

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.03.008
文章编号: 1005-8982 (2025) 03-0045-10

综述

中性粒细胞自我牺牲在急性肺损伤中的作用*

朱紫陌, 崔白梅, 陈怡丹, 王文静, 李秀芳
(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 细胞是构成生命体的基本单位, 生物体由于衰老或受到损伤造成细胞死亡。细胞死亡根据其形态可分为凋亡、坏死性凋亡、铁死亡、焦亡、胞外诱捕网、自噬及铜死亡等类型。急性肺损伤是临床常见危重症, 发生时常伴随着免疫细胞的激活和死亡。中性粒细胞作为急性肺损伤发展进程中最重要的效应细胞之一, 在响应急性肺损伤病理生理过程中发挥着重要的作用。该文结合生物信息学方法深入了解中性粒细胞在急性肺损伤发展中的死亡方式及病理学意义, 对阻止其进一步发展为急性呼吸窘迫综合征提供参考。

关键词: 急性肺损伤; 免疫细胞; 细胞死亡; 中性粒细胞

中图分类号: R563

文献标识码: A

The role of neutrophils self-sacrifice in the acute lung injury*

Zhu Zi-mo, Cui Bai-mei, Chen Yi-dan, Wang Wen-jing, Li Xiu-fang
(School of Traditional Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine,
Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: Cells are the fundamental units that constitute living organisms, and they can die due to aging or damage. Cell death can be classified into various types based on its morphology, including apoptosis, necroptosis, ferroptosis, pyroptosis, extracellular trappings, autophagy and cuproptosis. In clinical practice, acute lung injury (ALI) often occurs in critical cases and is frequently accompanied by the activation and death of immune cells. Neutrophils as one of the most important effector cells in the development process of ALI, play a significant role in responding to the pathophysiological process of ALI. This article employs bioinformatics methods to gain a deeper understanding of the mode of neutrophils death and its pathological significance in the development, providing references for preventing its further progression into acute respiratory distress syndrome (ARDS).

Keywords: acute lung injury; immune cells; cell death; neutrophils

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指由于肺内外各种致伤因素导致肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤, 出现进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为特征的机体过度炎症反应综合征, 可发展为严重的急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]。ARDS 具有高发病率与高病死率的特点, 在全球范围内, ARDS 患者占重症

监护病房入院人数的 10%, 病死率为 30% ~ 40%。急性肺损伤的病理过程非常复杂, 目前仍是医学领域的一大挑战^[2]。

近年来研究发现, 中性粒细胞作为 ALI 发展进程中最重要的效应细胞之一, 可通过凋亡 (Apoptosis)、坏死性凋亡 (Necroptosis)、铁死亡 (Ferroptosis) 及胞外诱捕网 (neutrophil extracellular

收稿日期: 2024-08-23

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 82360803); 云南省科技厅中医联合专项重大项目 (No: 202001AZ070001-001); 云南省科技厅计划项目 (No: 202305AC160043); 云南省宋少江专家工作站 (No: 202305AF150030); 云南省教育厅项目 (No: 2024Y358)

[通信作者] 李秀芳, E-mail: sofinelxf@163.com; Tel: 13908856005

trappings, NETs)等自我牺牲的方式发挥对机体的保护或加重损伤的作用^[3]。本文对中性粒细胞在ALI过程中不同的死亡方式对疾病发生发展的作用进行探讨。

1 凋亡

ALI发展期间,肺泡内稳态失调,炎症爆发,毛细血管通透性增加导致间质和肺泡水肿。免疫系统通过产生细胞因子、趋化因子和干扰素来促进吞噬细胞的募集,大量的中性粒细胞和巨噬细胞在肺部快速积累,以消除致病刺激或病原体^[4]。发挥吞噬作用的中性粒细胞通过主动的程序性死亡形式-凋亡而死亡,此时中性粒细胞体积缩小、与周围的细胞脱离、核质浓缩、核膜核仁破碎、细胞质密度增加,线粒体膜通透性改变,释放细胞色素C(Cytochrome c, Cyt c)到胞浆,胞膜结构完整有小泡状形成,并产生凋亡小体。

中性粒细胞凋亡受到内源性和外源性途径的调控^[5]。内源性凋亡途径主要由毒性物质或脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)损伤引起细胞内稳态失衡而触发,其特征为线粒体外膜渗透(mitochondrial outer membrane permeation, MOMP),因此也称为线粒体凋亡途径,MOMP导致Cyt c释放到细胞质中,继而诱导线粒体凋亡^[6]。MOMP受到B淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)家族的调控,此家族分为两个成员,促凋亡蛋白[如Bcl-2关联X蛋白(Bcl-2 associated x protein, Bax)、Bcl-2拮抗因子(Bcl-2 antagonistic factor, Bak)、BH3结合域死亡拮抗因子(BH3-interacting domain death agonist, Bid)]和抗凋亡蛋白[如Bcl-2、Bcl-XL、髓性细胞白血病-1(Myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)]。当促凋亡蛋白被激活或抗凋亡蛋白被抑制时,均可导致MOMP,然后Cyt c被释放至细胞质中与凋亡肽酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, APAF-1)的单体结合,形成凋亡小体,继而激活凋亡引发含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(cystine aspartate specific proteinase-9, Caspase-9)切割Caspase-3和pro-Caspase-7,执行凋亡功能。Caspase-3的激活可受到整合素关联蛋白(integrin-associated protein, IAP)家族的成员IAP1/2和X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)的抑制,此过程可

被线粒体衍生的第二Caspases激活剂(second mitochondria-derived activator of caspases, SMAC)所阻断。

