PMN 形成外纤维网状结构 免疫荧光染色 高倍放大

2.1.2 游离 DNA 定量检测 NETs (图 2):用荧光分光光度法测定标准品和细胞上清中游离 DNA 含量, 标准曲线呈良好的直线关系 ($R^2 = 0.997$), 说明该方法可准确反映样本游离 DNA 含量。与对照组比较, PMA 刺激 PMN 后上清中游离 DNA 含量明显增加 (2 h 或 4 h 均 $P < 0.01$), 定量结果与定性结果一致, 表明 PMN 经 PMA 刺激可形成 NETs。

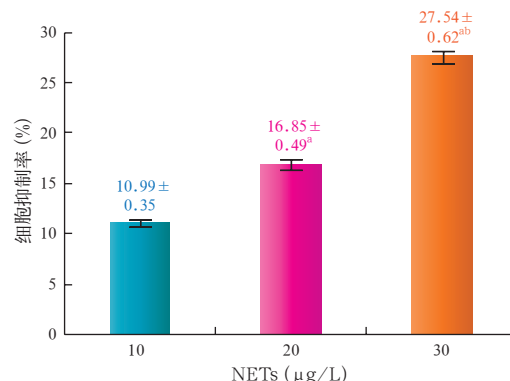


注: PMA 为佛波酯; 与对照组比较, $^aP < 0.01$

图 2 PMA 刺激中性粒细胞后不同时间点上清中游离 DNA 变化

2.2 NETs 诱导 HUVEC 及肝素的保护作用评估

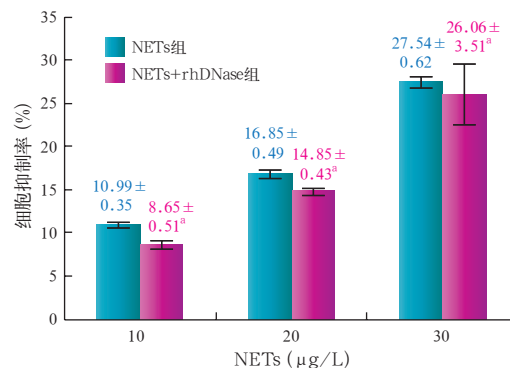
2.2.1 NETs 对 HUVEC 的损伤作用 (图 3):随 NETs 含量增加, 内皮细胞抑制率呈上升趋势 ($P < 0.01$), 提示 NETs 可诱导内皮细胞损伤, 且呈剂量依赖性。



注: NETs 为中性粒细胞胞外诱捕网; 与 10 $\mu\text{g/L}$ NETs 比较, $^aP < 0.01$; 与 20 $\mu\text{g/L}$ NETs 比较, $^bP < 0.01$

图 3 不同含量 NETs 对内皮细胞抑制率的影响

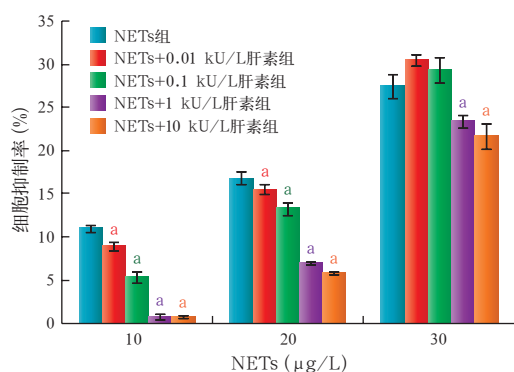
2.2.2 rhDNase 对 NETs 诱导 HUVEC 损伤的拮抗作用 (图 4):在 10、20、30 $\mu\text{g/L}$ NETs 刺激 HUVEC 时加用 20 $\mu\text{g/L}$ rhDNase, 内皮细胞抑制率均较同水平 NETs 组明显下降 (均 $P < 0.05$), 提示 rhDNase 可以拮抗 NETs 诱导的内皮细胞损伤。



