

· 综 述 ·

基于“瘀毒”理论探讨中性粒细胞胞外诱捕网在动脉粥样硬化中作用

杜天依^{1,2} 鞠建庆² 杨琳^{2,3} 曲华² 宋烨闻² 孟闫燕¹ 高铸桦²

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是缺血性心脑血管疾病的主要病理基础, 斑块形成与破裂是导致心肌梗死或缺血性脑卒中等急性事件的主要病理机制。随着以低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 为代表的危险因素得到控制, 斑块侵蚀机制逐渐受到关注^[1]。中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 形成是 AS 斑块侵蚀性病变的特征之一^[2]。近年来研究发现, NETs 通过促进血栓形成, 加速炎症反应参与 AS 进展^[3, 4]。调控 NETs 形成防治 AS 的发生发展已成为研究热点。笔者以 NETs 形成为切入点, 总结瘀毒病因病机与 AS 病理生理变化的相关性, 探讨“瘀”“毒”在 AS 中的作用, 以期为中西医结合防治 AS 提供新的研究思路。

1 AS 瘀毒理论

AS 病位在血脉, 以此为病理基础的冠状动脉 AS 性心脏病、急性冠脉综合征等心血管疾病归属于中医学“胸痹”“真心痛”“厥心痛”等范畴。中医学认为脂质代谢异常、血小板功能异常等病理改变造成动脉管腔狭窄, 表现出“血脉瘀阻”的病机。然而急性心血管事件中组织坏死、炎症反应等病理改变难以用“血瘀”来概括。毒邪致病具有发病急骤、变化迅速的特征, 对应西医血管活性物质、自由基和炎性介质堆积等微观病理表现, 基于中医学理论对“瘀”“毒”的认识, 陈可冀院士及其团队提出“因

瘀致毒, 瘀毒致变”是急性心血管事件发生的关键病机^[5, 6]。

血脉凝滞, 气血不通, 瘀血阻于经脉之中, 持续侵袭经脉并不断蓄积, 造成对局部经脉的持续性刺激和损伤。瘀血日久化热酿毒, 毒邪内盛, 壅塞气机, 进而加重络伤, 痹阻血脉, 最终导致瘀毒互结。临床可影响病情稳定性, 诱发急性心血管事件发生, 进而影响预后和转归。

2 NETs 与 AS 内在联系

NETs 是中性粒细胞受多种因素刺激后释放的网状复合物, 由染色质 DNA、组蛋白和中性粒细胞颗粒蛋白组成。氧化低密度脂蛋白胆固醇^[7]、促炎因子^[8]、血小板^[9]等刺激物触发 NETs 的形成, 参与 AS 发生和发展过程^[10]。NETs 激活和释放的过程被称作 NETosis^[11]。NETosis 作为一种新型细胞程序性死亡途径, 与焦亡、凋亡、坏死等途径之间存在多层面串扰和交联作用^[12]。近年来, 研究证实 NETs 形成过程与以 AS 为基础的心血管疾病密切相关^[13, 14]。

NETs 存在于 AS 病变中, 与斑块糜烂和复杂性病变有关。Megens RT 等^[15]通过组织学研究首次证实并报道了小鼠和人类管腔内 AS 病变部位中存在 NETs。另一项研究对人类颈动脉内膜 AS 标本进行分析, 结果显示 NETs 主要存在于凋亡内皮细胞和平滑肌细胞附近的浅表糜烂中, 而非富含脂质的易损斑块中^[16]。此外, 研究还发现 NETs 分布于 AS 复杂病变 (如斑块内出血、糜烂和破裂), 但是未见其在完整斑块内存在^[17, 18]。Knight JS 等^[19]发现肽酰基精氨酸脱亚氨酶 (peptidyl arginine deiminase, PAD) 抑制剂可阻断 ApoE^{-/-} 小鼠 NETs 的形成, 抑制中性粒细胞和巨噬细胞向动脉聚集, 减小 AS 病变面积, 延迟颈动脉血栓形成的时间。Liu Y 等^[20]证实 PAD4 髓系特异性缺失的小鼠 NETs 的形成减少, 炎症反应被抑制, AS 病变显著减少。

