

· 综述 ·

中性粒细胞胞外捕网在痛风性关节炎中的作用机制

王魏 邵加庆

【摘要】 急性痛风性关节炎是痛风最常见的首发症状,早期常可于短时间内自行缓解,随着病程进展,发作频率逐渐增加,持续时间逐渐延长,直至无法自行缓解,并伴发痛风石的形成,其具体机制尚未阐明。近年有研究发现,中性粒细胞胞外捕网可以激活免疫系统,同时聚集中性粒细胞胞外捕网可能通过降低细胞因子和趋化因子水平,缓解痛风急性期炎症反应,并且可与尿酸盐结晶紧密结合,参与痛风石的形成。

【关键词】 中性粒细胞胞外捕网;痛风性关节炎;炎症

基金项目:国家自然科学基金(81471018)

Role of neutrophil extracellular traps in acute gouty arthritis Wang Wei, Shao Jiaqing. Department of Endocrinology, Clinical Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Shao Jiaqing, Email: shaojiaq@hotmail.com

【Abstract】 Acute gouty arthritis is the first symptom of gout, which resolves spontaneously within a few days. With the development of gout, arthritis occurs more frequently and harder to resolve, meanwhile the urate crystals deposit into tophi, however the reason is still not clear. Recently evidences suggest that neutrophil extracellular traps can activate the body immune system, and aggregated neutrophil extracellular traps can promote the resolution of neutrophilic inflammation by degrading cytokines and chemokines. What's more, aggregated neutrophil extracellular traps also contribute to the formation of tophi by combining with the monosodiumurate crystals.

【Key words】 Neutrophil extracellular trap; Gout; Inflammation

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81471018)

根据 2016 年痛风诊疗最新指南,目前我国痛风的患病率为 1% ~ 3%, 并呈逐年上升趋势,急性痛风性关节炎是痛风的主要临床表现,有自限性,而未经治疗的患者痛风发作频率通常随时间推移而增加,且可进展为多关节炎,症状更严重,持续时间更长,缓解更慢,直至进入没有无痛发作间歇期的慢性痛风石性关节炎期。痛风性关节炎的机制十分复杂,由尿酸盐单钠结晶(MSU)触发机体固有免疫反应,导致关节及其周围组织的急性炎症反应,但其具体的发病机制及自我缓解机制目前仍有争论。随着分子生物学及免疫学的进展,人们发现中性粒细胞胞外捕网(NETs)对于痛风性关节炎的发生、发展直

至自然缓解具有重要意义,现综述如下。

1 NETs 概述

2004 年 Science 首次报道了中性粒细胞除吞噬作用之外的第二种“自杀式”杀菌机制,中性粒细胞活化后释放颗粒蛋白与染色质,形成局部高浓度的细胞外纤维结构,致使抗菌作用最大化,清除局部致病因子杀灭细菌,同时限制病菌播散,此过程即是中性粒细胞胞外捕网过程(NETosis)^[1]。目前发现的 NETosis 有 3 种形式:自杀性 NETosis、活性 NETosis 以及线粒体 NETosis^[2]。

自杀性 NETosis 中,中性粒细胞在多种诱因(如细菌、内毒素、草酸钙结晶、MSU 等)刺激下活化,释放的中性粒细胞趋化因子与细胞膜受体结合,引起内质网释放 Ca^{2+} , 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高激活了蛋白激酶 C 和糖蛋白 gp91 磷酸化,诱导 NADPH 氧化酶(NOX)形成功能性复合体,进而产生活性氧簇^[1,3]。

下游受体相互作用蛋白 3 激酶和人混合系列蛋白激酶样结构域(RIPK3-MLKL)介导的信号通路随之激活,介导活化弹性蛋白酶移位至核内,激活髓过氧化物酶依赖的活化弹性蛋白酶水解活性。活化弹性蛋白酶先于胞质中降解 F 肌动蛋白,随之与髓过氧化物酶等一起作用于组蛋白,使染色质解聚,同时在精氨酸脱亚氨酶 4 作用下,催化精氨酸残基瓜氨酸化,致使组蛋白去正电荷化,DNA 与组蛋白解离,释放解聚后的 DNA 丝状结构以及高度水解活性的酶类颗粒,进而细胞膜破裂,中性粒细胞死亡,DNA、组蛋白、蛋白酶类和抗菌肽形成的胶水状网状结构被迅速释放至胞外,包裹并杀灭入侵的病原体,该网状结构被称为 NETs^[4-6]。活性 NETosis 较自杀性 NETosis 更快产生,其过程则仅仅依赖于弹性蛋白酶的活化,而不需要活性氧簇的参与。在同样的核膜破裂、染色质解聚后,NETs 以囊泡的方式释放,保留了细胞膜的完整性,中性粒细胞成为类似血小板或红细胞的有活性的无核细胞,继续捕杀细菌等病原体。除此之外,在术后或慢性肉芽肿患者体内,中性粒细胞亦可完全依赖于线粒体活性氧簇,产生直接释放线粒体 DNA 的 NETosis^[7]。