与内源性途径不同的是,外源性凋亡途径主要通过质膜上的死亡受体(death receptor, DR)别细胞外信号而激活启动,也称为死亡受体介导的凋亡^[7]。DR包括肿瘤坏死因子受体1/2(tumor necrosis factor receptor 1/2, TNFR1/2)、CD95受体(Fas)及TNF相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)。当这些受体与其相应的配体结合时,可募集适配器蛋白并激活凋亡触发因子Caspase-8/10,形成死亡诱导信号复合体诱导细胞凋亡。研究发现,检查点激酶2(checkpoint kinase 2, Chk2)介导的早幼粒细胞白血病蛋白(promyelocytic leukemia, PML)磷酸化直接作用于DNA损伤后肿瘤蛋白p53独立的凋亡信号通路。由磷酸化的受体相互作用丝氨酸苏氨酸激酶1(receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)、Fas介导的死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)和Caspase-8组成的复合体可激活效应体Caspase-3/7促进FADD-Caspase-8依赖的细胞凋亡。凋亡小体及内质网(endoplasmic reticulum, ER)也参与了凋亡细胞过程:ER内蛋白质的冗余积累和钙稳态的紊乱可引发ER应激,Caspase-12表达的同时将细胞质Caspase-7转运到ER膜随之引发细胞凋亡。内源性凋亡和外源性凋亡具有共同的通路效应分子Caspase-3/7,Caspase-3/7都位于Caspase级联的末端,对细胞凋亡发挥着至关重要的作用。Caspase-3/7的激活导致细胞凋亡的形态学特征,一旦被激活,Caspase-3/7介导细胞凋亡的多个步骤。在凋亡执行的最后一步,质膜起泡需要Caspase-3的激活,此外,Caspase-3/7通过蛋白水解将Caspase-2/6/8/10裂解为活性形式,进一步放大凋亡信号。

最终凋亡性中性粒细胞通过释放“寻找我(Find me)”信号和“吃了我(Eat me)”信号,被巨噬细胞快速识别、吞噬和清除,从而触发抗炎细胞因子的产生,促进炎症的消退^[8]。凋亡性中性粒细胞的及时清除可以防止进一步炎症的级联反应,也有助于清除已被这些中性粒细胞吞噬但未清除的病原体。研究发现,促进中性粒细胞凋亡可减轻急性期的炎症和组织损伤,在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)造成的

ARDS 中, 促进中性粒细胞凋亡可促进炎症消退, 改善 ARDS^[9]。

将中性粒细胞凋亡在 ALI 中的作用进行生物信息学分析: 使用 GeneCards 数据库, 中性粒细胞凋亡以 “neutrophil apoptosis” 为关键词, 共得到 14 719 个靶点, ALI 以 “acute lung injury” 为关键词, 得到靶点共 8 952 个, 两者共有 7 529 个靶点。将共同靶点进行 KEGG 富集, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果删除人类疾病后展示 P 值最小的前 10 条信号通路。

富集结果显示, ALI 中的中性粒细胞凋亡共涉及 209 条通路, 中性粒细胞凋亡可能主要受到细胞因子-细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、破骨细胞分化 (osteoclast differentiation) 和局部黏附 (focal adhesion) 等信号通路的调节在 ALI 疾病发展过程中发挥作用 (见图 1)。

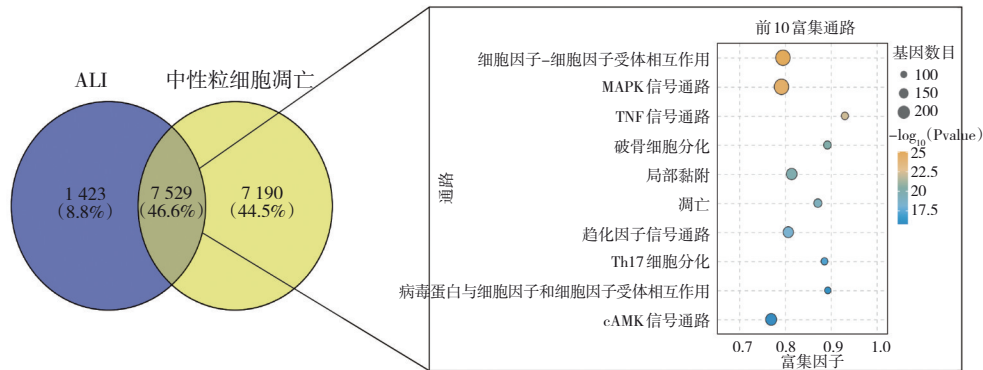


图 1 ALI 中的中性粒细胞凋亡

2 坏死性凋亡

当巨噬细胞的吞噬中性粒细胞的功能受阻时, 中性粒细胞会发生坏死性凋亡^[10], 与凋亡不同, 坏死性凋亡的发生往往伴随着炎症因子的释放及组织损伤。此时中性粒细胞线粒体膜渗透, 细胞肿胀, 膜破裂, 并伴随着细胞内容物和促炎因子的释放^[11]。

坏死性凋亡可被 DR、Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 和 Z-DNA 结合蛋白 1 (Z-DNA binding protein 1, ZBP1/DAI) 激活^[12], 并由 RIPK1 介导。RIPK1 在细胞存活、炎症和细胞凋亡中发挥作用, 并被确定为坏死性凋亡的主要参与者。RIPK1 可启动自磷酸化, 进而磷酸化 RIPK3, 两者形成坏死体复合物, 随后激活混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed-lineage kinase domain-like, MLKL), 以促进其寡聚化和向质膜移动, 导致细胞膜破裂并释放损伤相关的分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMP), 例如高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1, HMGB1)、组蛋白、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和线粒体 DNA 等。同时 RIPK1/RIPK3 形成的坏死体复合物还会激活磷酸甘油酸变

位酶 5 (phosphoglycerate mutase 5, PGAM5), 并将其转移到线粒体外膜, 继而激活线粒体动力相关蛋白 (dynamin-related protein 1, DRP1), 导致线粒体裂变。

