

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.032

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.032>

## 病毒性心肌炎与 NETs 的相关性

王丹, 梁雨亭, 塔娜 综述 赵德超 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)威胁着人类健康, 其慢性过程可发展为扩张型心肌病, 影响患者生存及预后。先天免疫应答在VMC侵入阶段发挥重要作用, 病毒诱导的中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)既可以调控病毒, 又可以破坏宿主, 造成病理损伤, 影响VMC的预后。本文全面概述了目前研究热点, 即NETs是否与心肌炎存在潜在联系, 旨在提供可能有助于改善VMC治疗的新手段。

**[关键词]** 中性粒细胞胞外诱捕网; 活性氧; NADPH氧化酶

## Correlation between viral myocarditis and neutrophil extracellular traps

WANG Dan, LIANG Yuting, TA Na, ZHAO Dechao

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**Abstract** Viral myocarditis threatens human health, and its chronic process can develop into dilated cardiomyopathy, affecting the survival and prognosis of patients. Congenital immunity promises to play an important role in the invasion stage. Virus-induced extracellular neutrophil extracellular traps (NETs) can regulate the virus and destroy the host, cause pathological damage and affect the prognosis of viral myocarditis. In this review, we provided a comprehensive overview of the current research hotspot, that was, whether there was a potential association between NETs and myocarditis, in order to provide new discoveries that may help improve treatment for viral myocarditis.

**Keywords** neutrophil extracellular traps; reactive oxygen species; NADPH oxidase

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是一种与多种病毒感染相关的心肌炎症, 是年轻人心源性猝死(sudden cardiac death, SCD)和扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)形成的潜在重要因素, 其病理生理过程涉及病毒诱导的自身免疫

应答或持续的病毒感染<sup>[1]</sup>。先天免疫应答中不同的白细胞亚群进入心脏组织并导致与心肌细胞丢失和重塑相关的严重心脏炎症<sup>[2]</sup>。对于人类VMC和心肌病仍没有获得有效的疫苗和治疗方法, 值得去探索<sup>[3]</sup>。

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-29

通信作者 (Corresponding author): 赵德超, Email: drzhaodechao@163.com

## 1 柯萨奇 B3 VMC

一般来说, 心肌炎由感染性、毒性、免疫性等多因素引起, 心肌炎感染性病因包括病毒、寄生虫、原生动物和真菌等, 其中病毒最为常见。柯萨奇病毒属于小核糖核酸病毒科中的肠病毒属, 该家族有218种血清型。其中柯萨奇B3(CVB3)属于小核糖核酸病毒属的无包膜单链RNA病毒, 与宿主细胞受体相偶联, 可以感染人体多种器官组织。而心脏组织是CVB3感染最相关的靶点之一, 仍被认为是引起VMC的主要病原体<sup>[4]</sup>。病毒通过靶向宿主蛋白翻译机制和诱导细胞凋亡而在心脏发挥直接的细胞毒性作用。CVB3诱导的心肌炎是由最初的病毒直接损伤和继发的宿主免疫介导的炎性免疫损伤引起<sup>[5]</sup>。据最新报道<sup>[6]</sup>, 天然免疫细胞嗜中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)通过Toll受体9(TLR-9)识别CVB3病毒并触发NF- $\kappa$ B活化诱导中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)的释放。TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6等天然免疫细胞因子在VMC中的表达上调, 可能由感染柯萨奇病毒引起, 这表明炎性细胞因子在VMC的发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。

## 2 先天免疫应答抵抗病毒感染

先天免疫反应在感染过程中对宿主防御起至关重要的作用。先天免疫系统由多种不同的细胞类型组成, 这些细胞通过使用多种模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)以非特异性方式识别和响应病原体。这些PRR包括TLR, NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)和RIG样受体(RIG-like receptor, RLR), 本身不识别特定的病原体, 而是识别病原体相关的分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)<sup>[8]</sup>。先天免疫系统已经发展为表达几种特异于病毒配体(TLR3, TLR7, TLR8, RIG-I和MDA5)的PRR, 并产生许多有效的抗病毒介质(I型和II型干扰素, TNF- $\alpha$ , IL-15和IL-18等)<sup>[9]</sup>。这说明宿主病毒防御中先天免疫应答的重要性, 而先天性免疫应答中的关键细胞则是PMNs。

