

• 综述 •

离子通道调控急性心肌梗死中性粒细胞胞外诱捕网
的研究进展*吴雨薇^{1,2,3,4} 吴琼峰^{1,2,3} 杜以梅^{1,2,3}

[摘要] 中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是由组蛋白和中性粒细胞颗粒蛋白组成的DNA网状结构,在中性粒细胞捕获和杀死病原体过程中起重要作用。在心肌梗死过程中,中性粒细胞激活导致NETs水平的异常升高,加重了炎症反应和组织损伤。目前研究提示,相关离子通道的活化可通过不同途径调控NETs形成,导致心肌梗死后损伤加重、心律失常等心血管不良事件的发生。本文阐述了NETs的形成途径和对急性心肌梗死的作用,并详细描述了中性粒细胞上小电导钙激活钾通道、瞬时感受器电位离子通道、P2X受体和囊性纤维化跨膜电导调节节等在NETs形成中的作用和机制,为减轻心肌梗死后心脏重塑和心律失常提供新的思路。

[关键词] 中性粒细胞胞外诱捕网;离子通道;活性氧

DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2024.05.003

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A

*基金项目:国家自然科学基金项目(No:81900324,82170326)

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科(武汉,430022)

²生物靶向治疗研究湖北省重点实验室

³心血管疾病免疫诊疗湖北省工程研究中心

⁴武汉市第三医院心内科

通信作者:杜以梅,E-mail:yimeidu@mail.hust.edu.cn

引用本文:吴雨薇,吴琼峰,杜以梅.离子通道调控急性心肌梗死中性粒细胞胞外诱捕网的研究进展[J].临床心血管病杂志,2024,40(5):358-365. DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2024.05.003.

- [14] Zekavat SM, Viana-Huete V, Matesanz N, et al. TP53-mediated clonal hematopoiesis confers increased risk for incident atherosclerotic disease[J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2023, 2(2):144-158.
- [15] Bick AG, Pirruccello JP, Griffin GK, et al. Genetic interleukin 6 signaling deficiency attenuates cardiovascular risk in clonal hematopoiesis [J]. *Circulation*, 2020, 141(2):124-131.
- [16] Stein A, Metzeler K, Kubasch AS, et al. Clonal hematopoiesis and cardiovascular disease:deciphering interconnections[J]. *Basic Res in Cardiol*, 2022, 117(1):5.
- [17] Abplanalp WT, Cremer S, John D, et al. Clonal hematopoiesis-driver DNMT3A mutations alter immune cells in heart failure[J]. *Circ Res*, 2021, 128(2):216-228.
- [18] Sano S, Oshima K, Wang Y, et al. CRISPR-mediated gene editing to assess the roles of Tet2 and Dnmt3a in clonal hematopoiesis and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2018, 123(3):335-341.
- [19] Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice [J]. *Science*, 2017, 355(6327):842-847.
- [20] Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis [J]. *Nature*, 2021, 592(7853):296-301.
- [21] Dotan I, Yang J, Ikeda J, et al. Macrophage Jak2 deficiency accelerates atherosclerosis through defects in cholesterol efflux [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1):132.
- [22] Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12):1119-1131.
- [23] Svensson EC, Madar A, Campbell CD, et al. TET2-driven clonal hematopoiesis and response to canakinumab [J]. *JAMA Cardiology*, 2022, 7(5):521-528.
- [24] Hafiane A, Daskalopoulou SS. Targeting the residual cardiovascular risk by specific anti-inflammatory interventions as a therapeutic strategy in atherosclerosis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178:106157.
- [25] Tardif JC, Kouz S, Waters DD, et al. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(26):2497-2505.
- [26] Tall AR, Bornfeldt KE. Inflammasomes and atherosclerosis: a mixed picture [J]. *Circ Res*, 2023, 132(11):1505-1520.

(收稿日期:2024-04-08)

Research progress of ion channels in the formation mechanism of neutrophil extracellular traps in acute myocardial infarction

WU Yuwei^{1, 2, 3, 4} WU Qiongfeng^{1, 2, 3} DU Yimei^{1, 2, 3}

(¹Department of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Hubei Key Laboratory of Biological Targeted Therapy; ³Hubei Provincial Engineering Research Center of Immunological Diagnosis and Therapy for Cardiovascular Diseases; ⁴Department of Cardiology, Wuhan Third Hospital)

Corresponding author: DU Yimei, E-mail: yimeidu@mail.hust.edu.cn

Abstract Neutrophil extracellular traps (NETs) are web-like DNA structures decorated with histones and neutrophil granule proteins in capturing and killing pathogens. During myocardial infarction, an abnormal increase in the level of NETs exacerbates the inflammatory response and tissue damage. The current study suggests that activation of related ion channels may regulate the formation of NETs through different pathways, leading to cardiovascular adverse events such as ventricular remodeling and arrhythmias after myocardial infarction. In this paper, we first described the pathways during NETs formation and their role in acute myocardial infarction. We also summarized in detail the role and mechanism of ion channels in NETs formation during acute myocardial infarction, including SK, TRP, P2X, and CFTR on neutrophils, which may provide new ideas for mitigating cardiac remodeling and arrhythmias after myocardial infarction.