Caspase-8 是坏死性凋亡的关键抑制剂, 若 Caspase-8 有活性, 则与 RIPK1 和 FADD 形成复合物, 引发细胞凋亡; 当其活性被抑制时, RIPK1 与 RIPK3 可通过其 RIPK 同型相互作用基序 (RIP homotypic interaction motif, RHIM) 结构域与 ZBP1 发生相互作用, 诱发坏死性凋亡^[13]。研究发现 RIPK3 可独立于 RIPK1 激活, 一些 DNA 病毒可激活 ZBP1, 触发 ZBP1/RIPK3/MLKL 介导的坏死性凋亡; 双链 RNA 或 LPS 分别通过激活 TLR3 或 TLR4, 继而活化含有 TIR 结构域的接头 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF) 诱导干扰素 β , 使 RIPK3 磷酸化, 发生坏死性凋亡。

由 TNFR1 激活引起的坏死已被广泛表征。TNFR1 同源三聚化, 形成了复合物 I, 复合物 I 可促进细胞存活、凋亡或坏死凋亡。这一过程依赖于 RIPK1 的募集和泛素化。RIPK1 的泛素化被抑制, 复合物 I 被释放并募集 FADD, 进而形成复合物 II。复合物 II 可以介导 Caspase-8 的激活, 进而激活凋亡

信号通路。RIPK1 和 RIPK3 可通过 RHIM 结构域低聚,形成坏死体。坏死体充当着坏死信号的传导器,MLKL 在 RIPK3 的作用下磷酸化并发生齐聚反应,定位于细胞膜,导致细胞膜破裂,胞内内容物和 DAMPs 大量释放到周围环境中并引起炎症,最终导致细胞坏死性凋亡^[14]。

在坏死性凋亡中,伴随着细胞膜破裂,磷脂和鞘脂参与了细胞膜的组成。参与坏死性凋亡通路的磷脂包括磷脂酰肌醇和心磷脂。磷脂酰肌醇带有负电荷,可与 MLKL 中氨基酸上的正电荷结合,促使 MLKL 向细胞膜募集,进而破坏细胞膜的完整性。MLKL 介导的坏死性凋亡与线粒体功能密切相关,磷酸化的 MLKL 在激活 PGAM5 后,进一步磷酸化和激活 DRP1,介导线粒体断裂和坏死性凋亡。心磷脂-MLKL 相互作用除了增强 MLKL 依赖性膜通透性外,还能使富含心磷脂的线粒体膜透化。鞘脂代谢的核心成分为神经酰胺,短链神经酰胺可诱发坏死性凋亡^[15]。

研究表明^[16],巨噬细胞释放的外泌体可被中性粒细胞吞噬并促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,进一步促进中性粒细胞坏死性凋亡。中性粒细胞坏死性凋亡释放的 DAMPs 诱导免疫激活和细胞因子表达,在炎症的启动和加剧中发挥作

用。DAMPs 释放、免疫细胞活化和死亡诱导细胞因子的释放是坏死性凋亡的侵袭性循环,可能助长炎症反应增强和延长,导致肺部炎症加剧,促进 ALI 的病程发展。因此,抑制中性粒细胞坏死性凋亡可保护由金黄色葡萄球菌引起的肺炎^[17]以及严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的肺炎^[18]。

将中性粒细胞坏死性凋亡在 ALI 中的作用进行生物信息学分析:使用 GeneCards 数据库,中性粒细胞坏死性凋亡以“neutrophil necroptosis”为关键词,共得到 879 个靶点,ALI 以“acute lung injury”为关键词,得到靶点共 8 952 个,两者共有 658 个靶点。将共同靶点进行 KEGG 富集, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,结果删除人类疾病后展示 P 值最小的前 10 条信号通路。富集结果显示,ALI 中的中性粒细胞坏死性凋亡共涉及 155 条通路,中性粒细胞坏死性凋亡可能主要受到 NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、RIG-I 样受体信号通路(RIG-I-like receptor signaling pathway)和 Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)等信号通路的调节在 ALI 疾病发展过程中发挥作用(见图 2)。

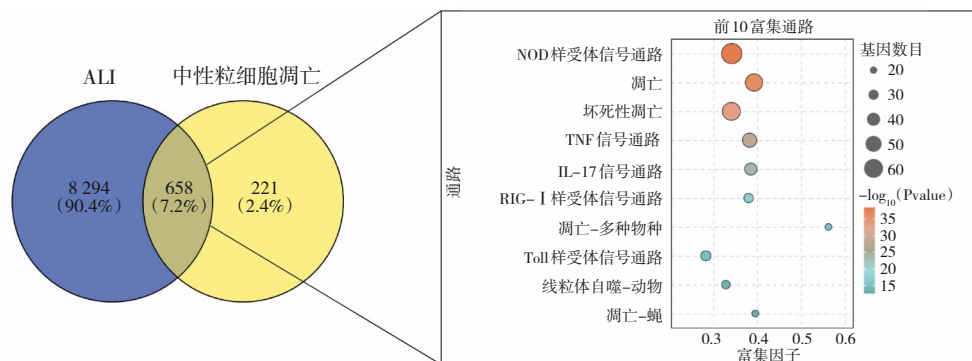


图 2 ALI 中的中性粒细胞坏死性凋亡

3 胞外诱捕网

在中性粒细胞的死亡过程中许多介质可抑制中性粒细胞凋亡,如白细胞介素-8(Interleukin 8, IL-8)、IL-1 和 TNF,从而延长中性粒细胞的存活期。中性粒细胞凋亡的延迟使大量活化的中性粒细胞在肺微血管系统和间质中积聚并长期存在;这些中性粒细胞主要释放几种毒性因子,如 ROS、蛋白酶和中

