



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.06.014

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.06.014

• 临床基础研究 •

# 中性粒细胞胞外诱捕网增加糖尿病小鼠对侵袭性曲霉病的易感性

许向华 夏初 黄怡

**[摘要]** **目的** 探讨中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)与糖尿病小鼠对侵袭性曲霉病易感性增加的关系。**方法** 采用高脂饮食和链脲佐菌素(STZ)注射建立 2 型糖尿病(T2DM)小鼠模型(糖尿病组,24 只),另选取 24 只无糖尿病小鼠作为对照组。经气道感染烟曲霉诱导侵袭性曲霉病,检测两组小鼠肺组织的真菌负荷、炎症因子水平、组织病理和 NETs。体外共孵育中性粒细胞与菌丝,观察中性粒细胞的杀菌能力和释放的 NETs。**结果** 成功建立 T2DM 和侵袭性曲霉病小鼠模型。感染后 72 小时及 120 小时,糖尿病组小鼠的真菌负荷均明显高于对照组( $P < 0.01$ )。感染后 24 小时,糖尿病组小鼠白细胞介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ )水平明显高于对照组( $P < 0.05$ )。感染后 48 小时,糖尿病组小鼠的炎症病变较对照组更严重,肺组织中组蛋白 3(H3)的阳性率明显高于对照组( $P < 0.05$ )。与菌丝共孵育 6 小时,糖尿病组中性粒细胞 H3 的阳性率高于对照组( $P < 0.05$ )。加入还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶抑制剂氯化二亚苯基碘(DPI)后,两组小鼠中性粒细胞 H3 阳性率均下降,两组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。共孵育 24 小时后,糖尿病组中性粒细胞共孵育的菌丝活力明显高于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** 中性粒细胞 NADPH 氧化酶功能异常导致的 NETs 释放增多可能与糖尿病小鼠对侵袭性曲霉病易感性增加有关。

**[关键词]** 糖尿病; 侵袭性曲霉病; 中性粒细胞胞外诱捕网; NADPH 氧化酶

**[中图分类号]** R563.1

**[文献标识码]** A

## Neutrophil extracellular traps increase the susceptibility of diabetic mice to invasive aspergillosis

Xu Xianghua, Xia Chu, Huang Yi. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between neutrophil extracellular traps(NETs) and increased susceptibility of diabetic mice to invasive aspergillosis. **Methods** The mouse model of type 2 diabetes(T2DM) was established by using high-fat diet and streptozotocin(STZ) injection(24 mice in diabetic group), and 24 mice without diabetes were selected as control group. Invasive aspergillosis was induced by airway infected with *Aspergillus fumigatus*. The fungal burden, inflammatory factors levels, histopathology and NETs of the lung tissues were measured in the two groups. The fungicidal ability and the released NETs of neutrophils were observed by co-incubating neutrophils and hyphae in vitro. **Results** Mouse models of T2DM and invasive aspergillosis were successfully established. At 72 h and 120 h after infection, the fungal burden of mice in the diabetes group was significantly higher than that in control group( $P < 0.05$ ). At 24 h after infection, the level of interleukin  $1\beta$ (IL- $1\beta$ ) was significantly higher in diabetic group than that in control group( $P < 0.05$ ). Diabetic group had more severe inflammation and higher histone 3(H3) positive rate in lung tissue than those of control group at 48 h after infection( $P < 0.05$ ). The neutrophils in diabetic group had higher H3 positive rate than those in control group after co-incubation with hyphae for 6 hours( $P < 0.05$ ). After diphenyleneiodonium chloride[DPI, an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidase] was added, the positive rate of neutrophil H3 in the two groups of mice decreased, and the difference between the two groups was not statistically significant( $P > 0.05$ ). After 24 h of co-incubation, the viability of the hyphae incubated with neutrophils in the diabetic group was significantly higher than that of the control group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Increased release of NETs caused by dysfunction of neutrophil NADPH oxidase may be associated with increased susceptibility of diabetic mice to invasive aspergillosis.