除物理障碍外, PMNs被认为是前线免疫防御的一部分。在血液中寿命为6~8 h, 在组织中可以持续长达7 d<sup>[10]</sup>。PMNs在宿主细菌和真菌感染方面均发挥重要作用, 它通过控制T细胞和B细胞的活化以及通过将抗原呈递给淋巴结中的专职抗

原呈递细胞, 参与适应性免疫<sup>[11]</sup>。它们在骨髓中分化, 然后释放到体循环中。感染后, 体循环的中性粒细胞迅速启动趋化性反应迁移到达炎症部位, 并通过多方面的杀伤机制抵抗微生物感染。PMNs是细胞内的异质性细胞群, 能够储存和快速部署多种细胞因子、趋化因子受体、黏附分子和中性粒细胞介导的趋化性、黏附性、外渗性和抗菌活性等的抗菌效应。它们还与招募和驻扎的免疫细胞相互干扰进一步调节免疫反应<sup>[12]</sup>。然而, PMNs在宿主防御中对病毒感染的作用仍然很少。在CVB3 VMC的小鼠模型中, Smilde等<sup>[13]</sup>观察到CVB3感染后早期, 有大量的PMNs动员和涌入小鼠的心脏和胰腺中。这种动员比任何其他趋化的先天免疫细胞早, 心脏中高达35%的细胞是PMNs, 急性心肌炎的严重程度与心脏中PMNs积聚密切相关<sup>[14]</sup>。PMNs用于宿主防御的机制是吞噬、脱颗粒、细胞因子的产生。直到最近, 人们认识到在病毒感染期间会产生NETs, 有证据<sup>[15]</sup>表明PMNs在抗病毒免疫反应中发挥重要作用, 这些病毒诱导的NETs既可以调控病毒又可以破坏宿主。体内释放NETs的PMNs不会立即死亡, 而是继续执行诸如趋化性和吞噬作用的功能。

## 3 NETs 的概述

### 3.1 NETs 组成和结构

NETs是PMNs捕获细胞外病原体的另一种不同于凋亡和坏死的细胞特殊死亡形式, 并且依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)<sup>[16]</sup>。NETs是一种由中性粒细胞活化时释放的胞外网状结构, 其核失去特征形状, 并发生染色质解聚。随后, 细胞核和颗粒的膜崩解而释放出的DNA结构, 占染色质体积的3~5倍。几种蛋白质黏附于NETs, 包括组蛋白和超过30种初级和次级颗粒成分<sup>[17]</sup>, 其中包括中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、组织蛋白酶G(cathepsin G, CG)、乳铁蛋白、五聚蛋白3、明胶酶、蛋白酶3(PR3)、LL37、肽聚糖结合蛋白等, 以及其他具有杀灭毒力因子的杀菌活性成分<sup>[18]</sup>。

### 3.2 NETs 形成的代谢需求

在过去的几年中, 人们对免疫功能的代谢基础的分析有了新的了解, 并已发现了新的生理学

联系和潜在的免疫调节途径。研究<sup>[19]</sup>显示: NETs形成严格依赖于葡萄糖, 并在较小程度上依赖于谷氨酰胺, NETs的形成可以被糖酵解抑制剂2-脱氧葡萄糖所抑制, 且在较小程度上被ATP合成酶抑制剂寡霉素抑制, 表明NETs形成可代谢分为2个阶段, 第1阶段: 染色质去浓缩, 独立于外源性葡萄糖; 第2阶段: NETs释放, 依赖于外源性葡萄糖和糖酵解。

### 3.3 NETosis的3种模式

NETs的活化过程被称为NETosis, 不同于坏死和凋亡的细胞程序性死亡, ROS通过NE介导的机制以及MPO都参与了NETs的活化<sup>[20]</sup>。迄今已知3种NETosis的模式。

#### 3.3.1 自杀性NETosis模式

自杀性NETosis的持续时间为2~4 h, 是最佳的模式<sup>[21]</sup>。它通过识别病原体来激活中性粒细胞, 导致它们通过蛋白激酶C(PKC)/Raf/MERK/ERK去包裹和激活NADPH氧化酶(NOX)复合物, 以及增加细胞溶质钙离子。这些阳离子作为肽酶精氨酸脱氨酶4(PAD4)的辅助因子。PAD4是一种促进组蛋白脱氨基的核酶, 通过促进组蛋白与DNA相互作用所必需的正电荷的丧失, 来修饰氨基酸以允许染色质的去浓缩。PAD4与自身免疫、心血管和肿瘤疾病的发病机理密切相关。与钙缺乏形式的PAD4酶结合的新型选择性PAD4抑制剂首次验证了人和小鼠PAD4在组蛋白瓜氨酸化和NETs形成中的关键酶作用<sup>[22]</sup>。因此自杀性NETosis通过PAD4依赖于ROS进行组蛋白瓜氨酸化, 染色质去浓缩, 最终将DNA作为细胞外陷阱(extracellular traps, ETs)释放。