Key words neutrophil extracellular traps; ion channels; reactive oxygen species

中性粒细胞是体内数量最多和反应最快的先天免疫细胞。在病原体侵入的几分钟内,中性粒细胞即被大量募集至感染部位,通过吞噬作用,脱颗粒释放溶菌酶,产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)等来发挥抗病原体作用^[1]。Brinkmann等^[2]发现了中性粒细胞抗病原体的另一种关键物质,即中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)。NETs是一种由中性粒细胞释放的网状结构,主要由DNA和组蛋白组成。其周围附着各种颗粒蛋白,包括中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、髓过氧化物酶(MPO)、组织蛋白酶G和白细胞蛋白酶3等^[3]。这种细胞外网状结构可以捕获病原体,限制病原体的传播,并维持局部高浓度的抗菌物质以杀死病原体。但在急性心肌梗死过程中,NETs的过度释放反而放大了炎症反应,导致组织损伤和不良心血管事件的发生(如心室重塑和心律失常)^[4-5]。值得注意的是,PAD4敲除抑制NETs形成的确减少了心肌缺血再灌注损伤和不良心室重塑,但也可能造成心肌梗死后初期的ROS产生增加和炎症损伤加重^[6]。因此,需要寻找新的可行性靶点进而精准调控NETs生成。

中性粒细胞膜上表达多种离子通道,包括K⁺、Ca²⁺、Cl⁻通道等,介导多种信号的传递,调节中性粒细胞的迁移及抗炎物质释放^[7]。研究表明,这些离子通道在心肌梗死NETs形成过程中也起到了一定的作用。本文将对中性粒细胞膜上离子通道在心肌梗死NETs形成中的作用及其机制进行综述。

1 NETs的形成机制

NETs的形成主要包括两种途径:还原型烟酰

胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)依赖性途径和NOX非依赖性途径。其中PMA通过激活中性粒细胞内PKC和Raf-MEK-ERK等信号通路,诱导NOX相关的ROS释放,促进NETs形成。而钙离子载体A23187及离子霉素介导的NETs形成则独立于NOX,可能需要AKT激酶的活化和线粒体ROS的参与^[8-9]。这两种途径最终都导致精氨酸脱亚氨酶4(PAD4)活化及组蛋白H3瓜氨酸化(CitH3),促进MPO和NE释放,介导NETs形成^[10]。此外,通过药理学抑制或siRNA抑制ATG5、ATG7表达水平来抑制自噬,可以显著减少PMA、fMLP及病原体等刺激诱导的NETs形成,但对ROS的释放没有影响。提示除ROS依赖性途径以外,自噬也可能通过ROS非依赖的途径介导NET形成^[11]。

2 NETs与急性心肌梗死

2.1 NETs对急性心肌梗死后心脏重塑的影响

研究显示,急性心肌梗死患者血浆中dsDNA(NETs标志物)水平显著升高,与心肌梗死面积呈正相关^[12]。GSK484药理学抑制PAD4可以显著减少小鼠心肌梗死后中性粒细胞向梗死区的募集,抑制炎症因子分泌和NETs释放,减轻心肌细胞凋亡,从而减少心肌梗死面积和恢复左心室射血分数,改善心脏结构及功能^[13]。同样,DNaseI降解NETs,可以增加心肌梗死后心肌细胞的存活率,并改善心肌梗死后左心室重塑的程度^[14]。并且体外实验发现,NETs可以促进新生大鼠原代心肌细胞的凋亡,进一步证实NETs有致心肌细胞损伤的作用^[15]。其中NETs中的组蛋白可介导心肌损伤。

组蛋白不仅可以通过与磷脂的静电相互作用对细胞膜造成直接损伤,还可以直接减少巨噬细胞对凋亡中性粒细胞和其他细胞群的摄取,促进炎症递质的释放,加重组织坏死^[16-17]。以上这些结果提示,急性心肌梗死过程中 NETs 水平升高加重心肌梗死的程度,从而影响心脏功能。

另外,NETs 水平的升高与心肌梗死后组织纤维化密切相关。研究发现秋水仙碱可以通过抑制 NETs 的形成,从而减轻心肌梗死后纤维化水平^[18]。此外,高度活化的纤维细胞积聚在心肌梗死部位;且体外实验发现,NETs 可以诱导单核细胞分化为纤维细胞并激活纤维细胞,促进组织纤维化^[19-21]。由此可见,急性心肌梗死后 NETs 水平增加可以介导心肌细胞损伤及纤维细胞活化,加重心肌组织坏死和心肌纤维化。

2.2 NETs 对急性心肌梗死后心律失常的影响

Mollenhauer 等^[22]发现 NETs 的主要成分——MPO 水平与心律失常的发生呈正相关。心肌梗死发生后小鼠室性心动过速发生率增加,伴随血浆 MPO 水平显著升高;而敲除 MPO 可以减少心肌梗死后室性心动过速的发生。另外,敲除 MPO 还可减少刺激诱导的心房颤动发生^[23]。MPO 可以增加金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活性,通过促进缝隙连接蛋白(connexin 43, Cx43)降解,影响心肌间的正常电传导。因此,急性心肌梗死后 NETs 水平增加可能通过介导心肌异常的电重构促进心肌梗死后心律失常的发生。

3 离子通道对急性心肌梗死 NETs 形成的调控

中性粒细胞上表达多种离子通道,包括小电导钙激活钾通道(small conductance calcium-activated potassium channel, SK)、瞬时感受器电位离子通道(transient receptor potential ion channels, TRP)、P2X 受体和囊性纤维化跨膜电导调节体(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)等。在心肌梗死过程中,这些离子通道被不同的刺激活化,参与 NETs 的形成。

