

综述

中性粒细胞胞外诱捕网在相关疾病中的作用

程 怡¹, 陈亚琳¹, 相新新^{2*}¹潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053; ²淄博市中心医院转化医学中心, 淄博 255036

摘要: 中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞在受到特殊因素影响后释放到细胞外的一种纤维网状复合物。在病毒、细胞因子、活化血小板、补体、自身抗体等因子的诱导下, 特定的中性粒细胞亚群产生并释放NETs, NETs在体内发挥多种作用, 参与心血管疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病等多种疾病的发展, 也与相关非感染性病理过程如凝血障碍、血栓形成、动脉粥样硬化、血管炎等有密切关系。因而在相关疾病中控制NETs的发生和发展可能是潜在的疾病治疗靶点。该文总结了NETs在代谢性疾病、肿瘤和新型冠状病毒感染等相关疾病中的影响, 探讨了抗NETs药物的临床应用, 以期为临床药物选择和应用提供新思路。

关键词: 中性粒细胞胞外诱捕网; 肿瘤; 新型冠状病毒感染; 非感染性病理过程

Roles of neutrophil extracellular traps in related disease

CHENG Yi¹, CHEN Yalin¹, XIANG Xinxin^{2*}¹Department of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;²Central of Translational Medicine, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, China)

Abstract: Neutrophil extracellular traps (NETs) are a kind of fibrous network complex released by neutrophils outside the cell under the influence of special factors. Under the induction of viruses, cytokines, activated platelets, complement, autoantibodies and other factors, specific neutrophil subsets produce and release NETs, which play a variety of roles in the body and participate in the development of cardiovascular diseases, metabolic diseases, autoimmune diseases and other diseases. It is also closely related to related non-infectious pathological processes such as coagulopathy, thrombosis, atherosclerosis, vasculitis and so on. Therefore, controlling the occurrence and development of NETs in related diseases may be a potential therapeutic target. This paper summarizes the effects of NETs in metabolic diseases, tumors, novel coronavirus infection and other related diseases, discusses the clinical application of anti-NETs drugs, and provides new ideas for clinical drug selection and application.

Key Words: neutrophil extracellular traps; tumor; novel coronavirus infection; non-infectious pathological process

中性粒细胞在非特异性免疫中发挥积极作用, 其中中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)在免疫反应中具有特定的

作用。例如NETs的纤维网状结构可抑制细菌、真菌等病原微生物在组织内的扩散, 并且NETs的相关蛋白及细胞因子能发挥相应灭菌作用; NETs过

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81600695); 山东省重点研发计划项目(2019GSF108269)

第一作者: E-mail: shuangxileng@163.com

*通信作者: E-mail: xiangxinxin@bjmu.edu.cn

度表达和清除障碍则影响着自身免疫性疾病的发展,作为自身抗原的NETs可以破坏机体耐受性,并激活B细胞、T细胞等其他免疫细胞,引起免疫反应^[1]。NETs清除受损使NETs成分在组织存在时间延长,NETs组分介导补体激活进而促进炎症反应的发生。肽基精氨酸脱亚胺酶4(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)是一种钙依赖性酶,当细胞内钙浓度增高时,PAD4的构象改变,继而导致靶蛋白发生瓜氨酸化^[2]。PAD4对NETs形成有重要影响,中性粒细胞受到相关刺激后PAD4被激活,引起细胞内染色质变化并与胞质内的颗粒蛋白结合,这一改变促进NETs形成^[3]。