**[Key words]** Diabetes; Invasive aspergillosis; Neutrophil extracellular traps; NADPH oxidase

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1309704)

作者单位:200433 上海,海军军医大学第一附属医院 上海长海医院呼吸科

通讯作者:黄怡, E-mail: huangliur@163.com

注:第一作者现在北部战区总医院呼吸科工作

侵袭性曲霉病是一种严重的真菌病,烟曲霉是最常见的病原体,肺部是最常见的感染部位<sup>[1-2]</sup>。侵袭性曲霉病常由多种因素诱发,造血干细胞移植、恶性血液病和粒细胞缺乏是其主要高危因素<sup>[3]</sup>,近年来研究发现,无高危因素的侵袭性曲霉病逐渐增多<sup>[4]</sup>。2010 年 Gangneux 等<sup>[5]</sup>报道 30% ~ 50% 的侵袭性曲霉病发生于非粒细胞缺乏患者;2019 年 Chakrabarti 等<sup>[2]</sup>发现超过 60% 的侵袭性曲霉病患者无高危因素,且预后不良,死亡率超过 70%;表明非高危因素在侵袭性曲霉病中的作用也应受到重视。糖尿病是侵袭性曲霉病的非高危因素之一,高达 28.9% ~ 30.9% 的侵袭性曲霉病患者患有糖尿病<sup>[1-2]</sup>,其机制尚不清楚。中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)是由中性粒细胞释放的覆盖着组蛋白和抗菌蛋白的 DNA 网状结构,中性粒细胞通过一个称为 NETosis 的过程来释放 NETs。NETs 既是中性粒细胞的一种杀菌工具,也是一种炎症介质,与多种疾病的发生发展相关<sup>[6]</sup>。烟曲霉感染时糖尿病患者中性粒细胞释放 NETs 情况及其作用目前尚不清楚,推测可能存在 NETs 释放异常,且这种异常可能与糖尿病患者对侵袭性曲霉病的易感性增加有关。因此,我们建立了 2 型糖尿病(T2DM)和侵袭性曲霉病小鼠模型,比较发生侵袭性曲霉病时糖尿病小鼠和无糖尿病对照小鼠的易感性和中性粒细胞释放 NETs 的情况,旨在探讨 NETs 在糖尿病患者发生侵袭性曲霉病时所起的作用,以期在糖尿病患者中预防侵袭性曲霉病的发生或改善侵袭性曲霉病的治疗效果。

## 材料与方法

### 1. 材料

(1)动物:5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量为(18 ± 2)g,购自斯莱克实验动物有限责任公司(上海),按照《实验动物的管理和使用指南(第八版)》<sup>[7]</sup>的标准饲养管理动物,在暴露前适应 7 天。采用随机数字法将 48 只小鼠分为糖尿病组和对照组,每组各 24 只。其中,真菌负荷实验中两组各处死 15 只;炎症因子检测时两组各处死 3 只;肺组织病理和 NETs 检测时两组各处死 3 只;中性粒细胞分离实验中两组各处死 3 只。

(2)烟曲霉菌株:表达绿色荧光蛋白的烟曲霉菌株(ATCC13703)由美国科罗拉多大学健康科学中心 Nancy Madinger 博士赠送。

(3)其他材料:高脂(提供 60% 的能量)饲料和低脂(提供 10% 的能量)饲料购自 Research Diets 公司(美国),链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma-Aldrich 公司(美国),RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司(美国),

Sabouraud 培养基、Sabouraud 液体培养基和 Tween-80 购自 Sigma-Aldrich 公司(美国),小鼠外周血中性粒细胞分离液试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司(德国),小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自 R&D 公司(美国),Anti-Ly6G 抗体[RB6-8C5]异硫氰酸荧光素(FITC)和组蛋白 3(H3)一抗 Anti-Histone H3 抗体购自 Abcam 公司(英国),H3 二抗 DyLight549 goat anti-rabbit IgG[H + L]购自联科生物(中国),二脒基苯基吡啶(DAPI)、二甲氧喹黄(XTT)和吩噻硫酸甲酯(PMS)购自 Sigma-Aldrich 公司(美国),Triton X-100 购自生工公司(中国)。本研究经我院伦理委员会审批通过。