性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),可导致内皮-上皮屏障的持续破坏^[19]。NETs 是近来新发现的一种网状结构,由自身 DNA 和多种颗粒蛋白组成。该结构可捕获病原体以限制其在体内扩散,后染色质连接的组蛋白和杀微生物蛋白将病原体消除,这一过程属于先天性免疫胞外防御机制。中性粒细胞胞外诱捕网的形成从表面受体

的激活开始,紧接着质膜发生透化,细胞骨架和核膜拆卸,染色质解凝聚,最后抗菌蛋白组装到染色质支架上并释放诱捕网,该程序在几个小时内完成^[20]。

NETs 的形成过程可分为自杀性和非溶解性。自杀性 NETs 涉及细胞形态学变化,依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 诱导的 ROS 产生。当受到刺激时中性粒细胞被激活,内质网运输 Ca²⁺ 至细胞质激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 进一步激活二氢烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸四钠盐 (β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt, NADPH₄), 导致蛋白精氨酸脱氨酶 4 (protein-arginine deiminase type 4, PAD4) 激活和 ROS 的产生。随后激活髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO) 和中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 介导的染色质去稠密化。同时 PAD4 促进组蛋白瓜氨酸化、核解凝和核膜破裂,在 Gasdermin 域跨膜蛋白 D (Gasdermin D, GSDMD) 驱动的膜撕裂下,解凝的染色质和颗粒蛋白排出细胞,最终导致中性粒细胞死亡^[21]。非溶解性 NETs 依赖于 Toll 样受体和补体蛋白的参与,中性粒细胞核膜和细胞核保持完整,细胞不产生 ROS 且不会立即死亡,依然保留活性和吞噬能力,此过程受到微生

物刺激、活化血小板或通过中性粒细胞表面受体的补体蛋白快速释放等因素的影响^[22]。

NETs 的产生被视为进化过程,但装饰 NET-DNA 的抗菌组蛋白和肽对组织具有直接细胞毒性,其紊乱和失调会导致宿主组织的有害炎症、血栓形成、组织损伤和器官功能障碍等^[23]。在 ALI 的发展过程中,抑制 NETs 的形成可促进肺部炎症的消退、减轻肺水肿^[24]以及防止免疫血栓的形成^[25]。

将中性粒细胞胞外诱捕网在 ALI 中的作用进行生物信息学分析:使用 GeneCards 数据库,中性粒细胞胞外诱捕网以“neutrophil extracellular trappings”为关键词,共得到 8 682 个靶点,ALI 以“acute lung injury”为关键词,得到靶点共 8 952 个,二者共有 5 070 个靶点。将共同靶点进行 KEGG 富集, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,结果删除人类疾病后展示 P 值最小的前 10 条信号通路。富集结果显示,ALI 中的中性粒细胞胞外诱捕网共涉及 200 条通路,中性粒细胞胞外诱捕网可能主要受到 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway) 和局部黏附 (Focal adhesion) 等信号通路的调节在 ALI 疾病发展过程中发挥作用 (见图 3)。

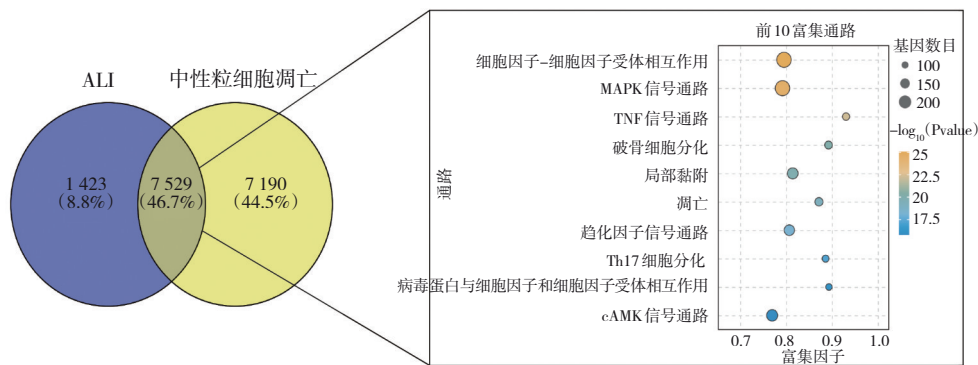


图3 ALI 中的中性粒细胞胞外诱捕网

4 铁死亡

铁死亡是一种区别于凋亡、坏死性凋亡及胞外诱捕网的新型细胞程序性死亡方式,其特征依赖于铁的脂质氢过氧化物积累至致死水平。中性粒细胞发生铁死亡的过程中会产生畸形的小线粒体、

膜浓缩且嵴减少,但细胞核中形态变化不明显。

铁死亡的执行需要谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的耗尽和/或谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的失活,以及可氧化的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 的存在并融入磷脂中。通路可受到 GPX4、脂质过氧化反应和铁

的调节^[26]。GPX4 是哺乳动物细胞中催化磷脂氢过氧化物(phospholipid hydroperoxides, PLOOHs)的主要还原酶。PLOOHs 的积累,可能导致质膜快速产生无法修复的损伤,导致细胞死亡。GSH 不仅是哺乳动物细胞中最丰富的还原剂,还是 GPX4 产生活性所需的首选底物。因此 GSH 的耗竭可直接导致 GPX4 失去活性。GPX4 在其硒半胱氨酸残基及 GSH (或其他低分子硫醇甚至蛋白质硫醇)提供的两个电子催化下将磷脂和胆固醇氢过氧化物还原为相应的醇。研究表明药物在铁死亡中发挥着重要的作用:铁死亡激活剂 erastin 通过抑制胱氨酸-谷氨酸逆向转运蛋白(System xc⁻)的活性从而剥夺细胞的半胱氨酸导致细胞死亡。另一激活剂 RAS 选择性致死化合物 3(RAS selective lethal 3, RSL3),可通过抑制包括 GPX4 在内的大多数硒蛋白,引起 PLOOHs 的积累,诱导铁死亡^[27]。