1 NETs概述

中性粒细胞通过吞噬作用和产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)等方式发挥抗菌作用。Brinkmann等^[4]的研究发现,NETosis是一种异于凋亡和坏死的新方式,在细菌、病毒、真菌等病原体或抗体、各种免疫复合物、多种细胞因子和趋化因子刺激后产生NETs的过程。进一步的研究发现,NETosis有3种模式,分别是自杀式NETosis(suicidal NETosis)、活体式(vital NETosis)和线粒体DNA被释式NETosis(mitochondrial NETosis)。自杀式NETosis能引起核解聚、核膜破裂,进而引起中性粒细胞的死亡。ROS在自杀式NETosis中促进了核膜的破裂,导致瓜氨酸化组蛋白和核DNA一起被释放至细胞外。活体式NETosis的关键点是NADPH酶生成ROS,细胞质内Ca²⁺浓度的改变加速了染色质结构变化过程^[5]。与自杀式NETosis相比,活体式NETosis中无核膜的破裂,并且中性粒细胞仍具有一定的免疫能力。而线粒体DNA被释式NETosis是ROS作用于线粒体并产生NETs的过程。不同的NETosis在体内发挥相应作用,共同维持机体的免疫功能。中性粒细胞在特定刺激下产生NETs,细胞膜破裂后NETs的释放能杀灭部分病原菌^[6],NETs上有弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、组织蛋白酶G、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、IL-37等多种蛋白,这些蛋白在先天性免疫中发挥抗菌作用,可释放多种杀菌物质清除病原微生物,但过量的NETs可引起炎症反应和组织损伤。

2 NETs与相关疾病

2.1 代谢性疾病

糖尿病患者体内的高血糖刺激可诱导中性粒细胞释放NETs。有研究发现,1型糖尿病和2型糖尿病患者中NE、MPO等NETs相关因子表达增加^[7,8]。2型糖尿病患者的基础钙水平明显升高,细胞内钙水平与空腹血糖水平呈正相关,细胞内钙离子水平的变化又与介导NETs产生的PAD4有密切关系^[9]。在糖尿病患者的足部溃疡中观察到NETs组分NE和组蛋白的升高,而且视网膜病变中的弹性蛋白酶等因子也升高。进一步的研究发现,糖尿病小鼠体内的NETs标记物瓜氨酸组蛋白H3表达较高,使用PAD4抑制剂Cl-amidine后糖尿病小鼠体内的NETs标记物的表达有所减少^[10,11]。深入研究发现,应用NADPH氧化酶抑制剂后在高糖状态下的NETs生成减少,因此推测抑制NADPH氧化酶在糖尿病的治疗中有一定的潜力^[12]。这些结果均说明,抑制NETs可能是控制糖尿病发展的重要策略,为糖尿病的治疗提供潜在的研究方向。

痛风的发生机制主要为嘌呤代谢紊乱引起的高尿酸血症使单钠尿酸盐(monosodium urate, MSU)在骨关节、肾脏等组织沉积。研究发现,痛风发病过程中氧化应激使ROS水平升高,ROS进而诱导NETosis过程发生,同时MSU可以激活PAD4介导的染色质解聚,核DNA及蛋白释放于细胞外后发挥作用^[13]。另外MSU-NETs团块能引起大量炎性细胞聚集于晶体周围,这些团块和晶体的聚集最终造成组织损伤等严重后果^[14]。痛风患者中MSU晶体诱导的NETs可以被关节滑液中的巨噬细胞吞噬,但巨噬细胞清除NETs的具体机制仍需进一步深入研究^[15]。因此,NETs在代谢性疾病中的作用对疾病的发展有重要意义,针对NETs的研究是治疗代谢性疾病的潜在靶点。

2.2 肿瘤

NETs在肿瘤的发生、增殖和转移等方面发挥重要作用。肿瘤微环境中的中性粒细胞释放的NETs激活NE-κB信号通路,促进了胶质母细胞瘤分泌白介素-8(interleukin-8, IL-8),IL-8进一步增加中性粒细胞在胶质瘤中的浸润,并引发更多NETs的释放,这种正反馈作用促进神经胶质瘤的

