

人 DNase I 的表达、纯化及降解 NETs 活性研究

梁艺璇, 吴洁*

(中国药科大学生命科学与技术学院酶工程实验室, 南京 210009)

摘要 为获得纯度较高的人脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 以研究其对中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 的降解作用, 构建基因工程表达菌 *E. coli* Rosetta (DE3)/pET32a-His-DNase I, 乳糖诱导表达, 经镍柱亲和纯化获得融合蛋白 His-DNase I。提取小鼠中性粒细胞, 用佛波酯 PMA 刺激形成 NETs, SytoxGreen 及荧光显微镜检测融合蛋白对 NETs 的降解活性。结果表明, 成功构建人 DNase I 基因克隆并在原核细胞中实现高效表达, 纯化的 His-DNase I 具备较高的核酸酶活性。本研究为进一步探究 DNase I 的临床应用奠定了理论基础。

关键词 脱氧核糖核酸酶 I; 中性粒细胞胞外诱捕网; 分离纯化; His 标签

中图分类号 Q789 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)01-0093-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190113

引用本文 梁艺璇, 吴洁. 人 DNase I 的表达、纯化及降解 NETs 活性研究[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 93–99.

Cite this article as: LIANG Yixuan, WU Jie. Expression, purification and NETs degradation activity of human DNase I [J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(1): 93–99.

Expression, purification and NETs degradation activity of human DNase I

LIANG Yixuan, WU Jie*

Laboratory of Enzyme Engineering, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to study the effect of human deoxyribonuclease I (DNase I) on neutrophil extracellular traps (NETs) degradation, genetic engineering bacteria *E. coli* Rosetta (DE3)/pET32a-His-DNase I was constructed. The fusion protein His-DNase I was induced by lactose, and purified by Ni-affinity chromatography. Mouse neutrophils were extracted and stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) to form NETs. The degradation activity of the fusion protein on NETs was detected by SytoxGreen and fluorescence microscopy. The results showed that the purified His-DNase I had high nuclease activity. This study provided the research foundation for further exploration of the clinical application of DNase I.

Key words deoxyribonuclease I; neutrophil extracellular traps; separation and purification; His-tag

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673340), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161462)

中性粒细胞在捕获和杀灭病原体过程中发挥重要作用, 是人体免疫防御的第一道防线^[1]。活化的中性粒细胞会释放自身线粒体和核内染色质 DNA 到胞外, 以 DNA 为骨架包裹各种颗粒蛋白酶形成纤维网状结构, 称为中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs)^[2]。NETs 的诱捕作用能使机体有效地防御病原体感染^[3]。尽

管 NETs 具有杀菌活性, 然而越来越多的证据表明, 过量的 NETs 具有促炎特性并导致宿主细胞损伤^[4–6]。因此, NETs 过量形成或清除受阻是许多疾病的潜在基础, 包括系统性红斑狼疮、血管炎、糖尿病、血栓和肺损伤等^[7–11]。

NETs 只有在自身结构完整的情况下才能维持其抗原性^[12], 因其主要结构成分是 DNA, 所以可

收稿日期 2019-01-07 *通信作者 Tel: 025-83271242 E-mail: wujie@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673340); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20161462)

通过破坏 NETs 的 DNA 骨架降解 NETs^[13]。人脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 是一种酸性糖蛋白,具有核酸内切酶活性。在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价金属离子存在的条件下,作用于单链或者双链 DNA 的磷酸二酯键,通过水解生成单核苷酸或者 5'端为磷酸基团,3'端为羟基的寡核苷酸^[14]。DNase I 不仅可以降解外源 DNA,还在细胞凋亡、降解坏死细胞的染色质方面起到很大作用,并在小鼠乳腺癌、胰腺癌模型^[15-17]、肺损伤^[18]和系统性红斑狼疮^[19]中被证实可发挥一定的功效。

为深入研究 DNase I 与 NETs 相关疾病的关系,本实验成功构建了原核表达质粒 pET32a-His-DNase I 并转化至 *E. coli* Rosetta (DE3) 中,建立了纯化 His-DNase I 的简要工艺。

1 材料

1.1 菌种、质粒及实验动物

宿主菌为大肠埃希菌 *Rosetta* (DE3),克隆质粒 pGEM-DNASEI 购自北京义翘神州科技有限公司;表达质粒为 pET-32a(+),含氨苄青霉素(Amp)抗性基因,由华安生物技术有限公司提供。SPF 级 BALB/c 雌性小鼠(4~6 周龄)自扬州大学购买,合格证号:SCXK(苏)2017-0007,动物实验符合动物伦理委员会批准。