### 2. 方法

(1)T2DM 小鼠模型建立:参考文献[8],用高脂饲料饲养糖尿病组小鼠 4 周后,每天腹腔注射 40 mg/kg 体重的 STZ,连续 5 天。STZ 注射结束 1 周后,测定空腹血糖  $\geq 250$  mg/dl 诊断为糖尿病<sup>[9]</sup>。对照组小鼠喂食低脂饲料,以相同剂量的柠檬酸钠缓冲液代替 STZ 注射。两组在注射完成 2 周后进行烟曲霉感染。

(2)烟曲霉感染:烟曲霉孢子悬液的制备参考文献[10]并略加修改:孢子接种于 Sabouraud 培养基上培养,当菌苔铺满培养基时,用含 0.1% Tween-80 的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,过滤去除菌丝,孢子重悬在 PBS 中,调整孢子悬液浓度为  $5 \times 10^7$ /ml 备用。菌丝悬液制备参考文献[11]并略加修改:在 Sabouraud 液体培养基中培养烟曲霉孢子( $1 \times 10^6$  cfu/ml)16 ~ 24 小时,收集菌丝,PBS 冲洗后用超声破碎法将菌丝打碎成 10 ~ 100  $\mu$ m 碎片,配制的菌丝碎片浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/ml。采用滴鼻法感染烟曲霉孢子,参照文献[12]并加以修改:将小鼠用乙醚麻醉后保持直立状,用移液器吸取 20  $\mu$ l 浓度为  $5 \times 10^7$ /ml 的烟曲霉孢子悬液,从鼻孔慢慢滴入。孢子悬液滴入 2 小时后,参照文献[11]的方法,通过口咽灌注法注入菌丝悬液,每只小鼠  $1 \times 10^4$  cfu。

(3)组织学检查:参考文献[12]的方法解剖和固定小鼠肺组织,固定好的肺组织用石蜡包埋,组织切片,采用苏木素-伊红(HE)染色评估炎症反应。

(4)中性粒细胞分离和培养:采用胸腔内穿刺法采集循环血<sup>[13]</sup>。以小鼠外周血中性粒细胞分离液试剂盒纯化中性粒细胞。用 RPMI 1640 培养基重悬细胞,于 37  $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。

(5)真菌负荷检测:无菌条件下取小鼠右肺上、中、下固定位置的组织 20 mg,加入 200  $\mu$ l 生理盐水研磨破碎,制成 10 倍稀释系列  $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$  和  $1 \times 10^3$  稀释度悬液,从各稀释度悬液分别取 100  $\mu$ l 接种于

Sabouraud 培养基上,每浓度 3 块平皿,置于霉菌培养箱中 26.5 ℃ 培养 7 天。根据培养基上菌落数计算悬液中曲霉菌落数:菌落数/ml = (各稀释度 3 个平皿中菌落平均数 × 稀释倍数之和)/3。

(6)细胞因子检测:使用小鼠 ELISA 试剂盒测量组织裂解液中的 TNF-α 和 IL-1β 含量,按照说明书进行操作。

(7)NETs 检测:采用免疫荧光染色激光共聚焦显微镜检测 NETs。Anti-Ly6G 抗体用于标记粒细胞;H3 一抗和二抗用于标记 H3;DAPI 用于 DNA 染色。细胞外 H3 和 DAPI 共定位代表 NETs,根据细胞外 H3 的阳性率比较 NETs 含量。NETs 的检测参照文献[11]并略加修改。肺组织 NETs 检测方法:标本脱蜡,水化,抗原修复;封闭 1 小时;孵育 Ly6G 抗体和 H3 一抗,4 ℃ 过夜;孵育 H3 二抗 2 小时;DAPI 染色;封片剂封片。中性粒细胞 NETs 检测:在灭菌的 12 孔板中铺上爬片,新鲜分离的中性粒细胞接种于爬片上( $1 \times 10^4$  个细胞/孔,每组 3 个孔),孵育 1 小时后加入菌丝(中性粒细胞与菌丝比例为 10:1),置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 ℃ 培养 6 小时;PBS 漂洗;4% 多聚甲醛和 0.5% Triton X-100 处理;孵育 Ly6G 抗体和 H3 一抗,4 ℃ 过夜;孵育 H3 二抗 2 小时;DAPI 染色;封片剂封片。激光共聚焦显微镜(Leica)下检查分析拍照。采用 ImageJ 软件进行图片灰度扫描,得出 Ly6G 及 H3 的阳性率。