System xc⁻抑制或 GPX4 失活引起的细胞铁死亡涉及脂质活性氧的铁依赖性积累和 PUFAs 的消耗^[28]。脂质过氧化反应反映了生物膜、脂蛋白和其他含有脂质的分子的氧化损伤。脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)家族通过调节其活性介导脂质过氧化,LOXs 是一种非血红素含铁酶,可催化游离和酯化的 PUFAs 双氧反应,生成各种脂质氢过氧化物。ROS 可以与脂质膜的 PUFA 反应并诱导脂质过氧化。多不饱和脂肪酸磷脂(polyunsaturated fatty acid-phospholipids, PUFA-PLs)是铁死亡中脂质氧化的主要目标,PUFA-PLs 可被酶和非酶途径氧化,参与氧化途径的酶包括酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)和花生四烯酸脂氧合酶(arachidonate lipoxygenase, ALOX)。ACSL4 参与 PUFA-PLs 的生成,而 ALOX 将 PUFA-PLs 氧化为相应的氢过氧化物衍生物,即脂质过氧化物或脂质氧化产物。哺乳动物 ALOX 家族由 6 个成员(ALOX5、ALOX12、ALOX15、ALOXE3、ALOX12B 和 ALOX15B)组成,在铁死亡的诱导中发挥组织或细胞依赖性作用。ACSL4 不仅是导致铁死亡的原因,而且可能是其生物标志物。

脂质过氧化物的积累和铁死亡的执行需要铁的参与^[29]。铁催化磷脂过氧化有关的代谢酶 LOX 和细胞色素 P450 氧化还原酶(cytochrome P450

oxidoreductase, POR)参与 ROS 的产生。PLOOHs 可以与 Fe²⁺和 Fe³⁺发生反应,分别生成自由基 PLO•和 PLOO•,这些自由基与 PUFA-PLs 反应,进一步加速 PLOOH 的生成。参与铁代谢的酶/蛋白质,如转铁蛋白、转铁蛋白受体 1 和运铁素,以及血红素氧合酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)都与死亡过程有关。铁吞噬是一种导致细胞铁存储蛋白降解的自噬过程,可增加细胞不稳定铁池和增加氧自由基形成促进。游离铁以非酶的方式攻击脂质双分子层中的 PUFA 残基,从而促进了脂质过氧化和细胞死亡的过程。铁调节蛋白 1/2(Iron Regulatory Protein 1/2)通过控制细胞铁稳态,也参与了铁死亡的过程^[26]。

细胞铁死亡的发生会刺激一系列炎症细胞因子和 DAMPs 的持续释放,导致细胞抗氧化能力下降、脂质 ROS 的累积并放大器官损伤,肺水肿和肺泡炎症会因铁死亡而加重^[30]。尽管对铁死亡的探索已经蓬勃发展,但对中性粒细胞影响的理解仍处于起步阶段^[31],中性粒细胞铁死亡在 ALI 发展过程的作用还未见报道。

将中性粒细胞铁死亡在 ALI 中的作用进行生物信息学分析:使用 GeneCards 数据库,中性粒细胞铁死亡以“neutrophil ferroptosis”为关键词,共得到 1 330 个靶点,ALI 以“acute lung injury”为关键词,得到靶点共 8 952 个,二者共有 961 个靶点。将共同靶点进行 KEGG 富集, $P < 0.05$ 代表有显著性差异,结果删除人类疾病后展示 P 值最小的前 10 条信号通路。富集结果显示,ALI 中的中性粒细胞铁死亡共涉及 157 条通路,中性粒细胞铁死亡可能主要受到 HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、脂肪炎症细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)、FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)和寿命调节通路(longevity regulating pathway)等信号通路的调节在 ALI 疾病发展过程中发挥作用(见图 4)。

5 凋亡-坏死性凋亡-铁死亡-胞外诱捕网之间的串扰

随着研究的深入,细胞的多种死亡形式已被科学家们发现,细胞的多种死亡形式之间存在着相互串扰及先后顺序。在生理条件下,凋亡性中性粒细胞死亡方式占主导地位,然而某些感染性或炎症刺