许多研究显示,NETosis 在免疫应答以及内环境稳态中起着举足轻重的作用,NETs 可以通过离子流精确地释放颗粒酶,同时释放多种免疫调节细胞因子与趋化因子,从而参与到免疫系统中,其是人体抵抗病原体的一线防御者,在某种程度上也是自身免疫、自身炎症反应以及代谢性疾病的促成者。NETs 可以活化 DNA 受体如 Toll 样受体-8,触发机体免疫系统警报,大量免疫细胞募集而来,激活人体免疫应答^[8]。而 NETs 在体内的清除主要是通过血清脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 的降解作用以及中性粒细胞凋亡后被巨噬细胞吞噬。然而在此过程中其虽能够杀死病原体但不能区分“敌友”,而同时一些 NETs 成分,如组蛋白等会导致细胞损伤,加重炎症反应^[9-10]。因此,NETs 的产生过多和清除不足会导致许多急性炎症反应以及自身免疫性疾病的发生^[11]。NETs 亦可于血管中形成深静脉血栓的支架和诱发物,此外,NETs 还可在脉管炎、系统性红斑狼疮等疾病中成为自身抗原。同其他自身免疫性疾病一样,近几年发现 NETs 在痛风的发作与炎症反应转归中起重要作用。

2 NETs 与痛风

痛风是一种 MSU 沉积在关节引起的嗜中性粒细胞炎症反应,MSU 的形成是痛风发生、发展的重要进程。由于嘌呤类物质代谢紊乱,尿酸摄入及产生增加,肾脏排泄减少等原因,导致人体内尿酸水平升高^[12]。当体内尿酸浓度超过溶解度,呈过饱和状态时,针状 MSU 形成,并沉积在滑膜、软骨及关节周围,同时引发炎症反应,其中多形性中性粒细胞与巨噬细胞是痛风炎症反应的两大关键因素。

2.1 NETs 与急性痛风性关节炎的发作与缓解

2.1.1 急性痛风性关节炎中 NETs 的激活 MSU 于滑膜液中首先与单核巨噬细胞、A 型滑膜细胞、B 型滑膜成纤维细胞等细胞亲密接触。这些负电荷的针状 MSU 结构可以通过静电作用或者氢键与类脂膜及细胞表面的信号蛋白(如 CD14、CD16)紧密结合,同时也可直接被中性粒细胞及单核细胞吞噬^[13]。被摄入的 MSU 破坏溶酶体酸性腔并释放组织蛋白酶 B,酸化的吞噬溶酶体释放大量的钠离子,导致细胞内钠浓度升高,形成细胞内高渗状态,水由胞外流向胞内,引起细胞膨胀,细胞内钾浓度相应降低,引起细胞内钾离子的内流,激发不依赖 NOX 的活性氧簇产生,同时在钙离子的共同作用下,巨噬细胞形成活化核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 炎症体,激活 caspase-1 以及中性粒细胞弹性蛋白酶切割白细胞介素(IL)-18 前体与 IL-1 β 前体,形成活性的促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18。在 MSU 与大量促炎因子的共同作用下,NETosis 被激活^[14]。

2.1.2 NETs 与急性痛风性关节炎的发作 随着 MSU 诱导的 NETosis 激活,核质解聚,细胞膜破裂,NETs 同大量 IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 IL-6 释放,机体免疫系统报警。伴随着细胞损伤,大量 ATP 与尿酸被释放入滑膜腔,局部尿酸浓度升高,更多晶体析出,加剧局部炎症反应^[15]。同时活化的 IL-1 β 继续促进 NOX 产生活性氧簇,并趋化多形性中性粒细胞进一步释放大量的 NETs、炎症介质、中性粒细胞引诱剂 CXC 趋化因子配体-8(CXCL-8)以及中性粒细胞激活剂(如 CCL3、CSCL10 等)^[16]。促炎因子被大量释放入血液,IL-1 引起血管舒张,CXCR2、CXCL-8、CXCL-1、CXCL-2、CXCL-3 等迅速募集免疫细胞,血液中的中性粒细胞通过选择素类附着于血管内皮细胞,进入滑液微血管,在趋化因子浓度差诱