3.1 SK 通道

SK 通道是钙激活钾通道家族的一员,包括 SK 1~3。Krause 等^[24]采用全细胞膜片钳法,发现离子霉素促进人中性粒细胞外向钾电流增加,首次在人中性粒细胞中发现了非电压依赖性的钙激活钾通道。随后 Fay 等^[25]也采用全细胞膜片钳法,在 PLB-985 细胞(中性粒细胞样细胞系)上发现,SK 通道抑制剂 apamin 几乎完全抑制 Ca^{2+} 诱导的外向钾电流,提示中性粒细胞中的钙激活钾通道主要是 SK 通道;并在 mRNA 水平上发现 SK3 在中性粒细胞上表达,进一步证实 SK3 是中性粒细胞上

主要的功能性表达的 SK 通道。

SK 通道在 NETs 形成中发挥重要作用。Douda 等^[8]利用 SK 通道特异性激活剂 1-EBIO 刺激人中性粒细胞,发现在刺激开始到刺激 6 h 内 NETs 水平逐渐升高,提示 SK 通道活化介导 NETs 形成。随后该团队探讨了 SK 通道调控 NETs 形成的途径,利用 NS8593 和 apamin 药理学阻断 SK 通道或 siRNA 转染抑制 SK3 表达后,采用 Sytox green 核酸染料检测对 PMA 诱导的 NOX 依赖性 NETs 以及 A23187 介导的 NOX 非依赖性 NETs 形成的影响,结果发现,阻断 SK3 可以显著抑制 A23187 的作用,但对 PMA 的作用没有显著影响。Mazzoleni 等^[26]采用 MPO、NE、CitH3 三重免疫荧光检测人中性粒细胞 NETs 形成,同样发现 NS8593 对 PMA 诱导的 NETs 形成没有影响。这些结果提示,活化的 SK3 可能通过 NOX 非依赖途径促进 NETs 形成。此外,Fay 等^[25]发现 1-EBIO 促进中性粒细胞胞质 ROS 形成,基因敲除 NOX 亚基并不影响 1-EBIO 诱导的 ROS 形成;且 1-EBIO 可以直接促进中性粒细胞线粒体 ROS 形成,提示 SK 通道促进 NOX 非依赖性 ROS 释放,而对 NOX 相关 ROS 没有影响。进一步说明活化的 SK3 通过 NOX 非依赖途径促进 NETs 形成。值得注意的是,Tackenberg 等^[27]利用 MPO-DNA ELISA 法检测人中性粒细胞 NETs 形成水平,发现 NS8593 可明显减少 PMA 诱导的 NETs 形成。这两种研究结果的差异可能源于 NETs 检测手段的不同,相比于 Sytox green 动力学检测和免疫荧光检测,MPO-DNA 复合物的检测更能反映 NETs 的变化。因此,SK3 通道可能在 NOX 依赖性 NETs 形成中也起一部分作用。由此,可以推测中性粒细胞 SK 通道活化主要通过 NOX 非依赖性途径促进线粒体 ROS 产生和 NETs 形成。

目前关于 SK 通道介导 NETs 形成对心肌梗死影响的研究少见报道,但有研究发现,心肌梗死中 SK 通道激活、抑制 SK 通道显著降低心肌梗死后室性心律失常的发生,由此推测 SK 通道可能通过介导 NETs 形成加重心肌缺血后心律失常的发生^[28-29]。

3.2 TRP 通道

TRP 通道是存在于细胞膜或细胞器膜上的一类非选择性阳离子通道,由 6 种不同的亚家族组成,包括 TRPA (Ankyrin)、TRPC (Canonical)、TRPM (Melastatin)、TRPML (Mucolipin)、TRPP (Polycystin)、TRPV (Vanilloid) 家族。其中中性粒细胞上主要表达 TRPM、TRPV,参与中性粒细胞活化后的多种功能,包括迁移、颗粒蛋白释放和 ROS 产生等^[30]。

3.2.1 TRPM 通道 TRPM 通道是对 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 K^{+} 通透的非选择性阳离子通道,包括 TRPM 1~8。TRPM2 在中性粒细胞中高表达,免疫荧光定位于细胞膜上,能够被 ROS、AMP 等激活,介导中性粒细胞趋化、迁移和 NE 释放等多种生物学过程^[31-32]。Chauhan 等^[33] 利用全细胞膜片钳,在小鼠腹腔中性粒细胞中发现 H_2O_2 诱导的具有 TRPM2 电流-电压特征的内向钙电流,而 TRPM2 抑制剂 FFA 导致 H_2O_2 诱导的电流密度显著衰减,提示中性粒细胞上存在 TRPM2 通道的功能性表达。

TRPM2 介导 NETs 形成。Tripathi 等^[34] 发现 FFA 药理学抑制 TRPM2 显著抑制了 H_2O_2 诱导的小鼠腹腔和人外周血中性粒细胞胞外 Ca^{2+} 流入和 NETs 形成;同时发现敲除 TRPM2 显著抑制了 H_2O_2 诱导中性粒细胞上 LC3-II / LC3 水平,提示 TRPM2 介导的 NETs 形成可能与自噬激活有关。随后,该团队探究了 TRPM2 介导 NETs 形成过程中的具体机制,采用蛋白质印迹法,发现敲除 TRPM2 显著抑制了 H_2O_2 诱导的 AMPK α 1 和 p38 的磷酸化水平;且 AMPK 和 p38 特异性抑制剂可以显著抑制 H_2O_2 诱导的 LC3-II / LC3 的水平及 NETs 形成的升高。这些结果提示中性粒细胞上 TRPM2 可以激活 AMPK 和 p38,通过促进自噬激活,从而介导 NETs 形成。但 TRPM2 是否可以诱导 ROS 增加,参与 NOX 依赖或非依赖性 NETs 形成尚不清楚,有待进一步研究。