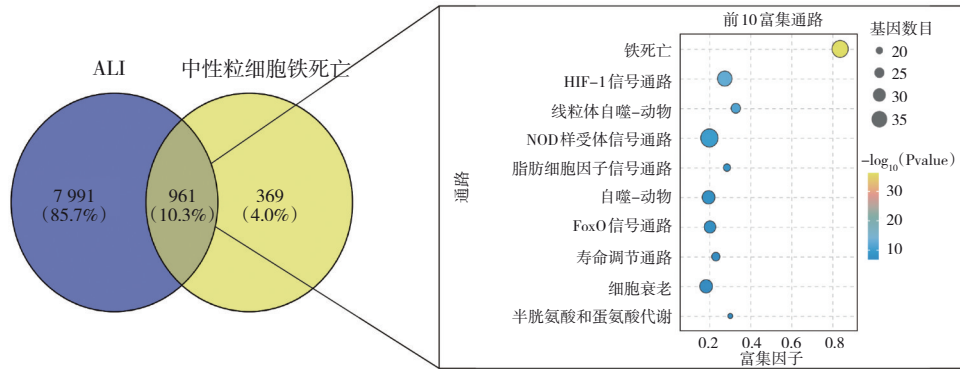


图 4 ALI 中的中性粒细胞铁死亡

激会诱导裂解性中性粒细胞死亡途径,例如坏死性凋亡、铁死亡和 NETs^[31]。坏死性凋亡和凋亡是两种相互排斥的细胞死亡形式,与凋亡不同的是,坏死性凋亡不能导致 DNA 片段化或细胞凋亡样形态变化且坏死性凋亡发生在无法发生细胞凋亡的细胞中,Caspase-8 是其开关。当 Caspase-8 被激活时,主要激活外源性的细胞凋亡,此时 Caspase-8 与 RIPK1 及 FADD 组成复合体以激活效应体 Caspase-3/7 促进 FADD-Caspase-8 依赖的细胞凋亡。复合体可促进 Caspase-8 介导的细胞内蛋白快速裂解,这些细胞内蛋白介导凋亡表型,如催化活性丧失、DNA 片段化、膜起泡和细胞收缩,细胞功能的有序分解。RIPK1 为 Caspase-8 的底物,在 Caspase-8 激活被阻断的情况下,RIPK1 过度激活,RIPK1 在 Ser166 位点启动自磷酸化并磷酸化 RIPK3 (小鼠 RIPK3 磷酸化位点 Thr231 和 Ser232,人类 RIPK3 磷酸化位点 Ser227) 通过 RHIM 相互作用招募 MLKL。随后 MLKL 位点 Ser358 被 RIPK3 磷酸化,破坏质膜引起坏死性凋亡^[32]。此外,热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 被证明处于细胞死亡的十字路口,调控着多种细胞死亡形式。HSP90 可与 Bcl-2 相互作用来减少 Cyt C 的释放,调节 APAF-1 参与凋亡小体的组装以调节内源性细胞凋亡;通过影响细胞 FLICE 样抑制蛋白 (cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP) 的降解来介导外源性的细胞凋亡^[33]。在坏死性凋亡通路中,其关键调节因子 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 是 HSP90 的客户端蛋白^[34]。HSP90 激活会增强 RIPK1 及 RIPK3 的功能并促进坏死性凋亡表型;HSP90 表达增加会导致 MLKL 寡聚化和质膜易位,促进坏死性凋亡的发生。当 HSP90 被抑制时,RIPK1 的稳定性和功能受到影响,细胞死亡转向凋亡表型,HSP90

与其伴侣细胞分裂周期蛋白 37 (cell division cycle 37, CDC37) 解离时,也会促使 RIPK3 发出凋亡信号。同时,HSP90 也调控着细胞铁死亡的发生,伴侣介导的自噬 (chaperone mediated autophagy, CMA) 通过与位于溶酶体中的相关膜蛋白 2A (lysosome-associated membrane protein 2A, Lamp-2a) 和 GPX4-HSC70-HSP90 三聚体相互作用来降解其底物 GPX4。GPX4 蛋白的降解会促进 ROS 和不可逆的脂质过氧化,从而促进细胞铁死亡,因此抑制 HSP90 的激活可以稳定 GPX4,防止细胞铁死亡^[35]。

坏死性凋亡和铁死亡之间的串扰可能是一个新兴研究领域,在疾病的发展过程中,坏死性凋亡和铁死亡可能同时发生以介导组织病理损伤。在铁死亡中,核膜损伤先于细胞质膜损伤诱导,其结构变化主要发生在线粒体中,并以线粒体萎缩为特征;坏死性凋亡的结构变化发生在包括线粒体在内的多个细胞器中。坏死性凋亡及铁死亡的这些变化最终导致细胞膜破裂、线粒体膜电位去极化和线粒体通透性过渡孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放。铁过载导致 MPTP 打开,促进 ROS 的产生,从而加剧 RIPK1 磷酸化并导致坏死性凋亡。此外,HSP90 通过促进 RIPK1 磷酸化和抑制 GPX4 激活,进而增加线粒体 ROS 的水平来促进坏死性凋亡和铁死亡^[36]。

MLKL 为坏死性凋亡的标志物,MLKL 除了介导细胞坏死性凋亡外还介导着 NETs 的形成。RIPK1/RIPK3/MLKL 可激活下游 PAD4,促进细胞质颗粒丢失、核膜分解、染色质解聚、组蛋白高瓜氨酸化和 NETs 的产生,并伴随着 ROS 的释放,该过程由 RIPK1 协调。与 MLKL 介导的 NET 形成过程类似,凋亡刺激可调节 PAD4 诱导凋亡性中性粒细胞中核

DNA 的挤出形成 NETs^[37]。

将 ALI 中的中性粒细胞 4 种死亡形式涉及的路径绘制韦恩图,发现这 4 种中性粒细胞死亡形式在 ALI 中均受到 51 条相同的信号通路调节,将各死亡形式中 *P* 值最小的前 20 信号通路绘制韦恩图,发现这 4 种死亡形式均受到 TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、NOD 样受体相互作用(NOD-like receptor interaction)及 IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)的影响(见图 5)。提示在 ALI 发展过程中,中性粒细胞的死亡形式可能受到相同的信号通路影响。TNF 为 TNF 信号通路中的重要节点,可诱导中性粒细胞的募集和激活,同时在协调哺乳动物的炎症反应中起核心作用,多种 TNF 驱动的炎症性病理损伤是由于过度细胞死亡进而引起不受控制的炎症导致的。TNF 与 TNFR1 结合后形成复合体以调节 Caspase-8 的活性,调控凋亡和坏死性凋亡之间的表型转换;TNF 信号传导可增加中性粒细胞内 NE 的丰度并诱导 NETs 的形成^[38];此外, TNF 信号通路可被 IL-17 激活,导致铁代谢稳态失调,造成细胞铁死亡^[39]。IL-17 为促炎细胞因子,在细胞增殖和细胞凋亡中发挥着重要的作用,可通过诱导趋化因子的产生间接募集中性粒细胞,加剧炎症反应。IL-17 在细胞凋亡的研究中存在相互矛盾的结果,IL-17 可通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/FAS/FASL 通路抑制细胞凋亡^[40],也可通过细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases,