恶性发展^[16]。此外, 弥漫性大B细胞淋巴瘤分泌的IL-8与中性粒细胞受体CXC趋化因子受体2(CXC chemokine receptor 2, CXCR2)相互作用促进NETs的释放, NETs通过激活NE- κ B和p38信号促进肿瘤的发展, 因此抑制IL-8-CXCR2轴则能延缓肿瘤的进展^[17]。而在胰腺肿瘤中IL-17诱导了中性粒细胞的浸润和NETs的释放, 并引起肿瘤微环境中CD8 T细胞的失活, 抑制IL-17有利于CD8 T细胞的活化和延缓肿瘤的生长^[18]。不同的肿瘤细胞与免疫细胞之间的相互作用引起NETs的持续释放, 促进了机体组织中肿瘤的快速生长。鉴于线粒体产生的ATP是所有细胞活动的直接能量来源, 线粒体在肿瘤生长过程中发挥关键作用。NETs组织成分NE与肿瘤细胞表面Toll样受体结合激活了肿瘤细胞的TLR4-p38-PGC-1 α 途径后线粒体产生的能量明显增加。NETs通过改变细胞内ATP继而促进肿瘤的生长, 并且NETs通过影响线粒体的裂变、融合和自噬等功能维持线粒体的稳态^[19]。肿瘤微环境中还有T淋巴细胞和NK细胞等其他免疫细胞, 研究发现, NETs使T细胞的线粒体功能降低, 此外NETs通过包被肿瘤细胞阻止免疫细胞和肿瘤细胞的接触, 避免CD8 T细胞和NK细胞介导的细胞毒性反应对肿瘤细胞产生杀伤作用, 进一步促进肿瘤的增殖^[20,21]。乳腺癌细胞诱导中性粒细胞形成NETs后促进肿瘤细胞在肺部的转移, 通过DNase I降解NETs后显著抑制乳腺癌肿瘤在肺部的转移^[22]。另外, 炎症状态中中性粒细胞产生NETs后, NETs组织成分NE等物质裂解相关黏连蛋白并激活整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 表位, 这些改变使肿瘤细胞重新启动增殖, NETs在癌细胞休眠状态改变过程中发挥的作用需要进一步研究^[23]。扩散的肝癌细胞诱导NETs的产生触发凝血系统的激活, 逐渐形成门静脉血栓后影响患者的预后, 但NETs影响凝血系统的具体机制尚不明确^[24]。这些研究表明, 靶向NETs是一种治疗肿瘤的新方法, 但抗NETs治疗研究尚属于起步阶段, 需要深入研究靶向NETs治疗效率及不良反应。

2.3 心血管疾病

NETs在心血管疾病中主要参与动脉粥样硬化和血栓形成这两个病理性改变。在动脉粥样硬化病变中胆固醇晶体促进线粒体氧化应激的发生,

线粒体DNA氧化损伤逐渐加重, 氧化的线粒体DNA促进NETs的释放^[25]。NETs激活巨噬细胞和Th-17细胞, 使免疫细胞释放IL-1 β 、IL-17等细胞因子, 这些改变导致动脉粥样硬化病变中持续存在慢性炎症^[26]。深入研究发现, IL-8与中性粒细胞上CXCR2的结合促进NETs的形成, 释放的NETs通过TLR9/NF- κ B途径诱导巨噬细胞产生更多的IL-8, NETs和巨噬细胞之间相互作用加大驱动了动脉粥样硬化病变的恶性循环^[27]。通过PAD4依赖产生的NETs对巨噬细胞有直接的促炎作用, 巨噬细胞释放的细胞因子和趋化因子放大炎症的级联反应, 抑制PAD4后动脉粥样硬化中NETs的表达明显降低, 同时通过DNase I降解NETs后动脉粥样硬化的斑块也明显减小^[28]。

NETs通过IL-1 α 和组织蛋白酶G的协同作用促进血管内皮细胞的活化和组织因子TF的表达, 这些变化为血栓形成提供了基础条件^[29]。凝血酶和纤溶酶可以和游离的NETs的DNA结合, 并使NETs中蛋白质的表达下降, NETs相关组蛋白可能被凝血酶和纤溶酶还原^[30]。研究发现, 斑块内出血、斑块糜烂和斑块破裂等不同类型的复杂斑块中均存在大量NETs, NETs可见于血栓、斑块-血栓交界处等多个位置, 甚至相邻血管及周围组织中也存在大量NETs, 这表明NETs是动脉粥样硬化病变中血栓形成的重要参与者^[31]。研究发现, NETs可能通过激活血小板和血管内皮细胞引起组织纤溶酶原激活剂t-PA的耐药性, 但在t-PA耐药性中NETs的具体作用机制尚不清楚^[32]。此外, 抗血小板药物阿司匹林可以抑制NETosis, 抗凝药物肝素能分解NETs并抑制组蛋白等凝血相关物质的功能, 这些药物使NETs驱动的形成的血栓有所减少。NETs与血栓形成之间的关系及潜在机制是目前的研究重点, 对NETs在动脉粥样硬化中的形成及降解途径的深入了解有利于靶向NETs治疗在心血管疾病的临床应用。