中性粒细胞上 TRPM2 介导的 NETs 形成可能参与心肌缺血再灌注损伤过程。Hiroi 等^[35] 在小鼠心肌缺血再灌注模型中发现,敲除 TRPM2 可以显著减少心肌组织中性粒细胞浸润和心肌梗死面积,改善心脏收缩能力;而向 TRPM2 敲除心脏灌注野生型小鼠中性粒细胞显著增加了心肌梗死面积。这些结果提示,中性粒细胞上 TRPM2 的激活加重了心肌缺血再灌注损伤。而 TRPM2 通道激活可以促进 NETs 形成,提示在心肌缺血再灌注过程中,氧化应激等刺激激活中性粒细胞上 TRPM2,可能促进大量 NETs 形成,造成额外的心肌损伤。

3.2.2 TRPV 通道 TRPV 通道是主要对 Ca^{2+} 通透的非选择性阳离子通道,几乎表达于所有细胞类型^[36]。其中 TRPV4 在人和小鼠中性粒细胞中均有表达^[37]。本课题组使用全细胞膜片钳在小鼠骨髓中性粒细胞膜上发现了 TRPV4 特异性激动剂 GSK101 诱导的外向和内向电流,并发现中性粒细胞上 TRPV4 可诱导 Ca^{2+} 流入,参与中性粒细胞迁移、趋化及 ROS 产生等过程,这与其他研究结果一致^[38]。由此,推测中性粒细胞存在 TRPV4 的功能性表达,参与中性粒细胞多种生物学过程。

既往和目前的实验均发现中性粒细胞上 TRPV4 介导 NETs 形成^[39]。分离小鼠骨髓中性粒细胞并给予 GSK101 刺激,发现 GSK101 诱导的 NETs 水平随浓度的增加(100、300、500 nmol/L)而逐渐升高;GSK101 在刺激中性粒细胞后 NETs 水平逐渐增加,与对照组相比,150 min 时 NETs 水平升高有显著性差异,180 min 时基本到达最高水平。随后探究 TRPV4 介导 NETs 形成的具体机制,首先利用 ROS 清除剂 NAC、NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 及线粒体 ROS 抑制剂 MitoQ 预处理中性粒细胞,结果发现,抑制 ROS 产生显著减少了 GSK101 介导的 NETs 形成。值得注意的是,DPI 抑制 NETs 的效应远大于 MitoQ,提示 TRPV4 主要通过 NOX 依赖性途径介导 NETs 形成,也可以通过 NOX 非依赖性途径介导少量 NETs 形成。利用信号分子抑制剂处理中性粒细胞,发现抑制 P38 和 PKC 可以显著减少 GSK101 诱导的 NETs 形成。另外,GSK101 诱导早期大量胞质 ROS 释放和后期线粒体 ROS 产生,抑制 P38 可以显著减少 GSK101 诱导的胞质 ROS 水平,而抑制 PKC 可以减少 GSK101 诱导的胞质 ROS 和线粒体 ROS 水平。以上这些结果提示,中性粒细胞上 TRPV4 活化主要通过激活 P38 和 PKC,促进胞质 ROS 释放,介导 NOX 依赖性 NETs 形成;并且,在中性粒细胞活化后期,TRPV4 也可能通过激活 PKC 促进线粒体 ROS 产生,介导 NOX 非依赖性 NETs 形成。

值得注意的是,心肌缺血再灌注后心脏组织 TRPV4 表达水平显著升高,激活 TRPV4 可导致心肌细胞凋亡坏死;而阻断 TRPV4 可显著减轻心肌梗死面积^[40-41]。本课题组进一步发现,向小鼠离体缺血后心脏中灌注野生型小鼠中性粒细胞加重了再灌注后心肌梗死面积,而灌注 TRPV4 敲除中性粒细胞则没有这种效应,提示中性粒细胞上 TRPV4 加重心肌缺血再灌注损伤。中性粒细胞上 TRPV4 活化是否通过诱导 NETs 形成加重心肌缺血再灌注损伤还需要进一步探究。

3.3 P2X 受体

P2X 受体是 ATP 门控的非选择性阳离子通道,对 Na^{+} 、 K^{+} 和 Ca^{2+} 通透,包括 7 个亚家族(P2X 1~7),其中中性粒细胞上 P2X1 和 P2X7 参与 NETs 形成等多种生物学过程。

3.3.1 P2X1 中性粒细胞上存在 P2X1 的功能性表达。Lecut 等^[42] 采用全细胞膜片钳技术检测到中性粒细胞上 P2X1 激动剂 $\alpha\beta\text{MeATP}$ 诱导的以快速脱敏为动力学特征的向内电流,并检测到 P2X1 mRNA 和蛋白水平的表达。 $\alpha\beta\text{MeATP}$ 增强中性粒细胞迁移能力并促进其向 fMLP 的趋化;而 P2X1 抑制剂 NF279 显著抑制了 LPS 诱导的中性