1.2 试剂

Nco I、*Xho* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(美国赛默飞世尔公司);Ni Sepharose High performance(美国通用医疗公司);质粒小量制备试剂盒(上海生物工程有限公司);PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶切胶回收试剂盒(北京天根生物科技有限公司);引物(南京金斯瑞生物科技有限公司);DNA Marker、蛋白预染 Marker(北京全式金生物科技有限公司);氨苄青霉素(上海源叶生物科技有限公司);中性粒细胞提取试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);细胞爬片(上海晶安生物科技有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,南京凯基生物科技发展有限公司);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);佛波酯(PMA,美国 Sigma-Aldrich 公司);BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 His-DNase I 融合蛋白表达载体的构建

按照人 DNase I 的氨基酸序列,采用大肠埃希菌偏爱密码子获得人 DNase I 的 DNA 序列。利用引物设计软件 Oligo 分别设计上游引物 P1 和下游引物 P2, P1: 5'-CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCATGCCGTGGTATGAAAC-3', P2: 5'-CCGCTCGAGTTATTTTCAGCATAACTTCCACC-3'。

通过引物设计上游引物 P1,即在该扩增的 DNase I 基因的 5'端加入 6 个组氨酸(His)标签,同时在连接处加入 2 个连续的丝氨酸作为柔性肽,引入酶切位点 *Nco* I,下游引物 P2 引入 *Xho* I 酶切位点。采用 PCR 技术,获得 His-DNase I 基因序列。

扩增条件为 98 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 1 min,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。

分别用 *Nco* I、*Xho* I 将 PCR 产物与 pET32a 载体质粒双酶切,纯化后加 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜,将酶连产物转化至 *Rosetta* (DE3) 感受态细胞。将重组菌的感受态细胞用无抗性的 LB 液体培养基重悬,于摇床 37 °C,50 r/min 培养 1 小时后涂布在含氨苄抗性的固体平板中,倒置培养 12 h,次日挑取单克隆于 LB 培养基中继续培养,保存菌种后抽提质粒,PCR 方法验证,质粒信息由南京金斯瑞生物科技有限公司测定。

2.2 融合蛋白的诱导表达及纯化

将鉴定成功的重组菌接种于 LB 液体培养基 5 mL 中(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素),37 °C 过夜活化。次日转接于 LB 液体培养基 50 mL 中培养,每 1 小时取样测定 A_{600} ,绘制生长曲线。

根据生长曲线,将重组菌培养 3 h 后,加入乳糖(终浓度 5 mmol/L)后继续 37 °C 培养,分别在培养 0,1,2,3,4,5,6 h 取样,离心收取菌体沉淀,进行 12% SDS-PAGE 分析,观察目的蛋白的位置及表达量。按每克湿菌体加入菌体裂解缓冲液 20 mL 的比例重悬菌体,充分混匀,超声破碎后,于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,分别收集上清液和沉淀,用 12% SDS-PAGE 蛋白电泳检测分析,确定融合蛋白的表达形式。

按每克菌体沉淀湿重加入洗涤液 I (20 mmol/

L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0) 20 mL 的比例溶解包涵体,充分混匀后,12 000 r/min, 4 °C, 离心 20 min, 弃上清液;沉淀再依次用洗涤液 II (以 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解的含 2 mol/L 的尿素溶液)、洗涤液 III (以 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解的含 1% Triton X-100 的溶液)、洗涤液 I、蒸馏水按同样的方法洗涤,弃上清液,留沉淀,取部分沉淀用 12% SDS-PAGE 检测。

洗涤后的包涵体沉淀,每克湿重加入含 8 mol/L 尿素的包涵体溶解液 40 mL, 4 °C 搅拌 6 h 以上,使沉淀变性溶解。12 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀,收集上清液。

将溶解后的目的蛋白上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,过滤后进行镍离子亲和柱纯化,分别用 30 和 300 mmol/L 咪唑进行洗脱,收集各峰的洗脱液,12% SDS-PAGE 分析目的蛋白的洗脱峰。收集的含高纯度目的蛋白的上清液在不断搅拌的情况下缓慢滴加到分别含 6、4、3、2、1、0 mol/L 尿素的复性缓冲液(5% 甘油,1% L 型精氨酸,2% 甘氨酸,尿素,使用 1 × PBS 溶解)中进行透析复性。