2.4 新型冠状病毒感染

2019年新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)是一种主要影响呼吸系统的传染病。NETs在COVID-19患者体内参与炎症反应和血栓形成等多种病理过程, 严重时能引起多器官功能紊乱, NETs和COVID-19的病情发展有重要联

系。冠状病毒入侵黏膜中的细胞并扩散到细支气管和肺泡，病毒结合血管紧张素转换酶2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)后诱导肺泡上皮细胞坏死和脱落^[33]。研究发现，新冠病毒感染细胞进行病毒复制可直接诱导NETs释放，组蛋白和弹性蛋白酶等酶类激活补体系统，促进炎症反应，严重时可破坏肺-毛细血管结构，其中组蛋白还能发挥细胞毒性作用进一步加重机体损伤^[34,35]。病情加重的同时巨噬细胞清除NETs的能力受到严重损害，组织内NETs处于高水平状态，使巨噬细胞向促炎型巨噬细胞极化，巨噬细胞分泌促炎物质加重炎症反应和肺部损伤。IL-1 β 与NETs之间的相互作用可以形成NETs-IL-1 β 环，NETs激活巨噬细胞的NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor pyrin 3, NLRP3)炎症小体也产生NETs-IL-1 β 循环^[36]。高NETs状态进一步促进形成细胞因子风暴，维持全身异常的炎症状态。研究发现，COVID-19患者中NETs标志物弹性蛋白酶和瓜氨酸组蛋白H3等主要位于肺血管，在肾小球附近血管和肝门附近血管也有较高表达^[37]。NETs可以通过组织因子的呈递等过程促进凝血过程并激活血小板，微小血管内的NETs聚集并与血小板结合共同引起血管的快速闭塞，引起血管微循环系统的紊乱。另外，NETs组织成分弹性蛋白酶和组织蛋白酶G通过增强纤维蛋白的形成进一步促进血栓的形成^[38]。瓜氨酸组蛋白H3与血管性血友病因子(vWF)相互作用促进含有大量红细胞和血小板的红色血栓形成。冠状病毒感染病情加重后引起肺血管收缩，微血栓的阻塞使肺血管阻力进一步增加，患者出现肺动脉高压后严重影响肺脏和心脏的正常生理功能^[39]。纤维蛋白原、白蛋白等物质在高肺动脉压力下进入肺泡腔内，加重通气-灌注不足，引起呼吸困难。血管内的NETs与血小板、凝血因子vWF等相互作用，导致不同血管内的病理性血栓形成，进一步引起肺、心脏、肾脏等多个重要器官的损伤，导致心血管、神经和呼吸系统等受损，最终引起死亡^[40]。NETs在先天性免疫反应中有重要地位，需要进一步研究NETs在COVID-19中炎症反应和血栓形成的具体机制，抗NETs药物治疗可能是治疗重症COVID-19患者的一个新的方向。