粒细胞趋化、脱颗粒和吞噬作用,提示 P2X1 参与调控中性粒细胞多种生物学过程^[43-44]。

P2X1 参与 NETs 形成。Alarcón 等^[45]发现 P2X1 特异性阻断剂 NF449 可以显著减少 PAF 诱导的牛中性粒细胞 NETs 形成。Quiroga 等^[46]发现 NF449 不仅可以抑制 PAF 诱导的 NETs 形成,还抑制 PAF 诱导的线粒体超极化,提示线粒体代谢可能与 P2X1 介导的 NETs 释放密切相关。抑制或敲除 P2X1 促进了中性粒细胞 ROS 产生,这与 NETs 形成的趋势不一致,提示 P2X1 介导的 NETs 形成可能与 NOX 依赖或非 NOX 依赖性途径无关^[47]。

P2X1 介导的 NETs 形成参与缺血再灌注损伤。Zhuang 等^[48]在小鼠肾脏缺血再灌注模型中发现,缺血再灌注后肾脏组织 P2X1 蛋白表达水平上调,NETs 形成增加。而阻断 P2X1 后 NETs 形成减少,肾脏缺血再灌注损伤的程度减轻。但 P2X1 参与 NETs 发生的具体作用机制还有待研究,并需要在心肌缺血再灌注损伤模型和中性粒细胞上进一步验证。

3.3.2 P2X7 中性粒细胞上存在 P2X7 的功能性表达。Suh 等^[49]发现 P2X7 激动剂 BzATP 诱导的人中性粒细胞质膜快速去极化,并在 mRNA 和蛋白水平检测到中性粒细胞上 P2X7 的表达。另外,BzATP 促进中性粒细胞 ROS 产生。

研究发现 P2X7 在 NETs 形成中也发挥一定作用。Kim 等^[50]发现,BzATP 增加中性粒细胞上 PAD4 和 CitH3 蛋白表达,及 dsDNA 的释放;P2X7 抑制剂 A438079 可以显著抑制上述反应;在在体实验中进一步发现,向大鼠静脉注射 BzATP 显著增加了外周血中性粒细胞 PAD4 和 CitH3 蛋白表达水平。这些结果提示 P2X7 活化促进了 NETs 形成。该团队发现,BzATP 可以增加中性粒细胞胞内 Ca^{2+} 水平和 p-PKC α 的表达水平,给予 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM 预处理可以显著降低 BzATP 诱导的中性粒细胞胞内 Ca^{2+} 水平、p-PKC α 和 CitH3 蛋白表达水平,且 PKC 抑制剂 G66983 也显著抑制了 BzATP 诱导的 NETs 形成,提示 P2X7 介导的 NETs 形成需要胞内 Ca^{2+} 和 PKC 的参与。与 BzATP 一样,ATP 也促进中性粒细胞发生以上反应,并可以被 A438079 所抑制,提示 ATP 可以激活 P2X7 促进 NETs 形成。另外,ATP 增加中性粒细胞胞质 ROS 和 NOX 亚基表达水平;ROS 清除剂 Trolox 和 NOX 抑制剂 apocynin 均显著减少中性粒细胞 PAD4 和 CitH3 蛋白表达及 NE-DNA 释放水平;而 A438079 可以显著抑制 ATP 诱导的胞质 ROS 释放,提示 ATP 介导 P2X7 激活参与 NOX 依赖性 NETs 形成。这些结果提示活化的 P2X7 增加中性粒细胞胞内 Ca^{2+} 水平,通

过促进 PKC α 活化和胞质 ROS 产生,促进 NOX 依赖性 NETs 的形成。

P2X7 介导的 NETs 可能在缺血再灌注中起到重要作用。Kim 等^[50]向脑缺血再灌注后大鼠静脉注射 BzATP 显著增加了脑组织 PAD4 和 CitH3 蛋白表达水平,提示 P2X7 介导脑缺血过程中 NETs 的形成。Granado 等^[51]在心肌缺血再灌注大鼠中发现心脏组织 P2X7 的 mRNA 和蛋白表达水平上调,使用特异性 P2X7 受体拮抗剂 Brilliant Blue 可以显著减轻心肌缺血再灌注过程中心肌细胞的损伤程度,但其是否介导 NETs 形成加重心肌损伤还需要进一步实验验证。

3.4 CFTR 通道

CFTR 通道是一种 cAMP 调节的 Cl^- 通道,RT-PCR、免疫印迹和免疫荧光结果表明中性粒细胞上存在 CFTR 的表达,且多位于细胞膜和吞噬溶酶体膜上^[52]。目前尚没有电生理结果证实中性粒细胞上 CFTR 通道的活性,但从囊性纤维化(CF)患者外周血获得的 CFTR 功能缺陷中性粒细胞或 CFTRinh-172 抑制的小鼠中性粒细胞中发现异常的脱颗粒反应和杀伤病原体能力受损,提示 CFTR 通道参与中性粒细胞多种生物学活性过程^[53]。