导下移行至关节腔内,中性粒细胞大量聚集,进一步释放更多促炎因子,再次加剧局部炎性反应。随着局部炎性反应的愈演愈烈,细胞因子被迅速大量释放并进入循环,从而导致发热、白细胞增多等全身反应^[13, 16-18]。这种机体对 MSU 沉积的急性反应在临床上就表现为痛风急性发作。其中,IL-1 β 不仅促进 NETosis 形成,亦可加速中性粒细胞募集,现在针对 IL-1 β 的药物,如阿那白滞素 (Anakinra)、利那西普 (Rilonacept)、卡那奴单抗克隆抗体 (Canakinumab) 临床上已被用于急性痛风发作的缓解治疗,基于 IL-1 β 抑制剂的治疗已成为痛风尤其是难治性慢性痛风治疗的新方向^[19]。

2.1.3 NETs 与急性痛风性关节炎的缓解 与其他炎性疾病相异的是,即使发病部位依旧可以检测到 MSU 的存在,痛风急性发作的症状会在几日后消失,并在相当长时间内不再发作。虽然痛风急性发作的自行缓解机制尚未清晰,但很多研究证明,一些抗炎介质如转化生长因子 β 、黑皮质素、IL-10 及巨噬细胞促炎/抗炎的转化在此过程中起着重要作用^[20]。除了这些常见的炎性反应过程外,最近有研究证实,NETosis 在急性痛风性关节炎的缓解中有举足轻重的作用。

在痛风急性发作的后期,随着越来越多的中性粒细胞被招募至 MSU 沉积处,同时促炎因子如 TNF- α 、IL-8 和 IL-1 β 等继续刺激中性粒细胞释放 NETs 水平增加,高密度的 NETs 开始发生聚合,形成聚集中性粒细胞胞外捕网 (aggNETs)。aggNETs 与 MSU 紧密结合,同时丝氨酸蛋白酶浓度增加,与促炎因子产生拮抗作用^[13-14]。因此有研究提出 aggNETs 的出现可以作为痛风急性发作的转折点。NETs 可以迅速“捕获”并裂解促炎因子,因此小剂量的 aggNETs 即可在短时间内吸收大量炎性因子和趋化因子,如 TNF- α 、IL-1、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等,并通过丝氨酸蛋白酶使之降解失活,中断炎性反应的恶性循环,从而致使痛风“沉默”,MSU 晶体在 aggNETs 的包裹下形成痛风石,沉积在滑膜、软骨及关节周围^[21]。

2.2 NETs 与慢性痛风石性关节炎 痛风石是慢性期痛风的特征性表现,是体内 MSU 无法消除时由脂质、蛋白、黏多糖等包裹 MSU 形成的慢性肉芽肿组织,是 MSU 沉积的结果。NETs 参与了痛风石形成,

且在限制痛风石炎性反应中发挥了重要作用,其于痛风中的主要抗炎作用在于对 MSU 的固定作用,这可能是部分痛风石患者长期无急性炎性反应发作的原因。

痛风石中 MSU 被许多蛋白包绕,IgG 通过电荷作用及氢键与之紧密结合,并通过 Fc γ R 促进吞噬作用;其中的补体成分可以直接或通过 Fc γ R 促进炎性反应的发生;除此之外,许多抗炎蛋白也存在于其中,如溶酶体酶、抗炎因子 TGF- β 、载脂蛋白 E 等。痛风石虽可以在体内潜伏数月至数年而无临床症状,但有时也会发作^[22-23]。在体内大于 20 μ m 的晶体无法诱发炎性反应,因此在降尿酸治疗中尿酸水平的快速降低会导致痛风石边缘释放微晶体,使得“脱壳”的 MSU 晶体暴露,加剧炎性反应的发生,从而诱发痛风的急性发作。