NETs 诱导斑块破裂和血栓形成, 参与急性心肌梗死事件发生。Riegger J 等^[21]对经皮冠状动脉

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82004145, No.82104678); “重大新药创制”科技重大专项 (No.2019ZX09201005-002-006); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目基金资助项目 (No. CI2021A00920)

作者单位: 1 北京中医药大学研究生院 (北京 100029); 2 中国中医科学院西苑医院国家中医心血管病临床医学研究中心 (北京 100091); 3 中国中医科学院西苑医院心血管病实验室 (北京 100091)

通讯作者: 高铸桦, Tel: 010-62835392, E-mail: zhuyegao@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20230202.105

介入术后支架血栓进行分析,发现在 23% 的样本中观察到 NETs 的存在,且与心肌梗死面积呈正相关。Maugeri N 等^[22]对 26 例急性心肌梗死患者血栓进行组织学研究,发现冠状动脉血栓主要由激活的血小板、中性粒细胞和血小板附近的 NETs 组成,推测活化血小板向中性粒细胞呈现高迁移率族蛋白盒 1 (high mobility group box 1, HMGB1),参与 NETs 形成,导致斑块破裂和血栓形成。然而,另一项研究检测了 45 例急性心肌梗死患者的冠状动脉血栓切除标本,结果发现 NETs 存在于溶解性和新鲜血栓标本中,但在组织血栓中从未观察到其存在,推测 NETs 参与冠状动脉血栓形成和溶解变化的早期阶段,并通过白介素 (interleukin, IL) -17A 和 IL-17F 增强血小板聚集促进血栓形成^[23]。

由此可见,NETs 与血栓形成与炎症反应密切相关,在 AS 发展中起到了桥梁的作用。一方面,NETs 中的双链 DNA 和组蛋白为血小板和红细胞的结合提供了网状结构支点。另一方面,NETs 对血管内皮细胞具有毒性损伤作用,加重内皮损伤,诱导血小板活化,促进免疫炎症,进而加剧 AS^[2]。NETs 形成体现了 AS “瘀” “毒” 从化互结的病因病机。

3 NETs 在 AS 中关键病机

3.1 血脉瘀阻,瘀毒从化 中医学将血小板聚集导致的血栓形成归于“瘀”的病因。在 AS 的基础上,狭窄的动脉管腔被血栓阻塞,导致心脑血管血栓性疾病的发生,表现出“血脉瘀阻”的病机。中性粒细胞释放 NETs,引发血小板聚集和纤维蛋白沉积,促进血栓形成、稳定和生长^[24]。

中医学毒邪与 AS 过程涉及的血管内皮损伤、易损斑块糜烂、炎症细胞浸润等密切相关。NETs 在 AS 内皮功能障碍及炎症损伤中起到重要作用^[25],体现了毒损血脉的病机。在内皮细胞 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) 依赖性调节作用下,中性粒细胞聚集和释放 NETs,降低了内皮细胞连续性,加重内皮细胞的侵蚀^[16, 26]。随后,炎症部位的中性粒细胞脱颗粒并释放活性氧 (reaction oxygen species, ROS),导致受损内皮细胞死亡和脱离^[27]。同时,NETs 通过补体级联和释放基质金属蛋白酶 9 (metalloproteinase 9, MMP9) 和中性粒细胞弹性酶 (neutrophil elastase, NE) 等进一步攻击血管内皮,加重内皮损伤并放大局部炎症反应^[27]。这与毒邪易于损伤正气的特点一致。此外,NETs 可以通过激活和损伤内皮细胞直接诱导内皮功能障碍^[19, 28];而抑制 NETosis 或脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 降解

NETs DNA 则减少小鼠内皮细胞凋亡^[18]。

血脉凝滞,气血不通,日久化热酿毒。毒邪深伏难解,发病酷烈急骤,常夹瘀血,体现“瘀毒从化”的病机。在急性 ST 段抬高型心肌梗死中,凝血酶激活的血小板与斑块破裂部位的中性粒细胞相互作用,导致局部 NETs 的形成和活性组织因子的释放^[29]。中性粒细胞与内皮细胞的相互作用可引发受损血管中的动脉血栓形成,是诱发动小板聚集的一个关键步骤^[30]。靶向与内皮细胞相互作用的中性粒细胞可能是减少血栓形成的有效策略。