#### 3.3.2 核DNA释放NETosis模式

在核DNA释放的重要性NETosis模式中, PMNs在5~60 min内没有表现出核膜或质膜的破坏, 这种类型的NETosis是通过TLR和C3蛋白的补体受体识别刺激而触发的<sup>[23]</sup>。此外, 血小板中糖蛋白Ib与中性粒细胞 $\beta$ 2整合素(CD18)的相互作用也可能通过ERK, PI3K和Src激酶的激活诱导NET的形成<sup>[24]</sup>。细胞核释放后, 这些中性粒细胞仍然能够吞噬病原体, 且寿命不受DNA丢失的影响<sup>[25]</sup>。

#### 3.3.3 线粒体DNA释放NETosis模式

该模式中, PMNs通过识别C5a或脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)释放线粒体DNA, 15 min内由80%的PMNs形成NET<sup>[26]</sup>。

### 3.4 NETs形成的相关信号通路

最近研究<sup>[27]</sup>表明: NETs的形成需要活化的蛋白激酶C(protein kinase C, PKC), 其中组蛋白瓜氨酸化发挥了关键的调节作用。Hakkim等<sup>[28]</sup>发现Raf-MEK-ERK通路也参与了NETs的生成。通过激活NADPH氧化酶并调节抗凋亡蛋白Mcl-1的表达, 其可以抑制凋亡并使细胞朝着NETs形成的方向发展。固有免疫复合物(iICs)可能以一种ROS释放依赖的方式介导NETs, 通过触发中性粒细胞表面的Fc $\gamma$ IIIB受体和Mac-1受体激活Syk, PI3K/Akt和p38MAPK信号通路<sup>[29]</sup>。最近, 无供体的中性粒细胞的活化释放了涉及NADPH氧化酶和髓过氧化物酶由p38MAPK通路及细胞外信号调节酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的激活所诱导的NETs。自噬现象是另一个介导NETs生成的重要部分, NETs的生成不仅依赖于ROS的产生, 也需要中性粒细胞本身具备承受自噬的能力。其中雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一个关键的自噬调节物, mTOR通路可以协调细胞内级联反应并活化中性粒细胞从而介导NETs的释放<sup>[30]</sup>。

## 4 NETs的抗病毒活性

NETs具有染色质链和抗微生物蛋白及蛋白酶, 可提供高浓度的抗菌蛋白以防止微生物扩散。此外, NETs带有大量的负静电荷, 并被许多核和颗粒蛋白“装饰”, 包括组蛋白、防御素和各种蛋白酶。关于NETs在宿主病毒反应中的作用信息很少, 实际上其可能具有抑制病毒感染的能力, 已发现 $\alpha$ -防御素相关的蛋白质直接抑制流感病毒复制和蛋白质生成。此外, 病毒与存在NETs上的DNA携带的负静电荷分子结合, 阻断病毒融合。HIV-1可以刺激NETs的形成, 并被NETs中和。有研究<sup>[31]</sup>使用小鼠模型证明: NETs通过体内循环病毒颗粒, 而有效地保护宿主细胞免受感染, 肝微血管内的NETs显著减少了感染宿主细胞的数量, 且这种保护完全依赖于脉管系统内的细胞外DNA。使用脱氧核糖核酸酶(DNase)会废除这种防御<sup>[31]</sup>。

## 5 NETs与其他疾病的关系

在非感染性疾病中, Jorch等<sup>[32]</sup>证实了NETs与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、糖尿病、动

脉粥样硬化、血管炎、血栓形成、癌症、伤口愈合和创伤等有着一定的联系。NETs 可以破坏宿主组织, 有助于发展自身免疫并导致其他功能紊乱的结果, 包括转移、血栓形成和不适当的凝血功能等<sup>[32]</sup>。