(8)菌丝活力检测:参照文献[14]并略加修改,采用 XTT 还原法检测烟曲霉菌丝活力。菌丝和中性粒细胞共孵育于 96 孔板中。终止孵育前用 H<sub>2</sub>O/NaOH(pH 11.0)裂解中性粒细胞。随后用 20 μl 的 XTT/PMS 孵育菌丝 2 小时。吸取上清液,用酶标仪(Thermo,中国)在 450 nm 处测光密度(OD)值。

3. 统计学处理:应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 两组小鼠真菌负荷比较:在烟曲霉感染后 24 小时、72 小时、120 小时,两组分别处死 5 只小鼠,检测肺组织真菌负荷,结果显示,对照组在感染后 24 小时[(1 722 ± 184) cfu]、72 小时[(2 814 ± 269) cfu]呈高负荷状态,至 120 小时[(1 232 ± 301) cfu]显著降低;糖尿病组小鼠在感染后真菌负荷逐渐增高,持续保持在高负荷状态[24 小时:(1 770 ± 161) cfu,72 小时:(4 248 ± 677) cfu;120 小时:(5 089 ± 710) cfu],72 小时和 120 小时均明显高于对照组同一时间( $P < 0.01$ )。在感染后第 5 天荧光显微镜下观察结果示,糖尿病组

小鼠肺组织可见菌丝,而对照组小鼠罕见,见图 1。

2. 两组小鼠炎症病变程度比较:烟曲霉感染后 24 小时,糖尿病组小鼠 IL-1β 水平明显高于对照组[(52.32 ± 5.94) pg/ml 比 (29.28 ± 5.95) pg/ml,  $P < 0.05$ ],TNF-α 水平与对照组比较差异无统计学意义[(130.37 ± 12.91) pg/ml 比 (109.71 ± 18.81) pg/ml,  $P > 0.05$ ]。感染后 48 小时,两组小鼠肺组织病理检查结果显示,对照组小鼠病变区域肺组织结构完整,肺泡间隔水肿增宽,有较多中性粒细胞和其他炎症细胞浸润;糖尿病小鼠病变区域有大量的中性粒细胞和其他炎症细胞浸润,肺泡间隔明显水肿增宽,肺泡腔明显缩小,见图 2。

3. 两组小鼠肺组织 NETs 比较:烟曲霉感染后 48 小时,肺组织经免疫荧光染色,在激光共聚焦显微镜下观察,可见糖尿病组小鼠肺组织中 NETs 更多,见图 3。糖尿病组和对照组小鼠肺组织中 Ly6G 阳性率比较差异无统计学意义[(18.93 ± 3.71)% 比 (12.55 ± 3.13)%,  $P > 0.05$ ];糖尿病组小鼠肺组织中 H3 阳性率明显高于对照组[(15.73 ± 1.70)% 比 (9.97 ± 1.33)%,  $P < 0.05$ ]。

4. 两组小鼠中性粒细胞释放 NETs 能力及杀菌能力比较:糖尿病小鼠中性粒细胞 H3 的阳性率明显高于对照小鼠[(19.57 ± 3.10)% 比 (10.60 ± 1.15)%,  $P < 0.05$ ]。在加入菌丝前加入 NADPH 氧化酶抑制剂氯化二亚苯基碘(DPI,10 μmol/L)重复上述实验,镜下见两组小鼠中性粒细胞释放的 NETs 均明显减少(图 4),两组小鼠中性粒细胞 H3 阳性率均下降,糖尿病小鼠 H3 阳性率与对照组小鼠比较差异无统计学意义[(8.30 ± 0.85)% 比 (8.03 ± 0.65)%,  $P > 0.05$ ]。共孵育 24 小时后进行菌丝活力检测结果显示,糖尿病组的菌丝活力明显高于对照组(0.82 ± 0.04 比 0.65 ± 0.05,  $P < 0.05$ )。