注: rhDNase 为重组 DNA 水解酶, NETs 为中性粒细胞胞外诱捕网; 与 NETs 组比较, $^aP < 0.05$

图 4 rhDNase 对 NETs 诱导内皮细胞抑制率的影响

2.2.3 肝素对 NETs 诱导 HUVEC 损伤的保护作用(图 5; 表 4): 10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ NETs 时,不同剂量肝素均能显著降低 NETs 诱导的内皮细胞抑制率(均 $P<0.05$),且呈剂量依赖趋势。30 $\mu\text{g/L}$ NETs 时,0.01 kU/L 和 0.1 kU/L 的肝素不足以拮抗 NETs 对内皮细胞的损伤作用(均 $P>0.05$),而当肝素增加至 1 kU/L 和 10 kU/L 时,对 NETs 诱导内皮细胞抑制有明显的改善作用(均 $P<0.05$)。



注: NETs 为中性粒细胞胞外诱捕网; 与 NETs 组比较, ^a $P<0.05$

图 5 不同剂量肝素对不同含量 NETs 诱导内皮细胞抑制率的影响

3 讨论

PMN 作为机体固有免疫防御系统的重要组成部分,在病原体侵入机体时发挥杀菌作用^[9]。脓毒症发生过程中,体内 PMN 首先发生细胞核膜溶解,核内容物释放到细胞质中,随后细胞膜裂解,镶嵌有多种蛋白的染色质被释放到细胞外,形成 NETs^[2]。PMN 可受细菌、病毒及某些化学物质如细菌脂多糖(LPS)、PMA 等多种因素刺激形成 NETs^[10]。本实验中以 PMA 刺激 PMN,于 2 h、4 h 用免疫荧光染色可成功检测到大量 NETs 产生;定量检测显示,PMA 刺激 PMN 30 min 内即能产生 NETs,并于 3~4 h 达峰值。本实验中选择 2 h、4 h 作为检测时间点,能保证 NETs 的生成量,同时也是常用的检测时间点^[10];用免疫荧光定性和荧光酶标仪定量相联合的方法评价 NETs 的产生,保证了实验的可行性和结果的准确性;用免疫荧光标记法对 NETs 不同成分分别染色,准确定位了 NETs 结构^[11-12]。NETs 的主要成分为游离 DNA,本研究用 PicoGreen 荧光分光光度法检测游离 DNA 以反映 NETs 的含量,具有较好的精确性和可靠性。

脓毒症或炎症时,自身组织及血管内皮易受到损伤^[13],大量 NETs 释放入血,无法降解的 NETs 持

表 4 不同剂量肝素对 NETs 诱导内皮细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同含量 NETs 诱导的细胞抑制率(%)			
		0 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	30 $\mu\text{g/L}$
NETs 组	3		10.99 $\pm$ 0.35	16.85 $\pm$ 0.49	27.54 $\pm$ 0.62
NETs+0.01 kU/L 肝素组	3	-2.01 $\pm$ 0.15	8.96 $\pm$ 0.70 ^a	15.57 $\pm$ 0.62 ^a	30.49 $\pm$ 0.74
NETs+0.1 kU/L 肝素组	3	-0.73 $\pm$ 0.06	5.32 $\pm$ 1.36 ^a	13.28 $\pm$ 0.65 ^a	29.41 $\pm$ 1.41
NETs+1 kU/L 肝素组	3	-1.26 $\pm$ 0.47	0.70 $\pm$ 0.30 ^a	6.91 $\pm$ 0.15 ^a	23.45 $\pm$ 0.75 ^a
NETs+10 kU/L 肝素组	3	-1.17 $\pm$ 0.61	0.75 $\pm$ 0.20 ^a	5.86 $\pm$ 0.17 ^a	21.72 $\pm$ 1.52 ^a