ERK1/2)/p65 信号通路介导细胞凋亡;在坏死性凋亡通路中,RIPK3 抑制剂可降低 CD4⁺ T 细胞中 RIPK3、p-MLKL 和 IL-17 的表达^[41],提示 IL-17 与细胞坏死性凋亡之间存在着一定的联系;研究还发现 IL-17 可促进 NETs 的产生^[42],而 NETs 的主要成分细胞外组蛋白会触发 IL-17/辅助性 T 细胞 17 反应的上调,加剧炎症反应。NOD 样受体是功能多样的细胞内传感器,其核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)是细胞质中重要的免疫识别受体,与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)和 Caspase-1 组成了 NLRP3 炎症小体。大量细胞死亡效应子可以调节 NLRP3 炎症小体的激活,而 NLRP3 炎症小体的激活又可导致细胞死亡并促进炎症反应加剧。在细胞凋亡发生过程中,凋亡效应子 BAX 和 BAK 可通过调节线粒体稳态以激活 NLRP3 炎症小体,BAX 和 BAK 也可激活 Caspase-3 和 Caspase-7,通过诱导 K⁺外排来促进 NLRP3 炎症小体的激活^[43];坏死性凋亡效应子 MLKL 同样也可诱导 K⁺外排激活 NLRP3 炎症小体^[44],其另一效应子 RIPK3 可诱导线粒体 ROS (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)的产生,进而触发 mtROS-AKT 信号通路的激活进而激活 NLRP3 炎症小体,同时,mtROS 诱导 NLRP3 炎症小体的激活可导致 GPX4 的活性降低造成细胞铁死亡^[45];在 NLRP3 炎症小体的激活过程中会产生副产物,例如 IL-18 和 IL-1 β ,以诱导 NETs 的形成^[46]。

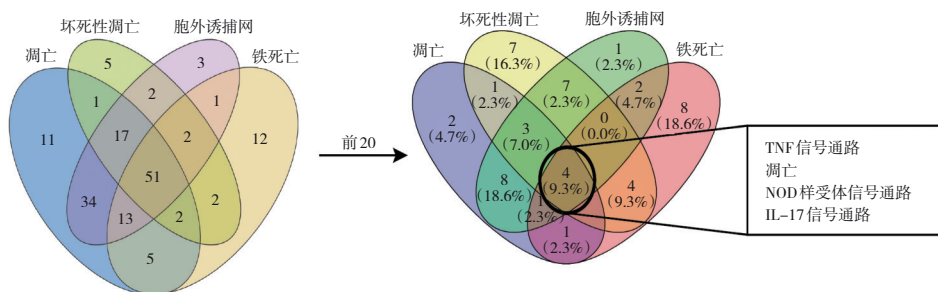


图 5 ALI 中的中性粒细胞死亡

6 总结与展望

2018 年 Cell Death Differ 将细胞死亡细分成了坏死性凋亡、铁死亡、焦亡、依赖性细胞死亡、自噬

依赖性细胞死亡、免疫原性细胞死亡、溶酶体依赖性细胞死亡、线粒体通透性转变驱动细胞坏死等 12 种类型^[47]。细胞死亡在疾病的发生发展过程中扮演着重要的角色。在 ALI 的发生发展过程中,

中性粒细胞通过不同的牺牲方式发挥着保护或加重损伤的双重作用。中性粒细胞发生坏死性凋亡、NETs及铁死亡均会加快疾病的发生发展进程,而中性粒细胞及时发生凋亡则能防止疾病发展及组织损伤,因此可针对其死亡节点的分子开关,采用药物调控其死亡表型向凋亡转变,令发挥完吞噬作用的中性粒细胞及时发生凋亡以被快速清除,或者抑制裂解性死亡方式的发展进程。目前临床对ALI的治疗尚无特效药物,疾病的进一步发展是导致重症监护病房病人死亡的重要原因,深入了解中性粒细胞在ALI发展中的死亡方式及病理学意义,对寻找阻止ALI进一步发展为ARDS的治疗策略和药物具有重要的临床意义。

参 考 文 献 :

- [1] MATTHAY M A, ARABI Y, ARROLIGA A C, et al. A new global definition of acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2024, 209(1): 37-47.
- [2] MATTHAY M A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, et al. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18.
- [3] WEN X Y, XIE B, YUAN S Y, et al. The "self-sacrifice" of ImmuneCells in sepsis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 833479.
- [4] NIRI P, SAHA A, POLOPALLI S, et al. Role of biomarkers and molecular signaling pathways in acute lung injury[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2024, 38(4): 640-657.
- [5] CHRISTGEN S, TWEDELL R E, KANNEGANTI T D. Programming inflammatory cell death for therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 232: 108010.
- [6] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-oh my! The many ways a cell can die[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(4): 167378.
- [7] 武晓, 谷勤勤, 于淼淼, 等. 巴豆生物碱对Lewis小鼠肺腺癌细胞生长和凋亡的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(15): 59-66.
- [8] KOURTZELIS I, HAJISHENGALLIS G, CHAVAKIS T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 553.
- [9] CUI S N, CHEN L, YANG Y Y, et al. Activation of death-associated protein kinase 1 promotes neutrophil apoptosis to accelerate inflammatory resolution in acute respiratory distress syndrome[J]. *Lab Invest*, 2019, 99(8): 1143-1156.
- [10] 牛铃霞. Protectin DX调节中性粒细胞凋亡对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响及其机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021: 72-74.
- [11] de MIGUEL D, RAMIREZ-LABRADA A, URANGA I, et al. Inflammatory cell death induced by cytotoxic lymphocytes: a dangerous but necessary liaison[J]. *FEBS J*, 2022, 289(15): 4398-4415.
- [12] GULLETT J M, TWEDELL R E, KANNEGANTI T D. It's all in the PAN: crosstalk, plasticity, redundancies, switches, and interconnectedness encompassed by PANoptosis underlying the totality of cell death-associated biological effects[J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1495.
- [13] 李娜, 汪哲, 包云丽, 等. 调节性细胞死亡及其靶向治疗在炎症性肠病中的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(5): 51-57.
- [14] MALIREDDI R K S, KESAVARDHANA S, KANNEGANTI T D. ZBP1 and TAK1: master regulators of NLRP3 inflammasome/pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PAN-optosis) [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 406.
- [15] 凌晓颖. 清肺口服液黄酮类成分通过调节坏死性凋亡治疗RSV肺炎的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022: 15-20.
- [16] ZHOU H T, FAN E K, FAN J. Cell-cell interaction mechanisms in acute lung injury[J]. *Shock*, 2021, 55(2): 167-176.
- [17] ZHOU Y, NIU C, MA B, et al. Inhibiting PSM α -induced neutrophil necroptosis protects mice with MRSA pneumonia by blocking the *agr* system[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 362.
- [18] SCHWEIZER T A, MAIRPADY SHAMBAT S, VULIN C, et al. Blunted sFasL signalling exacerbates TNF-driven neutrophil necroptosis in critically ill COVID-19 patients[J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(12): e1357.
- [19] JOHANSSON C, KIRSEBOM F C M. Neutrophils in respiratory viral infections[J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(4): 815-827.
- [20] HIDALGO A, LIBBY P, SOEHNLEIN O, et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(13): 2737-2753.
- [21] SCOZZI D, LIAO F Y, KRUPNICK A S, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 953195.
- [22] BURGNER S S, SCHRODER K. Neutrophil extracellular traps in host defense[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12(7): a037028.
- [23] ISLAM M M, TAKEYAMA N. Role of neutrophil extracellular traps in health and disease pathophysiology: recent insights and advances[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15805.
- [24] ADROVER J M, CARRAU L, DAßLER-PLENKER J, et al. Disulfiram inhibits neutrophil extracellular trap formation and protects rodents from acute lung injury and SARS-CoV-2 infection[J]. *JCI insight*, 2022, 7(5): e157342.
- [25] AL-KURAI SHY H M, AL-GAREEB A I, AL-HUSSANIY H A, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) and covid-19: a new frontiers for therapeutic modality[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 104: 108516.
- [26] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [27] MISHIMA E, CONRAD M. Nutritional and metabolic control of ferroptosis[J]. *Annu Rev Nutr*, 2022, 42: 275-309.