3.2 毒损血脉,瘀毒互结 不稳定斑块破裂合并血栓形成是急性心血管事件的重要病理基础,表现出毒邪具有骤发性、酷烈性的病理特征,是 AS 病机发生转变的关键。NETs 具有细胞毒性作用,导致炎症细胞和炎症介质水平的升高,体现了“内毒”的致病特点。Silvestre-Roig C 等^[31]证实,NETs 组成中组蛋白 H4 触发平滑肌细胞溶解和死亡,加剧晚期 AS 中的组织损伤和炎症,增加 AS 斑块不稳定性。此外,NETs 和坏死细胞释放的双链 DNA 可以通过黑色素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 炎症小体激活巨噬细胞释放大量细胞因子 IL-1 β 和 IL-18,导致 AS 斑块不稳定性增加^[32]。

毒邪内盛,壅塞气机,进而加重络伤。炎症反应的激活是易损斑块形成和破裂的主要原因,与“毒邪最易腐筋伤脉”病机相符。NETs 受促炎因子调节,并进一步激活和放大炎症反应。Warnatsch A 等^[33]利用 ApoE^{-/-} 模型小鼠发现,在胆固醇晶体刺激下,中性粒细胞形成 NETs,激活巨噬细胞炎症反应发生。同时,巨噬细胞通过激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体,分泌 IL-1 β 和 IL-18 等促炎因子,增加 AS 斑块中中性粒细胞的积聚,促进 NETs 的形成^[34]。研究表明,胆固醇晶体激活巨噬细胞炎症小体和 NETs 形成,提示通过直接抑制胆固醇流出或间接抑制炎症小体,阻断 NETs 形成^[35]。

NETs 及其组成部分可作为预测 AS 严重程度和心血管事件发生风险的生物标志物。Borisoff JI 等^[36]对 282 例冠状动脉 AS 患者进行的一项前瞻性、观察性、横断面队列研究提示 NETs 可能与严重的冠状动脉 AS 和血栓前状态独立相关,是诊断 AS 和预测主要不良心血管事件 (major adverse cardiovascular events, MACEs) 的潜在生物标记物。与传统的炎症因子如高敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive

protein, hs-CRP) 相比, NETs 有望作为区分斑块侵蚀和破裂的无创指标, 为急性心血管事件进行精准的分类和治疗^[2]。

4 结语

综上所述, NETs 促进血栓形成, 激活炎症反应, 体现了血脉瘀阻、毒损血脉的中医病机, 与 AS 瘀毒兼夹致病特点相契合。NETs 在免疫系统疾病中研究较为成熟, 但在心脑血管疾病中的作用仍有待深入研究。此外, 目前中药研究尚局限在对抑制血小板或中性粒细胞活化中的某一环节, 对 NETs 直接作用的临床和基础研究甚少。如何利用中药多靶点、多途径作用的优势, 预防 NETs 形成或对 NETs 形成的多环节进行抑制, 以减少 AS 病变增长, 对活血解毒中药的临床应用具有指导作用。