注: NETs 为中性粒细胞胞外诱捕网; 与 NETs 组比较, ^a $P<0.05$; 空白代表无此项

续存在将会侵害自身组织。血管内皮细胞最易受到 NETs 的损伤。如果能够减轻 NETs 诱导的内皮细胞损伤,将会对脓毒症的治疗有益。本实验将刺激 PMN 产生的 NETs 作用于 HUVEC,通过 MTT 法检测内皮细胞活性,发现 NETs 能够显著降低内皮细胞活性,使得内皮细胞发生损伤,并且这一损伤作用可以被 rhDNase 所拮抗,进一步验证了内皮细胞活性降低是由于 NETs 的损伤作用所致,由此可见,NETs 是脓毒症发生发展过程中的重要环节,为深入研究脓毒症的发病机制提供了新的方向和思路。而在 NETs 诱导的内皮细胞中加入不同剂量肝素,结果发现肝素可拮抗 NETs 所诱导的内皮细胞抑制,并且这一拮抗作用呈剂量依赖趋势,在 30 $\mu\text{g/L}$ NETs 诱导的内皮细胞损伤时,只有高剂量的肝素才具有拮抗和保护作用,验证了肝素能够减轻 NETs 所诱导的内皮细胞损伤,为探索肝素发挥内皮细胞保护作用的机制提供了新的方向。

肝素的这种拮抗机制可能与以下两方面有关:首先,肝素作为一种带负电荷的高硫酸化多糖结构,可以绑定带正电荷的 P- 选择素,阻碍 NETs 结构中带正电荷的组蛋白与血小板之间的相互作用,从而削弱血小板介导的促凝反应,发挥其抗凝作用^[14-16]及内皮细胞保护作用。其次,肝素在体内表现出类似 rhDNase 的作用^[17-18],可以使 NETs 发生解聚,从而降低其对机体的损害作用。研究已经证实,肝素可以通过其具有的抗炎及抗凝等作用对脓毒症发挥治疗作用^[19]。本研究结果表明,肝素可以通过 NETs 途径减轻内皮细胞损伤,这可能是肝素治疗脓毒症的另一条新途径,为全面评估肝素治疗脓毒症的作用机制提供了新的理论依据。

综上,本研究进一步验证了 NETs 对内皮细胞的损伤作用,提示 NETs 可能参与脓毒症的发病机制,并证明了肝素能够减轻 NETs 诱导的内皮细胞损伤,从而发挥对内皮细胞的保护作用,为肝素治疗脓毒症的机制提供了一个新的思路。

参考文献

- [1] 贺能英, 严启滔, 郭振辉. 脓毒症的免疫反应与炎症[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 435-438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
He NY, Yan QT, Guo ZH. The immune response and inflammation in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (6): 435-438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
- [2] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science, 2004, 303 (5663): 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
- [3] Lee WL, Grinstein S. Immunology. The tangled webs that neutrophils weave [J]. Science, 2004, 303 (5663): 1477-1478. DOI: 10.1126/science.1095484.
- [4] Segal AW. How neutrophils kill microbes [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 197-223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- [5] Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? [J]. Blood, 2012, 119 (5): 1214-1216. DOI: 10.1182/blood-2011-07-364604.
- [6] 宋明明, 王旭, 孙炳伟. 脓毒症时中性粒细胞胞外诱捕网的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (2): 152-154. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.016.
Song MM, Wang X, Sun BW. Advance in research of extracellular trapping net neutrophil in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (2): 152-154. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.016.
- [7] Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity [J]. J Immunol, 2012, 189 (6): 2689-2695. DOI: 10.4049/jimmunol.1201719.
- [8] Simon D, Simon HU, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases [J]. Allergy, 2013, 68 (4): 409-416. DOI: 10.1111/all.12111.
- [9] 孙振朕, 朱科明, 邓小明. 血小板和中性粒细胞在脓毒症中作用机制的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (8): 502-504. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.08.019.
Sun ZZ, Zhu KM, Deng XM. Advances in the study of role of platelets and neutrophils in pathogenesis of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2011, 23 (8): 502-504. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.08.019.
- [10] 朱鏊, 张玥, 李国力, 等. 建立体外诱导和检测中性粒细胞胞外诱捕网的方法[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9 (3): 405-408. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.028.
Zhu LL, Zhang Y, Li GL, et al. Establishment of the methods of inducing and detecting neutrophil extracellular trap in vitro [J]. Chin J Exp Clin Infect Dis (Electron Ed), 2015, 9 (3): 405-408. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.028.
- [11] Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps [J]. J Exp Med, 2010, 207 (9): 1853-1862. DOI: 10.1084/jem.20100239.
- [12] Brinkmann V, Laube B, Abu AU, et al. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them [J]. J Vis Exp, 2010, 36 (6): DOI: 10.3791/1724.
- [13] 杨霞, 李香琴, 马晓媛, 等. 脓毒症血管内皮损伤及调节策略的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (1): 108-110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.
Yang X, Li XQ, Liang HP. Research progress of vascular endothelial cell injury and its regulation in sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (1): 108-110. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.028.
- [14] Skinner MP, Fournier DJ, Andrews RK, et al. Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 164 (3): 1373-1379.
- [15] Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction [J]. Blood Rev, 2012, 26 (6): 255-259. DOI: 10.1016/j.blre.2012.09.001.
- [16] 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. DOI: 10.1073/pnas.1005743107.
- [17] 周剑涛, 丁海峰, 梅雨珍. DNase 对中性粒细胞形成胞外诱捕网的调节作用[J]. 生命的化学, 2013, 33 (2): 71-74.
Zhou JT, Ding HF, Mei YZ. The regulatory effects of DNase on NET formation in neutrophils [J]. Chem Life, 2013, 33 (2): 71-74.
- [18] Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons [J]. Trends Immunol, 2009, 30 (11): 513-521. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.011.
- [19] 刘志永, 朱红, 马晓春. 肝素治疗脓毒症的系统评价[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (3): 135-141. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.003.
Liu ZY, Zhu H, Ma XC. Heparin for treatment of sepsis: a systemic review [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (3): 135-141. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.003.