## 讨 论

非严重免疫缺陷的侵袭性曲霉病动物模型的制作目前存在困难,研究发现非严重免疫缺陷小鼠会很快清除经气道感染的曲霉孢子,难以诱导侵袭性曲霉病<sup>[12,15]</sup>。Rohm 等<sup>[11]</sup>发现给免疫功能正常的小鼠感染菌丝可以模拟侵袭性肺曲霉病。然而这种单纯菌丝感染并不符合自然感染的过程,因此,我们先按照自然感染的方式予小鼠感染孢子,再感染菌丝以模拟侵袭性病变。我们发现,上述方法能较好地模拟侵袭性曲霉病。对照组小鼠感染后,能迅速将病原体清除;而糖尿病小鼠感染后,在观察期内肺部真菌负荷持续增加,表明糖尿病小鼠对烟曲霉的易感性高于对照组。

糖尿病患者中性粒细胞 NETosis 调节失衡,在非

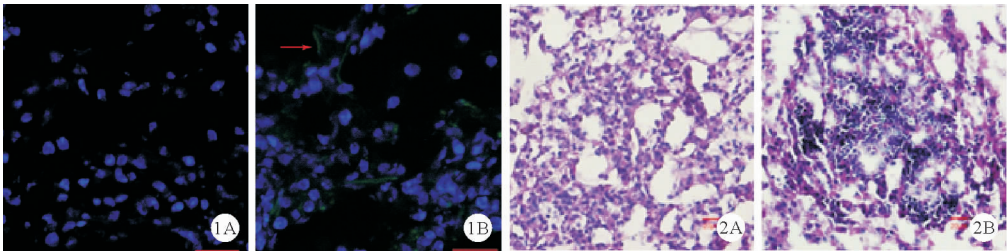


图1 两组小鼠感染烟曲霉后第5天肺组织荧光显微镜下观察结果:糖尿病组小鼠肺组织仍可见表达绿色荧光蛋白的菌丝(如箭头所示),而对照组小鼠罕见(A:对照组,B:糖尿病组;×200) 图2 两组小鼠感染后48小时肺组织病理检查结果(A:对照组,B:糖尿病组;HE染色,×200)

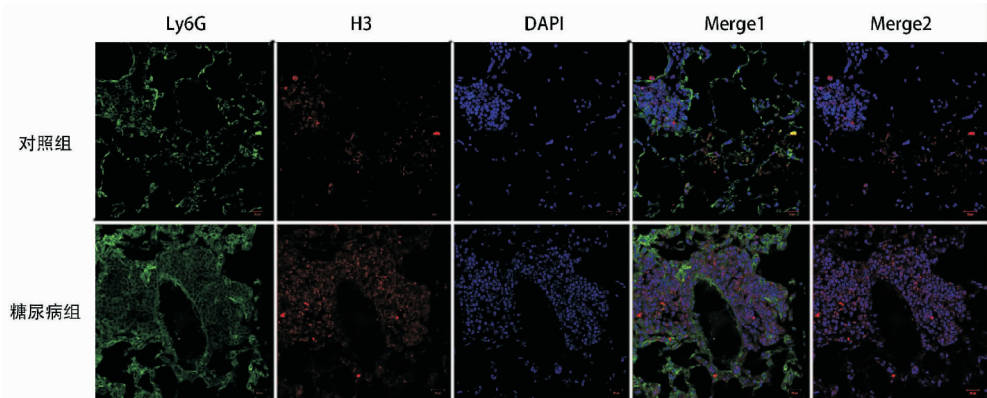


图3 两组小鼠肺组织 NETs 比较:红色:H3,绿色:Ly6G,蓝色:DAPI 染色的 DNA, Merge1:Ly6G、H3、DAPI 叠加, Merge2:H3、DAPI 叠加(免疫荧光染色,×200);细胞外 H3 和 DAPI 共定位代表 NETs