CFTR 通道参与 NETs 的产生。Gray 等^[54]首次发现与健康对照组相比,在培养 6 h 后 CF 患者外周血中性粒细胞的 NETs 释放明显增多。Han 等^[55]发现基因敲除 CFTR 显著诱导小鼠外周血中性粒细胞内 Cl^- 水平增加,血浆 NETs 标志物 MPO、NE 和 dsDNA 水平增多;使用 CFTR 通道阻滞剂 CFTR_{inh}-172 孵育小鼠外周血中性粒细胞后发现,中性粒细胞上 CitH3 蛋白表达水平随 CFTR_{inh}-172 浓度的增加(0.5、1、2.5 和 5 μ mol/L)而逐渐增加。另外,向小鼠体内注射 CFTR_{inh}-172 后获得同样的结果,进一步提示 CFTR 通道在 NETs 形成中的负调控作用。CFTR 调控 NETs 的具体机制与中性粒细胞内 Cl^- 水平和 Cl^- 激酶 SGK1 有关。胞外 Cl^- 浓度增加了人外周血中性粒细胞内 Cl^- 浓度,且 MPO 和 NE 释放水平随胞外 Cl^- 浓度(0、30、70 和 100 mmol/L)增加而逐渐升高;中性粒细胞上 CitH3 蛋白表达水平和 dsDNA 释放水平也随胞外 Cl^- 孵育时间的增加(0.5、1、2 和 4 h)而逐渐增加,提示 CFTR 通道功能缺陷可能导致 Cl^- 流出减少,胞内 Cl^- 水平升高,促进 NETs 形成。另外研究发现,胞外 Cl^- 促进胞质 ROS 和线粒体 ROS 形成;在 IB3-1 细胞(CFTR 基因缺陷细胞系)上也发现更高的胞质 ROS 和线粒体 ROS 水平;而给予 ROS 清除剂 NAC 显著抑制 Cl^- 诱导的 NETs 形成^[56]。这些结果提示 CFTR 通道功能缺陷可能导致升高胞内 Cl^- 水平,诱导 ROS 的大量释放,从而促进 NETs 形成。但

CFTR 通道功能缺陷是通过 NOX 依赖或非依赖途径介导 NETs 形成还需要 NOX 和线粒体 ROS 特异性抑制剂来进一步验证。此外, Han 等^[57] 还在敲除 CFTR 的中性粒细胞及 Cl⁻ 诱导的中性粒细胞中发现 SGK1 磷酸化水平的上调; 并且 SGK1 抑制剂 GSK650394 显著降低 Cl⁻ 诱导的胞质 ROS 和线粒体 ROS。提示 CFTR 功能缺陷诱导胞内 Cl⁻ 水平升高, 激活 SGK1, 通过促进 ROS 产生, 可能在 NOX 依赖或非依赖性 NETs 形成中发挥重要作用。

CFTR 通道在心肌梗死过程中调控 NETs 形成。值得注意的是, 动脉粥样硬化性心脏病(包括稳定型心绞痛和急性冠状动脉综合征伴 ST 抬高)患者中性粒细胞中的 CFTR 蛋白表达明显降低, 伴随血浆 dsDNA、MPO 和 NE 水平以及中性粒细胞 CitH3 蛋白表达水平显著增加。由此可见 CFTR 通道参与心肌梗死过程中 NETs 的形成。研究 CFTR 通道将为 NETs 形成在心肌梗死中的影响提供新的思路和治疗靶点。

4 存在的问题

目前关于中性粒细胞上离子通道参与 NETs

形成的研究多来自小鼠骨髓或腹腔中性粒细胞和人外周血中性粒细胞, 大部分都缺乏在体动物模型的验证; 并且中性粒细胞上 P2X1、CFTR 等离子通道参与 NETs 形成的具体途径尚不清楚, 其是否通过 AKT、PKC 等激酶活化调控 NETs 形成还需要更深入的研究。另外, 离子通道介导的 NETs 形成在心肌梗死过程中的作用还需要在动物模型中进一步研究。

5 总结与展望

在心肌梗死过程中, 异常增多的 NETs 可能会造成心肌结构和功能异常, 导致心律失常等不良心血管事件的发生; 消除 NETs 可减少心肌梗死面积、不良室重塑和心律失常的发生。目前已发现心肌缺血过程中 SK、TRP、P2X 受体、CFTR 等通道的活化参与了 NETs 形成的调节(图 1)。因此, 通过靶向离子通道调控 NETs 生成, 减轻心肌梗死后心肌损伤程度, 改善心律失常、室重塑等不良预后, 可能为 NETs 相关心肌损伤的治疗策略提供新的思路。