3 抗NETs治疗

目前关于抗NETs药物研究主要集中在抗炎、抗血栓形成、ROS抑制、NADPH抑制等方面，临床代表药物有二甲双胍、阿司匹林、肝素、环孢素A和抗生素等。其中，二甲双胍是治疗糖尿病的常用药物，该药通过减少消化道内葡萄糖吸收和改善外周组织葡萄糖摄取和利用等多种方式降低血糖。二甲双胍具有多种作用机制，包括抗氧化、抗炎、抗病毒、免疫抑制等多种作用，在代谢性疾病、肿瘤、心血管病和新冠的治疗中均发挥重要作用。研究发现，二甲双胍能降低糖尿病患者血浆中的NETs标志物弹性蛋白酶、组蛋白和dsDNA浓度，胰岛素、达格列净对照组则变化不明显，二甲双胍阻止中性粒细胞中NADPH氧化酶的活化并降低NETosis反应^[41]。在肝癌患者血液中的NETs表现为高水平，NETs和线粒体DNA(mtDNA)有高度相关性，肝癌细胞通过调节中性粒细胞ROS生成、刺激氧化mtDNA和NETs形成促进肿瘤细胞转移，二甲双胍治疗则降低肝癌NETs中氧化的mtDNA含量，消除NETs引起的炎症反应，控制肿瘤的进一步发展^[42]。二甲双胍通过抑制线粒体呼吸链复合物和降低NADPH氧化酶活性等方式控制患者体内的肿瘤相关炎症反应，还在肿瘤转移方面发挥作用。二甲双胍通过抑制炎症、调节巨噬细胞功能、控制泡沫细胞形成等多种方式在动脉粥样硬化病情发展过程中发挥重要的治疗作用^[43]。在COVID-19患者治疗中早期应用二甲双胍能降低死亡率，并降低患者病情加重的风险。研究发现，二甲双胍可抑制IL-6等炎症因子的释放、氧化应激、病毒复制等过程，进而缓解炎症反应并预防急性肺损伤等，二甲双胍治疗对COVID-19患者病情缓解有积极意义^[44-46]。阿司匹林除了通过靶向COX2抑制NETs介导的肝癌细胞的转移作用^[47]，还能通过增强中性粒细胞的凋亡和抑制NF- κ B信号通路抑制NETs的形成^[48]。肝素能有效抑制脓毒症中NETs组分组蛋白诱导的炎症反应，带负电荷的肝素与带正电荷的组蛋白结合后降低了组蛋白的细胞毒性作用和脓毒症中组织因子的表达水平^[49-51]。环孢素A通过降低ROS的产生和IL-8的分泌抑制NETs的产生^[52]。抗生素中 β -内酰

胺类抗生素通过调控ROS抑制NETs的产生^[53,54], 大环内酯类则通过抑制NADPH氧化酶2(NADPH oxidase type 2, NOX2)进一步抑制NETs的产生^[55]。在以后的工作中应深入研究二甲双胍对具有高血糖、高凝等高危因素的NETs相关疾病的临床治疗效果, 其他类型的抗NETs药物也可以为炎症性疾病、免疫性疾病和肿瘤等多种疾病治疗提供新的研究方向。

4 结论与展望

近年来, NETs在代谢性疾病、肿瘤、心血管疾病等多种不同类型疾病中的作用机制不断被揭示, 为相关疾病的临床治疗中的联合药物治疗提供了新思路。目前二甲双胍、阿司匹林等常用临床一线药物与其他药物联合治疗NETs相关疾病已经成为新的治疗手段, 治疗效果还需要进一步研究结果进行验证。基于NETs在肿瘤、免疫性疾病、感染性疾病等相关疾病的发展过程中的重要作用, 接下来期待深入研究NETs在各类疾病中的具体作用机制及相应的信号通路等结果, 全面地阐释相关疾病的主要病理发展过程, 这些研究对中性粒细胞在疾病发展中的相关研究讨论也具有重大意义。另一方面抗NETs药物在NETs相关疾病中的作用机制和治疗效果等也需要深入研究, 其他类型的抗NETs药物的临床应用是重要的研究思路, 增加多种类型药物联合应用对疾病治疗可能有重要影响。