## 6 NETs 大量溢出

NETs 形成作为抗病毒防御策略的一部分, 是一把双刃剑。宿主可能受益于精确沉积在感染区域的 NETs, 从而固定甚至中和病毒并杀死感染的细胞。如果 NET 形成过于广泛, 在健康组织中造成 NETs 储存, 这种益处可能会变成灾难。因此, 感染区附近太多未感染的宿主细胞可能会受到“友好的火力”, 导致相当多的附带组织损伤。如果 NETs 降解机制(DNase 活性)受损, 或病毒性 NETs 刺激能力过强, 则局部 NETs 相关病理可能变得系统性。这种不平衡的 NETs 形成会导致 NETs 大量溢出<sup>[33]</sup>。

## 7 结语

关于 PMNs 通过 NETs 结构在感染性、自身免疫性、自身炎症性和代谢性疾病中的作用的累积数据表明它们构成预后的新型生物指标, 并通过阻断 NETs 信号转导的形成或局部中和来代表治疗 VMC 靶标的候选者, 势必会为 VMC 的预防及治疗提供新的思路。

## 参考文献

- Biesbroek PS, Beek AM, Germans T, et al. Diagnosis of myocarditis: current state and future perspectives[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 191: 211-219.
- Lindner D, Li J, Savvatis K, et al. Cardiac fibroblasts aggravate viral myocarditis: cell specific coxsackievirus B3 replication[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 519528.
- Li M, Yan K, Wei L, et al. Zinc finger antiviral protein inhibits coxsackievirus B3 virus replication and protects against viral myocarditis[J]. *Antiviral Res*, 2015, 123: 50-61.
- Garmaroudi FS, Marchant D, Hendry R, et al. Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis[J]. *Future Microbiol*, 2015, 10(4): 629-653.
- Fung G, Luo H, Qiu Y, et al. Myocarditis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(3): 496-514.
- Rivadeneira L, Charó N, Kviatcovsky D, et al. Role of neutrophils in CVB3 infection and viral myocarditis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 125: 149-161.
- Ge LS, Zhao JL, Chen GY, et al. Dose-dependent protective effect of nicotine in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15895.
- Akira S. Innate immunity and adjuvants[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011, 366(1579): 2748-2755.
- McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections[J]. *J Leukocyte Biol*, 2009, 86(4): 803-812.
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(7): 602-611.
- Kolaczowska E, Kuberski P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-175.
- Yin C, Heit B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(3): 455-471.
- Smilde BJ, Woudstra L, Fong Hing G, et al. Colchicine aggravates coxsackievirus B3 infection in mice[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 216: 58-65.
- Fairweather D, Frisanchock S, Yung SA, et al. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart[J]. *J Immunol*, 2005, 174(1): 261-269.
- Jenne CN, Kuberski P. Virus-induced NETs—critical component of host defense or pathogenic mediator?[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(1): e1004546.
- Fuchs TA, Ulrike A, Christian G, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(2): 231-241.
- Pires RH, Felix SB, Delcea M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(29): 14193.
- Mesa MA, Vasquez G. NETosis[J]. *Autoimmune Dis*, 2013, 2013: 651497.
- Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano MM, et al. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation[J]. *Immunology*, 2015, 145(2): 213-224.
- Mozzini C, Garbin U, Fratta Pasini AM, et al. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis[J]. *Intern Emerg Med*, 2017, 12(1): 13-22.
- Pilszczek 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.
- Lewis HD, Liddle J, Coote JE, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 189-191.
- Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, et al.

- Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 81.
24. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 153-162.
  25. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it?[J]. *Blood*, 2013, 122(16): 2784-2794.
  26. 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.
  27. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deamination and neutrophil extracellular chromatin release[J]. *Front Immunol*, 2013, 4(6): 38.
  28. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(2): 75-77.
  29. Behnen M, Leschczyk C, Möller S, et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1[J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1954-1965.
  30. Itakura A, Mccarty OJ. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(3): C348-C354.
  31. Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2): 169-180.
  32. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nat Med*, 2017, 23(3): 279-287.
  33. Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil extracellular traps go viral[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 366.

本文引用: 王丹, 梁雨亭, 塔娜, 赵德超. 病毒性心肌炎与NETs的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(4): 874-878. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.032

**Cite this article as:** WANG Dan, LIANG Yuting, TA Na, ZHAO Dechao. Correlation between viral myocarditis and neutrophil extracellular traps[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(4): 874-878. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.032