将复性蛋白溶液 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀,收集上清液。上清液用 4 °C 预冷的蒸馏水透析,每隔 4 小时换一次液,4 °C 条件下透析 24 ~ 48 h,用 AgNO₃ 溶液检测透析液,直至无白色沉淀方可确定透析完毕。除盐后的蛋白溶液冻干保存。

2.3 中性粒细胞提取

采用眼眶静脉丛取血法于抗凝管中各采集新鲜小鼠外周血 3 mL,上下颠倒以防凝血。将中性粒细胞分离液 3 mL 加至干净的离心管,再加入 80% 浓度的细胞分离液 1.5 mL,形成梯度界面。沿离心管壁缓慢地将等体积已加入红细胞沉降液的抗凝血小心加至分离液的上层。室温条件下,水平离心机离心,1 690 r/min 离心 30 min。离心后可见不同的分层,小心吸去离心后的上两层(血浆层和单个核细胞层),并将第 3 层(含中性粒细胞的混浊分离层与少量红细胞层)转移至另一干净的离心管中。于新离心管中加入不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 HBSS (D-Hank's) 液 10 mL,上下颠倒数次,轻吹悬浮细胞。1 690 r/min 离心 5 min 后弃上清液,在管底加入红细胞裂解液 3 mL 裂解残余的红细胞,上下吹打混匀,裂解 1 min,1 690 r/min 离心

10 min。直至裂解完全后,加入 PBS 及基础培养基 2 mL,重悬沉淀,1 690 r/min 离心 5 min 洗涤。离心后用完全培养基重悬细胞,将提取后的中性粒细胞瑞氏染色,显微镜下观察并计数不同视野中中性粒细胞,统计分析其纯度。

2.4 佛波酯(PMA)诱导 NETs 形成

调整分离所得的外周血中性粒细胞浓度至每毫升 1×10^6 个细胞。将细胞重悬后转至无菌全黑 96 孔酶标板,每孔 200 μL。在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 0.5 ~ 1 h 静置处理细胞,空白组加 DMSO 10 μL,各实验组加 PMA (终浓度 80 μmol/L) 10 μL, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 h。

2.5 融合蛋白降解 NETs 活性

诱导 NETs 形成后,将 DNase I 溶液(终浓度为 50, 100, 200 μg/mL)或 NaCl 溶液(DNase I 的溶剂)加入到 PMA 刺激后的中性粒细胞孔中,DMSO 对照组中加入同等体积的 NaCl 溶液,每个梯度重复 3 个复孔。加入 SytoxGreen 0.2 μL,避光反应 15 min 后,荧光酶标仪检测荧光强度(RFU, E_x : 485/20, E_m : 528/20)。根据荧光强度检测融合蛋白对 NETs 的降解活性。

同时,提取的中性粒细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基稀释,细胞按每孔 5×10^5 个细胞接种至预先置入多聚赖氨酸处理的无菌玻璃片的 24 孔板。加入 PMA 诱导 NETs 形成,再加入终浓度为 200 μg/mL 的融合蛋白,轻微摇动混匀后置于培养箱中培养 20 min。培养结束后取出细胞爬片,DAPI 避光染色 5 min,荧光显微镜观察融合蛋白降解 NETs 情况。

2.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析和统计,采用单因素方差分析组间差异, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 *E. coli* Rosetta (DE3)/pET32a-His-DNase I 的构建

如图 1 所示构建 pET32a-His-DNase I 质粒。提取 pGEM:DNase I 质粒后采用 PCR 方法获得含有 *Nco* I 及 *Xho* I 双酶切位点的 His-DNase I 基因,将其与 pET-32a(+) 用 *Nco* I 及 *Xho* I 双酶切,如图 2。T4 DNA 连接酶过夜连接两片段后转化至

E. coli Rosetta(DE3)感受态中,挑选单克隆。将含有质粒的阳性克隆培养于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 过夜培养 12 h,采用质粒提取试剂盒提取质粒,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,于紫外光下观察电泳结果,与预计大小基本一致。将挑选

的阳性克隆菌的质粒进行双酶切,酶切片段与预计大小一致,如图 3。将挑选的阳性克隆进行测序验证,经比对后所有碱基均与设计的相一致,证实成功构建包含重组质粒 pET32a-His-DNase I 基因工程菌。