(收稿日期: 2016-12-21)

• 科研新闻速递 •

正五聚蛋白 3 对接受早期目标导向治疗液体复苏成功的严重脓毒症患者死亡的预测价值

正五聚蛋白 3 (PTX3) 被认为是严重脓毒症患者死亡的预测指标。目前采用生物标志物(包括 PTX3)预测早期目标导向治疗(EGDT)初步复苏成功的严重脓毒症患者死亡的相关数据有限,因此有学者进行了一项前瞻性队列研究。该研究纳入了 83 例完成 EGDT 所有复苏步骤并复苏达标的严重脓毒症患者,采用夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定患者入院时、入院 3 d 和 7 d 的血清 PTX3 水平,并测定了降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)、中性粒细胞指数等指标。主要研究终点为 28 d 全因死亡率。结果显示,83 例严重脓毒症患者急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分为 16(13, 19)分; 28 d 全因死亡率为 19.3%(16 例)。死亡者入院时血清 PTX3 水平显著高于存活者[$\mu\text{g/L}$: 201.4(56.9, 268.6)比 36.5(13.7, 145.3), $P=0.008$]。在入院时 PTX3、PCT、CRP、中性粒细胞指数、APACHE II 评分、序贯器官衰竭评分(SOFA)等指标中,血清 PTX3 水平对死亡的预测价值最大[受试者工作特征曲线下面积(AUC)=0.819, 95% 可信区间(95%CI)=0.677~0.961, $P=0.008$]。入院时 PTX3 最佳截断值为 140.28 $\mu\text{g/L}$ (敏感度为 66.7%, 特异度为 73.8%)。入院时的 PTX3 与 PCT 具有较强的相关性($r=0.675$, $P<0.001$)。然而, Cox 比例风险模型分析显示,仅入院时的 PTX3 是严重脓毒症死亡的独立预测指标[PTX3 ≥ 140 $\mu\text{g/L}$ 时,风险比(HR)=7.16, 95%CI=2.46~15.85, $P=0.001$]。研究者据此得出结论,入院时血清 PTX3 水平可能是接受 EDGT 并液体复苏成功的严重脓毒症患者 28 d 全因死亡的一个强大的预测因子。

喻文, 罗红敏, 编译自《Yonsei Med J》, 2017, 58 (2): 370-379