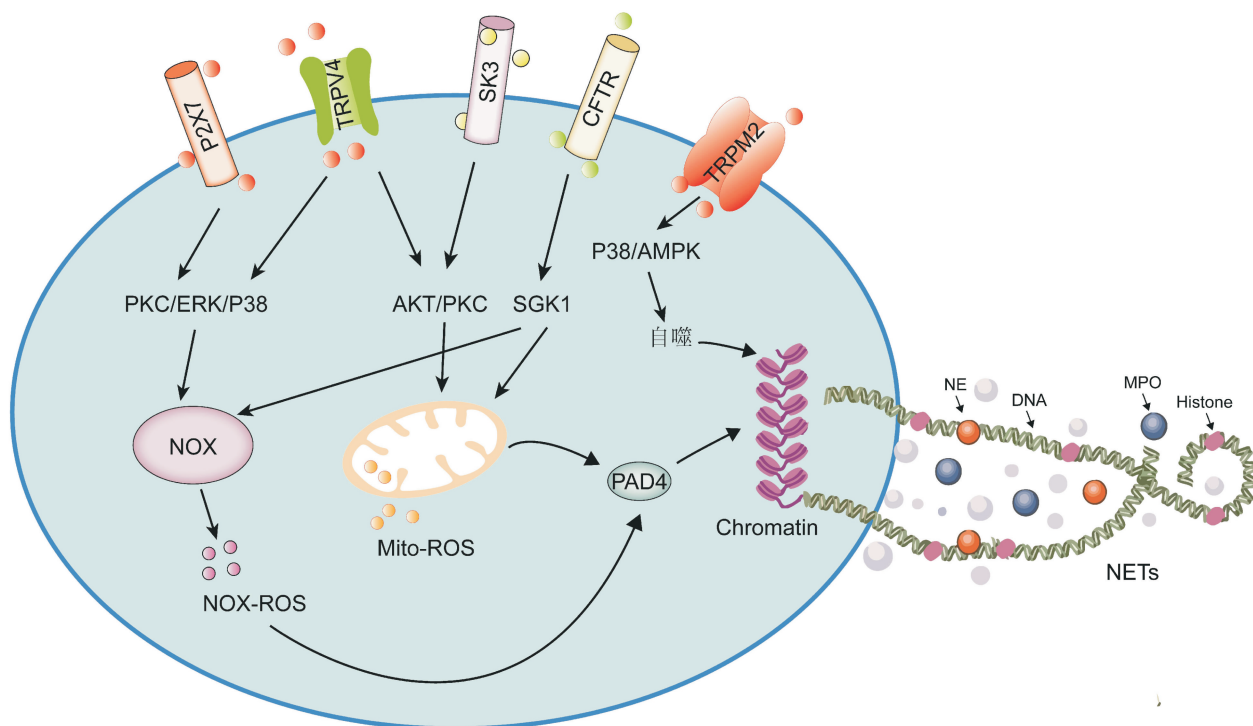


图 1 离子通道参与 NETs 形成的作用和机制

Figure 1 The role and mechanism of ion channels on the formation of NETs

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99 (2): 1223-1248.
- [2] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5663):1532-1532.
- [3] Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic pro-

- tein complex involved in host defense against *Candida albicans*[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(10): e1000639.
- [4] Sorvillo N, Cherpokova D, Martinod K, et al. Extracellular DNA NET-Works With Dire Consequences for Health[J]. *Circ Res*, 2019, 125(4): 470-488.
- [5] 喻珮, 徐承义, 宋丹. 急性心肌梗死后心脏损伤修复的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2023, 39(7): 558-562.
- [6] Eghbalzadeh K, Georgi L, Louis T, et al. Compromised Anti-inflammatory Action of Neutrophil Extracellular Traps in PAD4-Deficient Mice Contributes to Aggravated Acute Inflammation After Myocardial Infarction[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2313.
- [7] Immler R, Simon SI, Sperandio M. Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function[J]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48(Suppl 2): e12964.
- [8] Doua DN, Khan MA, Grasemann H, et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(9): 2817-2822.
- [9] Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 365.
- [10] Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, et al. Cellular Mechanisms of NETosis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36: 191-218.
- [11] Skendros P, Mitroulis I, Ritis K. Autophagy in Neutrophils; From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 109.
- [12] Helseth R, Shetelig C, Andersen GØ, et al. Neutrophil Extracellular Trap Components Associate with Infarct Size, Ventricular Function, and Clinical Outcome in STEMI[J]. *Mediators Inflamm*, 2019: 7816491.
- [13] Du M, Yang W, Schull S, et al. Inhibition of peptidyl arginine deiminase-4 protects against myocardial infarction induced cardiac dysfunction[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106055.
- [14] Vogel B, Shinagawa H, Hofmann U, et al. Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(2): 15.
- [15] Chen C, Zhang H, Xie R, et al. Gut microbiota aggravate cardiac ischemia-reperfusion injury via regulating the formation of neutrophils extracellular traps[J]. *Life Sci*, 2022, 303: 120670.
- [16] Abrams ST, Zhang N, Dart C, et al. Human CRP defends against the toxicity of circulating histones[J]. *J Immunol*, 2013, 191(5): 2495-2502.
- [17] Friggeri A, Banerjee S, Xie N, et al. Extracellular histones inhibit efferocytosis[J]. *Mol Med*, 2012, 18(1): 825-833.
- [18] Li YW, Chen SX, Yang Y, et al. Colchicine Inhibits NETs and Alleviates Cardiac Remodeling after Acute Myocardial Infarction [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2024, 38(1): 31-41.
- [19] Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts[J]. *J Pathol*, 2014, 233(3): 294-307.
- [20] Hofbauer TM, Mangold A, Scherz T, et al. Neutrophil extracellular traps and fibrocytes in ST-segment elevation myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(5): 33.
- [21] Zhang Z, Ding S, Wang Z, et al. Prmt1 upregulated by Hdc deficiency aggravates acute myocardial infarction via NETosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 1840-1855.
- [22] Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling[J]. *Circ Res*, 2017, 121(1): 56-70.
- [23] Rudolph V, Andrié RP, Rudolph TK, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 470-474.
- [24] Krause KH, Welsh MJ. Voltage-dependent and Ca²⁺(+)-activated ion channels in human neutrophils[J]. *J Clin Invest*, 1990, 85(2): 491-498.
- [25] Fay AJ, Qian X, Jan YN, et al. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(46): 17548-17553.
- [26] Mazzoleni V, Zimmermann K, Smirnova A, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin triggers an alternative NETosis process targeting mitochondria[J]. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21167.
- [27] Tackenberg H, Möller S, Filippi MD, et al. The Small GTPase Cdc42 Negatively Regulates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps by Engaging Mitochondria[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 564720.
- [28] Hundahl LA, Sattler SM, Skibsbjerg L, et al. Pharmacological blockade of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by ICA reduces arrhythmic load in rats with acute myocardial infarction [J]. *Pflügers Arch*, 2017, 469(5-6): 739-750.
- [29] Takahashi M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, et al. SK channel blockade prevents hypoxia-induced ventricular arrhythmias through inhibition of Ca²⁺/voltage uncoupling in hypertrophied hearts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 320(4): H1456-H1469.
- [30] Najder K, Musset B, Lindemann O, et al. The function of TRP channels in neutrophil granulocytes [J]. *Pflügers Arch*, 2018, 470(7): 1017-1033.
- [31] Massullo P, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, et al. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17(6): 654-666.
- [32] Qian X, Zhao H, Chen X, et al. Disruption of transient