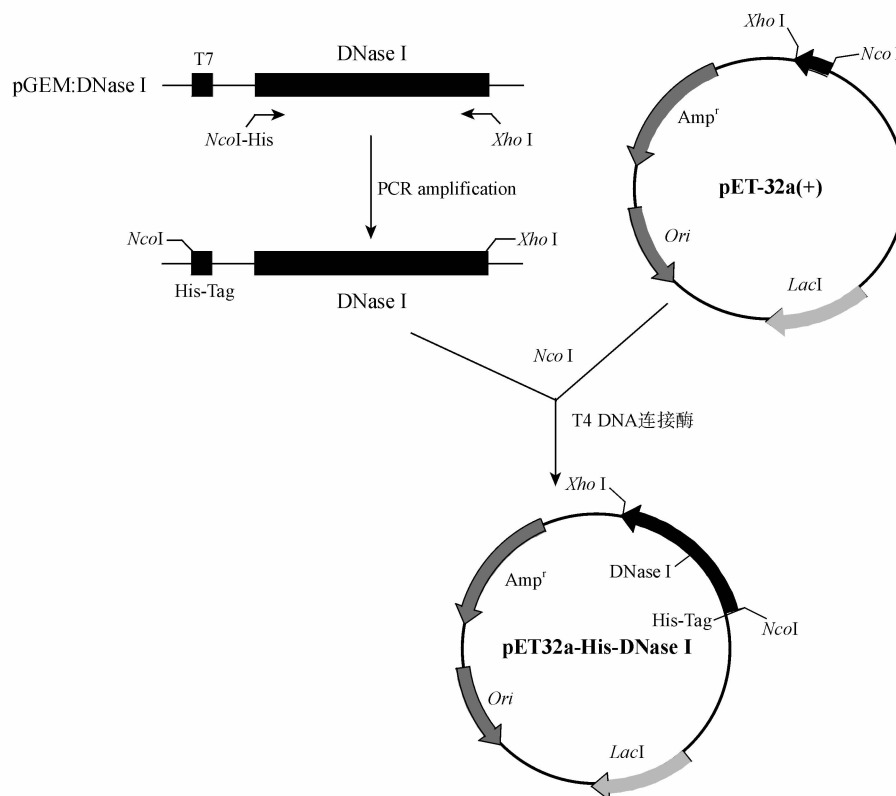


Figure 1 Schematic diagram of the plasmid pET32a-His-DNase I

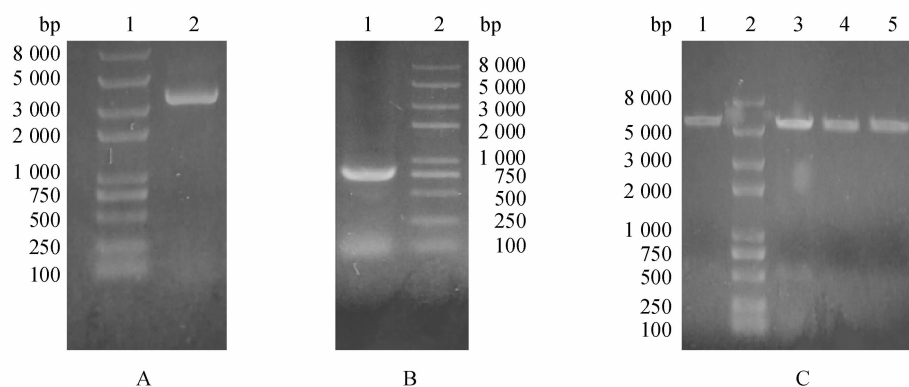


Figure 2 0.8% Agarose electrophoresis analysis of the vector plasmid pGEM:DNase I (A), PCR products (B) and restriction enzyme digestion of plasmid pET-32a(+) (C)

(A) Lane 1: DNA molecular weight standards; Lane 2: Plasmid pGEM:DNase I; (B) Lane 1: PCR product of DNA fragment amplified by P1 and P2 primers; Lane 2: DNA molecular weight standards; (C) Lane 1: Complete plasmid of pET-32a(+); Lane 2: DNA molecular weight standards; Lane 3: pET-32a(+) single digested by NcoI; Lane 4: pET32a-His-DNase I single digested by XhoI; Lane 5: pET-32a(+) double digested by NcoI and XhoI