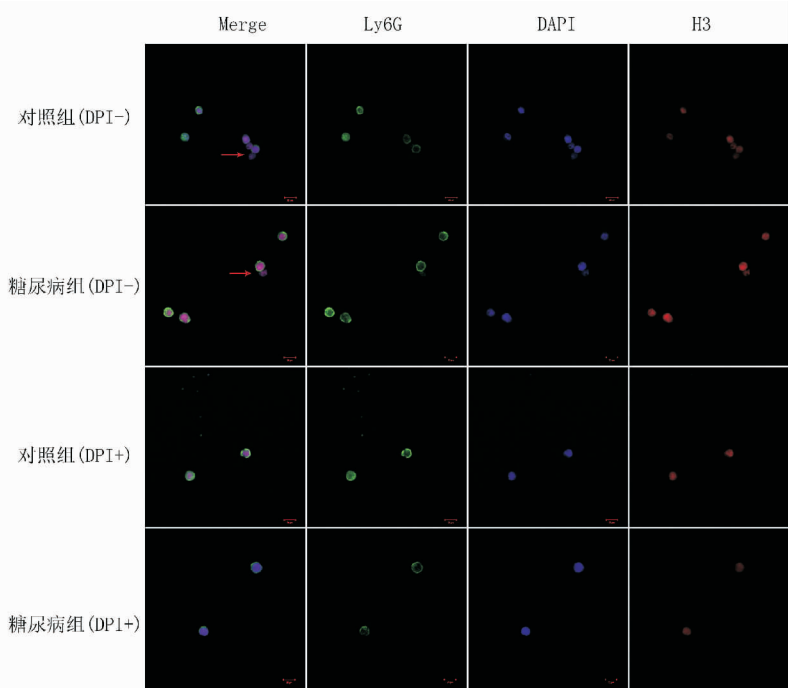


图4 两组小鼠中性粒细胞释放的 NETs 和菌丝活力比较:红色:H3;绿色:Ly6G;蓝色:DAPI 染色 DNA;Merge:Ly6G、H3、DAPI 叠加;细胞外 H3 和 DAPI 共定位代表 NETs;DPI(-)表示不加 DPI, DPI(+)表示加入 DPI;对照组和糖尿病组箭头指向细胞外的 NETs(免疫荧光染色,×400)

感染情况下 NETs 被过度释放<sup>[16]</sup>,但在感染情况下 NETs 的变化比较复杂。Joshi 等<sup>[17]</sup>发现在高糖环境下用脂多糖刺激中性粒细胞时 NETs 形成受损;Lee 等<sup>[18]</sup>发现在肺炎克雷伯杆菌感染时糖尿病患者与非糖尿病患者中性粒细胞 NETs 形成相当;Cohen 等<sup>[19]</sup>发现糖尿病小鼠在金黄色葡萄球菌感染时中性粒细胞释放

NETs 增多。以上结果均表明,糖尿病患者感染时 NETs 的改变可能与病原体种类或宿主免疫状态等因素有关。

关于 NETs 在曲霉感染中的作用,之前已有多项研究进行报道。Bianchi 等<sup>[20]</sup>发现通过基因治疗恢复 NETs 能够有效控制慢性肉芽肿病患者的曲霉菌; McCormick 等<sup>[21]</sup>发现 NETs 能抑制烟曲霉生长; Bruns 等<sup>[22]</sup>发现 NETs 对烟曲霉具有中等程度的杀伤。然而,也有研究得出不同甚至相反的结论,如 Gazendam 等<sup>[14]</sup>报道 NETs 对曲霉没有杀伤作用; Alflen 等<sup>[23]</sup>报道 NETs 可阻止机体对曲霉的清除。这些研究结论的不同可能受实验条件影响,也可能表明 NETs 在曲霉感染中的作用比较复杂,还未被真正揭示。本研究发现,经烟曲霉感染后,糖尿病组小鼠中性粒细胞释放的 NETs 多于对照组小鼠,对烟曲霉菌丝的杀伤作用弱于对照组小鼠。由于中性粒细胞不能吞噬菌丝这样的大型微生物,其对菌丝的杀伤作用主要是依靠释放到细胞外的物质进行,因此本研究表明 NETs 对菌丝的杀伤能力很弱或没有杀伤作用,推测过多的 NETs 可能与更严重的肺部损伤相关。

NETs 形成包括 NADPH 氧化酶依赖和非依赖两种方式<sup>[24]</sup>。我们发现,在小鼠肺曲霉感染时,NETs 形成与 NADPH 氧化酶激活有关,NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 可以显著降低 NETs 释放,这种作用对糖尿病小鼠中性粒细胞更加显著,表明糖尿病小鼠中性粒细胞 NETs 过度释放与 NADPH 氧化酶异常激活有关。