- receptor potential melastatin 2 decreases elastase release and bacterial clearance in neutrophils[J]. *Innate Immun*, 2018, 24(2):122-130.
- [33] Chauhan A, Sharma A, Tripathi JK, et al. Helminth derived factors inhibit neutrophil extracellular trap formation and inflammation in bacterial peritonitis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):12718.
- [34] Tripathi JK, Sharma A, Sukumaran P, et al. Oxidant sensor cation channel TRPM2 regulates neutrophil extracellular trap formation and protects against pneumoseptic bacterial infection[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12):fj201800605.
- [35] Hiroi T, Wajima T, Negoro T, et al. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 97(2):271-281.
- [36] Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine [J]. *Pharmacol Rev*, 2014, 66(3):676-814.
- [37] Parenti A, De Logu F, Geppetti P, et al. What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(6):953-969.
- [38] Yin J, Michalick L, Tang C, et al. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(3):370-383.
- [39] 卢凯. TRPV4 调节中性粒细胞活化介导心肌缺血再灌注损伤机制的初步研究 [D]. 华中科技大学, 2023.
- [40] 王斌斌, 吴琼峰, 廖杰, 等. TRPV4 通道与缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2018, 34(7):636-639.
- [41] Wu QF, Qian C, Zhao N, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 involves in hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5):e2828.
- [42] Lecut C, Frederix K, Johnson DM, et al. P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation [J]. *J Immunol*, 2009, 183(4):2801-2809.
- [43] Wang X, Chen D. Purinergic Regulation of Neutrophil Function [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:399.
- [44] Wang X, Qin W, Xu X, et al. Endotoxin-induced autocrine ATP signaling inhibits neutrophil chemotaxis through enhancing myosin light chain phosphorylation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(17):4483-4488.
- [45] Alarcón P, Manosalva C, Quiroga J, et al. Oleic and Linoleic Acids Induce the Release of Neutrophil Extracellular Traps via Pannexin 1-Dependent ATP Release and P2X1 Receptor Activation [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7:260.
- [46] Quiroga J, Alarcón P, Manosalva C, et al. Mitochondria-derived ATP participates in the formation of neutrophil extracellular traps induced by platelet-activating factor through purinergic signaling in cows [J]. *Dev Comp Immunol*, 2020, 113:103768.
- [47] Lecut C, Faccineto C, Delierneux C, et al. ATP-gated P2X1 ion channels protect against endotoxemia by dampening neutrophil activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(3):453-465.
- [48] Zhuang S, Xia S, Huang P, et al. Targeting P2RX1 alleviates renal ischemia/reperfusion injury by preserving mitochondrial dynamics [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170:105712.
- [49] Suh BC, Kim JS, Namgung U, et al. P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils [J]. *J Immunol*, 2001, 166(11):6754-6763.
- [50] Kim SW, Davaanyam D, Seol SI, et al. Adenosine Triphosphate Accumulated Following Cerebral Ischemia Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7668.
- [51] Granado M, Amor S, Montoya JJ, et al. Altered expression of P2Y2 and P2X7 purinergic receptors in the isolated rat heart mediates ischemia-reperfusion injury [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 73:96-103.
- [52] Painter RG, Valentine VG, Lanson NA Jr, et al. CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(34):10260-10269.
- [53] Pohl K, Hayes E, Keenan J, et al. A neutrophil intrinsic impairment affecting Rab27a and degranulation in cystic fibrosis is corrected by CFTR potentiator therapy [J]. *Blood*, 2014, 124(7):999-1009.
- [54] Gray RD, Hardisty G, Regan KH, et al. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis [J]. *Thorax*, 2018, 73(2):134-144.
- [55] Han H, Liu C, Li M, et al. Increased intracellular Cl⁻ concentration mediates neutrophil extracellular traps formation in atherosclerotic cardiovascular diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(11):2848-2861.
- [56] Clazure M, Valdivieso AG, Massip Copiz MM, et al. Disruption of interleukin-1 β autocrine signaling rescues complex I activity and improves ROS levels in immortalized epithelial cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99257.
- [57] Clazure M, Valdivieso ÁG, Dugour AV, et al. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) and caspase 1 (CASP1) modulation by intracellular Cl⁻ concentration [J]. *Immunology*, 2021, 163(4):493-511.