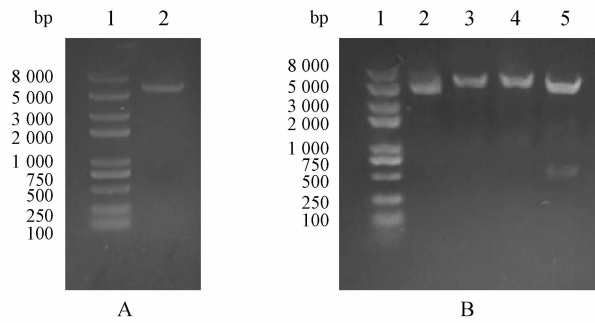


Figure 3 0.8% Agarose electrophoresis analysis of plasmid pET32a-His-DNase I

(A) Lane 1: DNA molecular weight standards; Lane 2: Recombinant plasmid pET32a-His-DNase I; (B) Lane 1: DNA molecular weight standards; Lane 2: Recombinant plasmid pET32a-His-DNase I; Lane 3: pET32a-His-DNase I single digested by *Nco*I; Lane 4: pET32a-His-DNase I single digested by *Xho*I; Lane 5: pET32a-His-DNase I double digested by *Nco*I and *Xho*I

3.2 His-DNase I 融合蛋白的表达与纯化

根据测定的 A_{600} , 绘制工程菌的生长曲线(图 4)。乳糖诱导表达融合蛋白, 经 12% SDS-PAGE 分析, 目的蛋白条带在 50 kD 附近, 且在诱导 4 h 时表达量最高, 通过 Bandscan 软件分析融合蛋白

的表达量可达菌体总蛋白量的 50% (图 5-A)。诱导表达后的菌体经超声破碎裂解后, 分别取上清液和沉淀进行 12% SDS-PAGE 分析。结果表明, 重组蛋白 His-DNase I 绝大部分是以包涵体形式存在于沉淀中(图 5-B)。将超声破碎后的菌体沉淀用 8 mol/L 尿素溶解, 经镍柱亲和色谱, 对洗脱液进行分析, 结果表明融合蛋白在咪唑浓度为 300 mmol/L 时被洗脱(图 5-C)。经复性后, 该蛋白于 50 kD 处有明显条带(图 5-D)。

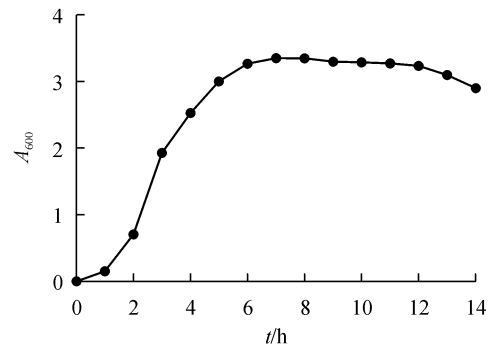


Figure 4 Growth curve of *E. coli* Rosetta(DE3)/pET32a-His-DNase I

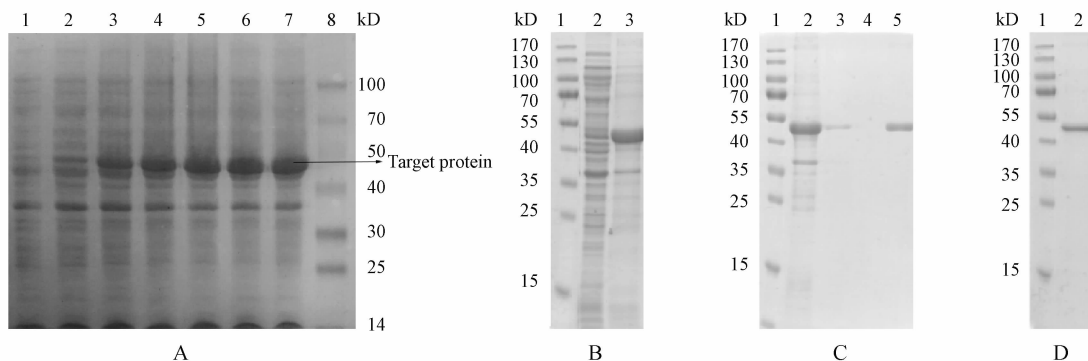


Figure 5 12% SDS-PAGE analysis of the fusion protein His-DNase I

(A) 12% SDS-PAGE analysis of the expression levels of fusion protein His-DNase I induced by lactose for different time; Lane 1-7: Total protein of *E. coli* Rosetta(DE3) transformed with His-DNase I induced with lactose for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h, respectively; Lane 8: Protein marker; (B) 12% SDS-PAGE analysis of expression pattern of His-DNase I; Lane 1: Protein Marker; Lane 2: Supernatant of the lysate of *E. coli* Rosetta(DE3) transformed with pET32a-His-DNase I; Lane 3: Precipitate of the lysate of *E. coli* Rosetta(DE3) transformed with pET32a-His-DNase I; (C) 12% SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein His-DNase I purification with different concentration of imidazole; Lane 1: Protein marker; Lane 2-3: Proteins flow through from Ni Sepharose; Lane 4-5: Gradient elution with 30, 300mmol/L of imidazole, respectively; (D) 12% SDS-PAGE analysis of the renaturation of recombinant protein His-DNase I; Lane 1: Protein marker; Lane 2: Renaturation renaturation of recombinant protein His-DNase I