参考文献

- [1] Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil extracellular traps (nets) take the central stage in driving autoimmune responses. *Cells*, 2020, 9(4): 915
- [2] Liu X, Arfman T, Wichapong K, et al. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *J Thrombosis Haemostasis*, 2021, 19(7): 1607-1617
- [3] Lewis HD, Liddle J, Coote JE, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 189-191
- [4] Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukocyte Biol*, 2021, 110(4): 797-808
- [5] Inoue M, Enomoto M, Yoshimura M, et al. Pharmacological inhibition of sodium-calcium exchange activates NADPH oxidase and induces infection-independent NET formation. *Redox Biol*, 2021, 43: 101983
- [6] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 2012, 198(5): 773-783
- [7] Petrelli A, Popp SK, Fukuda R, et al. The contribution of neutrophils and NETs to the development of type 1 diabetes. *Front Immunol*, 2022, 13: 930553
- [8] Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, 2015, 52(3): 497-503
- [9] Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, et al. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine a. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97088
- [10] Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, et al. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. *Diabetes*, 2016, 65(4): 1061-1071
- [11] Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*, 2015, 21(7): 815-819
- [12] Wang L, Zhou X, Yin Y, et al. Hyperglycemia induces neutrophil extracellular traps formation through an nadph oxidase-dependent pathway in diabetic retinopathy. *Front Immunol*, 2018, 9: 3076
- [13] Davidsson L, Dahlstrand Rudin A, Sanchez Klose FP, et al. *In vivo* transmigrated human neutrophils are highly primed for intracellular radical production induced by monosodium urate crystals. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3750
- [14] Garcia-Gonzalez E, Gamberucci A, Lucherini OM, et al. Neutrophil extracellular traps release in gout and pseudogout depends on the number of crystals regardless of leukocyte count. *Rheumatology*, 2021, 60(10): 4920-4928
- [15] Jeong JH, Choi SJ, Ahn SM, et al. Neutrophil extracellular trap clearance by synovial macrophages in gout. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1): 88
- [16] Zha C, Meng X, Li L, et al. Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1/RAGE/IL-8 axis. *Cancer Biol Med*, 2020, 17(1): 154-168
- [17] Nie M, Yang L, Bi X, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL8 promote diffuse large B-cell lymphoma progression via the TLR9 signaling. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1867-1879
- [18] Zhang Y, Chandra V, Riquelme Sanchez E, et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20190354

- [19] Yazdani HO, Roy E, Comerci AJ, et al. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth. *Cancer Res*, 2019, 79(21): 5626-5639
- [20] Kaltenmeier C, Yazdani HO, Morder K, et al. Neutrophil extracellular traps promote T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Front Immunol*, 2021, 12: 785222
- [21] Teixeira Á, Garasa S, Gato M, et al. CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity. *Immunity*, 2020, 52(5): 856-871
- [22] Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*, 2016, 8(361): 361ra138
- [23] Albregues J, Shields MA, Ng D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 2018, 361(6409): eaao4227
- [24] Seo JD, Gu JY, Jung HS, et al. Contact system activation and neutrophil extracellular trap markers: risk factors for portal vein thrombosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2019, 25: 107602961882531
- [25] Wang Y, Wang W, Wang N, et al. Mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and neutrophil extracellular traps in aged mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(8): e99-e107
- [26] Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*, 2015, 349(6245): 316-320
- [27] An Z, Li J, Yu J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 2928-2938
- [28] Liu Y, Carmona-Rivera C, Moore E, et al. Myeloid-specific deletion of peptidylarginine deiminase 4 mitigates atherosclerosis. *Front Immunol*, 2018, 9: 1680
- [29] Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, et al. Neutrophil extracellular traps induce endothelial cell activation and tissue factor production through interleukin-1 α and cathepsin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(8): 1901-1912
- [30] Lim CH, Adav SS, Sze SK, et al. Thrombin and plasmin alter the proteome of neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*, 2018, 9: 1554
- [31] Pertiwi K, van der Wal A, Pabittei D, et al. Neutrophil extracellular traps participate in all different types of thrombotic and haemorrhagic complications of coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2018, 118(6): 1078-1087
- [32] Zhang S, Cao Y, Du J, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to tissue plasminogen activator resistance in acute ischemic stroke. *FASEB J*, 2021, 35(9): e21835
- [33] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280
- [34] Kasetty G, Papareddy P, Bhongir R KV, et al. Osteopontin protects against lung injury caused by extracellular histones. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(1): 39-50
- [35] Thierry AR. Anti-protease treatments targeting plasmin (ogen) and neutrophil elastase may be beneficial in fighting COVID-19. *Physiol Rev*, 2020, 100(4): 1597-1598
- [36] Yaqinuddin A, Kvietys P, Kashir J. COVID-19: Role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. *Respiratory Invest*, 2020, 58(5): 419-420
- [37] Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*, 2020, 58: 102925
- [38] Allegra A, Innao V, Allegra AG, et al. Coagulopathy and thromboembolic events in patients with SARS-CoV-2 infection: pathogenesis and management strategies. *Ann Hematol*, 2020, 99(9): 1953-1965
- [39] Trougakos IP, Stamatelopoulou K, Terpos E, et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 9
- [40] Yang J, Wu Z, Long Q, et al. Insights into immunothrombosis: the interplay among neutrophil extracellular trap, von willebrand factor, and ADAMTS13. *Front Immunol*, 2020, 11: 610696
- [41] Menegazzo L, Scattolini V, Cappellari R, et al. The antidiabetic drug metformin blunts NETosis *in vitro* and reduces circulating NETosis biomarkers *in vivo*. *Acta Diabetol*, 2018, 55(6): 593-601
- [42] Yang LY, Shen XT, Sun HT, et al. Neutrophil extracellular traps in hepatocellular carcinoma are enriched in oxidized mitochondrial DNA which is highly pro-inflammatory and pro-metastatic. *J Cancer*, 2022, 13(4): 1261-1271
- [43] Feng X, Chen W, Ni X, et al. Metformin, macrophage dysfunction and atherosclerosis. *Front Immunol*, 2021, 12: 682853
- [44] Chen X, Guo H, Qiu L, et al. Immunomodulatory and antiviral activity of metformin and its potential implications in treating coronavirus disease 2019 and lung injury. *Front Immunol*, 2020, 11: 2056
- [45] Usman A, Bliden KP, Cho A, et al. Metformin use in patients hospitalized with COVID-19: lower inflamma-