临床应聚焦 NETs 这一研究热点, 进一步剖析体内 NETs 形成的确切机制, 提高心、脑血管血栓性疾病瘀毒辨证的准确性, 发挥其预测价值。笔者基于瘀毒理论, 以 NETs 形成为切入点, 总结中医学对瘀毒病因病机与 AS 病理生理变化的相关性, 为早期识别 AS “瘀毒内结” 临床表征提供重要依据, 有利于心、脑血管血栓性疾病中医病因病机学理论的创新和发展。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592 (7855): 524–533.
- [2] Folco Eduardo J, Mawson Thomas L, Vromman Amélie, et al. Neutrophil extracellular traps induce endothelial cell activation and tissue factor production through interleukin-1 α and cathepsin G[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38: 1901–1912.
- [3] Klop J, Brostjan C, Eilenberg W, et al. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (2): 559.
- [4] Kurihara O, Takano M, Miyauchi Y, et al. Vulnerable atherosclerotic plaque features: findings from coronary imaging[J]. J Geriatr Cardiol, 2021, 18 (7): 577–584.
- [5] 徐浩, 史大卓, 殷惠军, 等. “瘀毒致变” 与急性心血管事件: 假说的提出与临床意义 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28 (10): 934–938.
- [6] 史大卓, 徐浩, 殷惠军, 等. “瘀”、“毒” 从化——心脑血管血栓性疾病病因病机 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6 (11): 1105–1108.
- [7] Obama T, Ohinata H, Takaki T, et al. Cooperative action of oxidized low-density lipoproteins and neutrophils on endothelial inflammatory responses through neutrophil extracellular trap formation[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1899.
- [8] 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.
- [9] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood[J]. Nat Med, 2007, 13 (4): 463–469.
- [10] Jorch SK, Kubersky P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. Nat Med, 2017, 23 (3): 279–287.
- [11] 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.
- [12] Rosazza T, Warner J, Sollberger G. NET formation-mechanisms and how they relate to other cell death pathways[J]. Febs J, 2021, 288 (11): 3334–3350.
- [13] Bonaventura A, Vecchié A, Abbate A, et al. Neutrophil extracellular traps and cardiovascular diseases: an update[J]. Cells, 2020, 9 (1): 231.
- [14] Döring Y, Libby P, Soehnlein O. Neutrophil extracellular traps participate in cardiovascular diseases: recent experimental and clinical insights[J]. Circ Res, 2020, 126 (9): 1228–1241.
- [15] Megens RT, Vijayan S, Lievens D, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis[J]. Thromb Haemost, 2012, 107 (3): 597–598.
- [16] Quillard T, Araújo HA, Franck G, et al. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion[J]. Eur Heart J, 2015, 36 (22): 1394–1404.
- [17] Pertiwi KR, van der Wal AC, Pabitter DR, et al. Neutrophil extracellular traps participate in all different types of thrombotic and haemorrhagic

- complications of coronary atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118 (6): 1078–1087.
- [18] Franck G, Mawson TL, Folco EJ, et al. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial Injury: implications for superficial erosion[J]. *Circ Res*, 2018, 123 (1): 33–42.
- [19] Knight JS, Luo W, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2014, 114 (6): 947–956.
- [20] Liu Y, Carmona-Rivera C, Moore E, et al. Myeloid-specific deletion of peptidylarginine deiminase 4 mitigates atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1680.
- [21] Riegger J, Byrne RA, Joner M, et al. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37 (19): 1538–1549.
- [22] Maugeri N, Campana L, Gavina M, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12 (12): 2074–2088.
- [23] De Boer OJ, Li X, Teeling P, et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109 (2): 290–297.
- [24] Döring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis[J]. *Circ Res*, 2017, 120 (4): 736–743.
- [25] Yu S, Liu J, Yan N. Endothelial dysfunction induced by extracellular neutrophil traps plays important role in the occurrence and treatment of extracellular neutrophil traps-related disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5626.
- [26] Franck G, Mawson T, Sausen G, et al. Flow perturbation mediates neutrophil recruitment and potentiates endothelial injury via TLR2 in mice: implications for superficial erosion[J]. *Circ Res*, 2017, 121 (1): 31–42.
- [27] Van Avondt K, Maegdefessel L, Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation[J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119 (4): 542–552.
- [28] 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): e32366.
- [29] Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36 (22): 1405–1414.
- [30] Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation[J]. *Blood*, 2012, 120 (10): 2133–2143.
- [31] Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death[J]. *Nature*, 2019, 569 (7755): 236–240.
- [32] Paulin N, Viola JR, Maas SL, et al. Double-strand DNA sensing aim2 inflammasome regulates atherosclerotic plaque vulnerability[J]. *Circulation*, 2018, 138 (3): 321–323.
- [33] Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis[J]. *Science*, 2015, 349 (6245): 316–320.
- [34] Tall AR, Westertep M. Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60 (4): 721–727.
- [35] Westertep M, Fotakis P, Ouimet M, et al. Cholesterol efflux pathways suppress inflammasome activation, NETosis, and atherogenesis[J]. *Circulation*, 2018, 138 (9): 898–912.
- [36] Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (8): 2032–2040.

(收稿: 2022-09-05 在线: 2023-03-17)

责任编辑: 邱 禹