综上所述,糖尿病小鼠中性粒细胞过度释放的 NETs 没有增强中性粒细胞对烟曲霉菌丝的杀伤,而且可能加重组织损伤。通过调节 NADPH 氧化酶来抑制过多的 NETs 形成可能对糖尿病患者预防或治疗曲霉感染有益。

## 参 考 文 献

- [1] Rotjanapan P, Chen YC, Chakrabarti A, et al. Epidemiology and clinical characteristics of invasive mould infections: A multicenter, retrospective analysis in five Asian countries[J]. Med Mycol, 2018, 56(2): 186-196.
- [2] Chakrabarti A, Kaur H, Savio J, et al. Epidemiology and clinical outcomes of invasive mould infections in Indian intensive care units (FISF study) [J]. J Crit Care, 2019, 51: 64-70.
- [3] Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis; 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(4): e1-e60.
- [4] 许向华, 夏初, 黄怡. 棘白菌素在侵袭性肺真菌病预防和治疗中的作用[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(8): 598-600.
- [5] Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients [J]. Rev Mal Respir,

- 2010, 27(8): e34-e46.
- [6] 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.
- [7] National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition [M]. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
- [8] Han L, Li T, Du M, et al. Beneficial Effects of Potentilla discolor Bunge Water Extract on Inflammatory Cytokines Release and Gut Microbiota in High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 670.
- [9] Leiter EH. Selecting the "right" mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research [J]. Methods Mol Biol, 2009, 560: 1-17.
- [10] Shevchenko MA, Bogorodskiy AO, Troyanova NI, et al. Aspergillus fumigatus Infection-Induced Neutrophil Recruitment and Location in the Conducting Airway of Immunocompetent, Neutropenic, and Immunosuppressed Mice [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 5379085.
- [11] Rohm M, Grimm MJ, D' Auria AC, et al. NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis [J]. Infect Immun, 2014, 82(5): 1766-1777.
- [12] Buskirk AD, Templeton SP, Nayak AP, et al. Pulmonary immune responses to Aspergillus fumigatus in an immunocompetent mouse model of repeated exposures [J]. J Immunotoxicol, 2014, 11(2): 180-189.
- [13] Gris T, Laplante P, Thebault P, et al. Innate immunity activation in the early brain injury period following subarachnoid hemorrhage [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 253.
- [14] Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, et al. Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill Aspergillus fumigatus Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects [J]. J Immunol, 2016, 196(3): 1272-1283.
- [15] Prufer S, Weber M, Stein P, et al. Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of Aspergillus fumigatus pneumonia in mice [J]. Immunobiology, 2014, 219(2): 87-96.
- [16] Panigrahy SK, Bhatt R, Kumar A. Reactive oxygen species: sources, consequences and targeted therapy in type 2 diabetes [J]. J Drug Target, 2017, 25(2): 93-101.
- [17] Joshi MB, Lad A, Bharath PA, et al. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation [J]. FEBS Lett, 2013, 587(14): 2241-2246.
- [18] Lee IR, Sng E, Lee KO, et al. Comparison of Diabetic and Non-diabetic Human Leukocytic Responses to Different Capsule Types of Klebsiella pneumoniae Responsible for Causing Pyogenic Liver Abscess [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 401.
- [19] Cohen TS, Takahashi V, Bonnell J, et al. Staphylococcus aureus drives expansion of low-density neutrophils in diabetic mice [J]. J Clin Invest, 2019, 129(5): 2133-2144.
- [20] Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis [J]. Blood, 2009, 114(13): 2619-2622.
- [21] McCormick A, Heesemann L, Wagener J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus [J]. Microbes Infect, 2010, 12(12-13): 928-936.
- [22] Bruns S, Knemeyer O, Hasenberg M, et al. Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4): e1000873.
- [23] Alflen A, Aranda LP, Hartmann AK, et al. Neutrophil extracellular traps impair fungal clearance in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis [J]. Immunobiology, 2020, 225(1): 151867.
- [24] Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology [J]. Biomolecules, 2019, 9(8): 365.

(收稿日期: 2020-09-06)

(本文编辑: 张一冰)