- tion, oxidative stress, and thrombotic risk markers and better clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis*, 2022, 53(2): 363-371
- [46] Reis G, dos Santos Moreira Silva EA, Medeiros Silva DC, et al. Effect of early treatment with metformin on risk of emergency care and hospitalization among patients with COVID-19: The TOGETHER randomized platform clinical trial. *Lancet Regional Health-Ams*, 2022, 6: 100142
- [47] Yang LY, Luo Q, Lu L, et al. Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 3
- [48] Wan T, Zhang Y, Yuan K, et al. Acetylsalicylic acid promotes corneal epithelium migration by regulating neutrophil extracellular traps in alkali burn. *Front Immunol*, 2020, 11: 551057
- [49] Ebeyer-Masotta M, Eichhorn T, Weiss R, et al. Heparin-Functionalized Adsorbents Eliminate Central Effectors of Immunothrombosis, including Platelet Factor 4, High-Mobility Group Box 1 Protein and Histones. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1823
- [50] Cato LD, Bailiff B, Price J, et al. Heparin resistance in severe thermal injury: a prospective cohort study. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab032
- [51] Hogwood J, Pitchford S, Mulloy B, et al. Heparin and non-anticoagulant heparin attenuate histone-induced inflammatory responses in whole blood. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233644
- [52] Lu H, Lin J, Xu C, et al. Cyclosporine modulates neutrophil functions via the SIRT6-HIF-1 α -glycolysis axis to alleviate severe ulcerative colitis. *Clin Transl Med*, 2021, 11(2): e334
- [53] Duan Z, Xie T, Chu C, et al. De-escalation antibiotic therapy alleviates organ injury through modulation of NETs formation during sepsis. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 345
- [54] Xie T, Duan Z, Sun S, et al. β -Lactams modulate neutrophil extracellular traps formation mediated by mTOR signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 408-414
- [55] Zhang H, Qiu SL, Tang QY, et al. Erythromycin suppresses neutrophil extracellular traps in smoking-related chronic pulmonary inflammation. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 678