被释放的 NETs 与尿酸盐结晶紧密结合,形成抗 DNase I 的痛风石样结构,沉积于各个关节腔,痛风“沉默”的机制之一是体内的 NETs 能及时被 DNase I 降解,长期痛风的患者 NETs 清除能力不足,MSU 反复沉积可持续诱导 NETosis 形成,炎性反应慢性化,痛风石形成。痛风石外围的破骨细胞活动可引发肌肉骨骼功能不全,同时 MSU 与骨质直接接触,异化关节间质细胞如软骨细胞及成骨细胞,引起关节的凿样损伤。在慢性痛风石性关节炎体内, DNase I 活性降低或缺陷,无法及时降解 NETosis 中形成的染色体 DNA 网状物,使瓜氨酸化自身抗原暴露,机体对自身抗原丧失免疫耐受导致特异性自身抗体形成和炎性反应,炎性反应又促进了 NETosis 的产生,造成一个恶性循环^[13, 24]。同时有研究证明,慢性肉芽肿性疾病的患者缺乏 NOX 的功能,从其体内提取的中性粒细胞无法形成 NETs,常常面临反复、多重感染的局面。因此,长远来看痛风石并不能减轻患者的高尿酸水平,仅可以暂时使急性痛风沉默,处于暂时“休战状态”,但它可以增加体内尿酸盐存储的阈值,减少痛风发作的频率。

3 总结

NETosis 是一把双刃剑,其既于痛风急性发作中推波助澜,加重炎性反应与组织损伤,又可形成 aggNETs 包裹 MSU,形成痛风石,暂时缓解痛风急性发作。目前针对 NETosis 相关的靶向治疗仍然相当匮乏,但随着对 NETosis 在痛风性关节炎中作用的进

一步了解,NETosis未来可能成为痛风性关节炎急性发作预防 and 治疗的新的切入点,从而开辟痛风治疗的新领域。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Schorn C, Janko C, Krenn V, et al. Bonding the foe-NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 376. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00376.
- [3] Kim SJ, Jenne CN. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury[J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(6): 546-554. DOI: 10.1016/j.smim.2016.10.013.
- [4] Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, et al. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 581-588. DOI: 10.1038/cdd.2011.1.
- [5] Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, et al. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is "NETosis" = necroptosis? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11-12): 2211-2219. DOI: 10.1007/s00018-016-2195-0.
- [6] Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? [J]. *Blood*, 2013, 122(16): 2784-2794. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- [7] Berthelot JM, Le Goff B, Neel A, et al. NETosis: at the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis[J]. *Joint Bone Spine*, 2017, 84(3): 255-262. DOI: 10.1016/j.jbspin.2016.05.013.
- [8] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? [J]. *J Cell Biol*, 2012, 198(5): 773-783. DOI: 10.1083/jcb.201203170.
- [9] 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.
- [10] Hahn J, Knopf J, Maueröder C, et al. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(4 Suppl 98): 6-8.
- [11] Yang H, Biermann MH, Brauner JM, et al. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 302. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00302.
- [12] Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2039-2052. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00346-9.
- [13] Maueröder C, Kienhöfer D, Hahn J, et al. How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(7): 727-734. DOI: 10.1007/s00109-015-1295-x.
- [14] Schett G, Schauer C, Hoffmann M, et al. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout[J]. *RMD Open*, 2015, 1(Suppl 1): e000046. DOI: 10.1136/rmdopen-2015-000046.
- [15] Schorn C, Janko C, Latzko M, et al. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 277. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00277.
- [16] Sil P, Wicklum H, Surell C, et al. Macrophage-derived IL-1 β enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(3): 227-237. DOI: 10.1007/s00011-016-1008-0.
- [17] Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 352. DOI: 10.3389/fphys.2014.00352.
- [18] Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29318. DOI: 10.1371/journal.pone.0029318.
- [19] Mitroulis I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(4): 501-512. DOI: 10.1007/s00281-013-0361-0.
- [20] Steiger S, Harper JL. Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16(1): 392. DOI: 10.1007/s11926-013-0392-5.
- [21] Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines[J]. *Nat Med*, 2014, 20(5): 511-517. DOI: 10.1038/nm.3547.
- [22] Pisetsky DS. Gout, tophi and the wonders of NETs[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(5): 431.
- [23] Chhana A, Dalbeth N. The gouty tophus: a review[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2015, 17(3): 19. DOI: 10.1007/s11926-014-0492-x.
- [24] Riches PL, Wright AF, Ralston SH. Recent insights into the pathogenesis of hyperuricaemia and gout[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(R2): R177-R184. DOI: 10.1093/hmg/ddp369.

(收稿日期: 2017-04-13)