- [28] BAYIR H, ANTHONYMUTHU T S, TYURINA Y Y, et al. Achieving life through death: redox biology of lipid peroxidation in ferroptosis[J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 387-408.
- [29] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175-185.
- [30] MA A J, FENG Z X, LI Y, et al. Ferroptosis-related signature and immune infiltration characterization in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 154.
- [31] TU H Y, REN H Y, JIANG J J, et al. Dying to defend: neutrophil death pathways and their implications in immunity[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(8): e2306457.
- [32] YUAN J Y, OFENGEIM D. A guide to cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(5): 379-395.
- [33] PENG C W, ZHAO F Y, LI H L, et al. HSP90 mediates the connection of multiple programmed cell death in diseases[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 929.
- [34] HU B W, ZHANG S, LIU W J, et al. Inhibiting heat shock protein 90 protects nucleus pulposus-derived stem/progenitor cells from compression-induced necroptosis and apoptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 685.
- [35] LIU Y, ZHOU L, XU Y F, et al. Heat shock proteins and ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 864635.
- [36] ZHENG Y X, HUANG Y B, XU Y H, et al. Ferroptosis, pyroptosis and necroptosis in acute respiratory distress syndrome[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 91.
- [37] ZHU Y F P P, SPEIR M, TAN Z H, et al. NET formation is a default epigenetic program controlled by PAD4 in apoptotic neutrophils[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(51): eadj1397.
- [38] NEUENFELDT F, SCHUMACHER J C, GRIESHABER-BOUYER R, et al. Inflammation induces pro-NETotic neutrophils via TNFR2 signaling[J]. *Cell Rep*, 2022, 39(3): 110710.
- [39] SONG J J, ZHANG H, TONG Y, et al. Molecular mechanism of interleukin-17A regulating airway epithelial cell ferroptosis based on allergic asthma airway inflammation[J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102970.
- [40] SONG Y, YANG M, ZHANG H J, et al. IL-17 affects the progression, metastasis, and recurrence of laryngeal cancer via the inhibition of apoptosis through activation of the PI3K/AKT/FAS/FASL pathways[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 2953191.
- [41] LEE S H, KWON J Y, MOON J, et al. Inhibition of RIPK3 pathway attenuates intestinal inflammation and cell death of inflammatory bowel disease and suppresses necroptosis in peripheral mononuclear cells of ulcerative colitis patients[J]. *Immune Netw*, 2020, 20(2): e16.
- [42] LI G Q, LIU L W, LU T Q, et al. Gut microbiota aggravates neutrophil extracellular traps-induced pancreatic injury in hypertriglyceridemic pancreatitis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6179.
- [43] YU C Q, CHEN P, MIAO L Y, et al. The role of the NLRP3 inflammasome and programmed cell death in acute liver injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3067.
- [44] LEI X Q, CHEN Y Z, LIEN E, et al. MLKL-driven inflammasome activation and caspase-8 mediate inflammatory cell death in influenza A virus infection[J]. *mBio*, 2023, 14(2): e0011023.
- [45] WANG J H, LI Y P, LI L, et al. Effect of NLRP3 gene knockdown on pyroptosis and ferroptosis in diabetic cardiomyopathy injury[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 351.
- [46] KUMAR R, PATIL G, DAYAL S. NLRP3-induced NETosis: a potential therapeutic target for ischemic thrombotic diseases?[J]. *Cells*, 2023, 12(23): 2709.
- [47] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 朱紫陌, 崔白梅, 陈怡丹, 等. 中性粒细胞自我牺牲在急性肺损伤中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2025, 35(3): 45-54.

Cite this article as: ZHU Z M, CUI B M, CHEN Y D, et al. The role of neutrophils self-sacrifice in the acute lung injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(3): 45-54.