3.3 His-DNase I 融合蛋白降解 NETs 活性

NETs 形成过程中, 会释放出大量胞内染色质, 因此可以通过 DNA 荧光强度来检测 NETs 水平。

提取小鼠外周血中性粒细胞, 分析其纯度为 90%, 经 PMA 刺激形成 NETs。如图 6 所示, 中性粒细胞在 PMA 刺激后产生的游离 DNA 水平显著高于溶剂 DMSO 组, 加入不同浓度梯度的 His-

DNase I, DNA 荧光强度降低, 说明 PMA 有效诱导中性粒细胞体外形成 NETs, His-DNase I 能以浓度依赖性的方式降解 NETs 的 DNA 骨架。

提取的中性粒细胞接种于 24 孔板制备细胞爬片。加入 PMA 诱导 NETs 形成, 再加入 His-DNase I 融合蛋白, DAPI 染色后荧光显微镜观察, 可以明显看到经 PMA 刺激形成的 NETs 网状结构能够有效

地被 His-DNase I 降解(图7)。

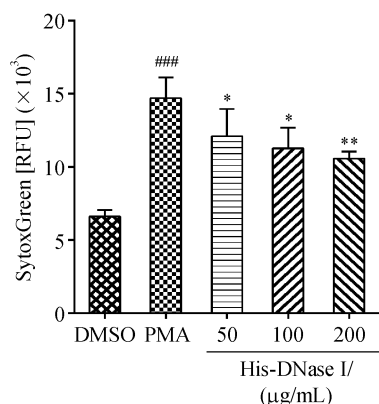


Figure 6 Degradation activity of His-DNase I on neutrophil extracellular traps (NETs) *in vitro* detected by SytoxGreen

PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate; DMSO: Dimethyl sulfoxide

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PMA; ### $P < 0.001$ vs DMSO group

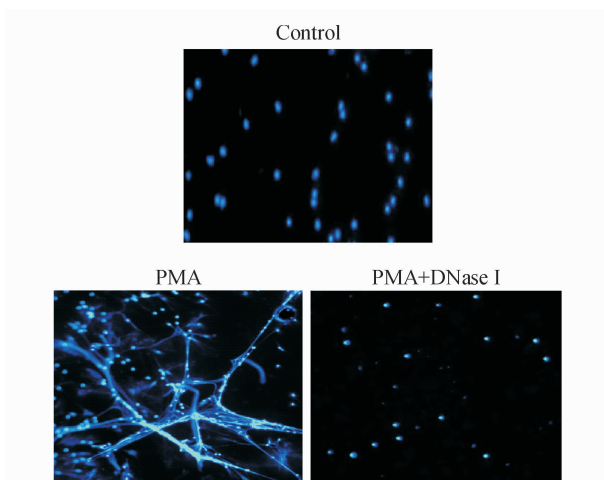


Figure 7 Degradation activity of His-DNase I on NETs *in vitro* detected with fluorescence microscopy

4 讨论

NETs 相关自身免疫性疾病的病理研究表明,在炎症反应期内,体液中 NETs 水平升高^[20]。DNA 是 NETs 的主要结构成分,且 NETs 中的 DNA 能以游离状态存在于人体外周血中,表现形式为 cf-DNA/NETs (neutrophil-derived circulating free DNA)。在各种炎性病理学中观察到 NETs 与血浆和血清等体液中 cf-DNA 水平具有相关性^[21-23]。因此,cf-DNA 可用作 NETs 的替代标记物,而 DNA 水平的测定可有助于监测疾病活动和评估治疗策略的有效性。Margraf 等^[24]建立了血浆 cf-DNA/NETs 快速定量的检测方法(Quant-iT PicoGreen

dsDNA assay),能够特异地检测血浆中来自中性粒细胞的 cf-DNA/NETs。Cf-DNA 能通过多种机制介导炎症反应^[25],但可被 DNase 降解^[22]。鉴于 NETs 在多种免疫疾病的发病机制中发挥作用, DNase I 作为 NETs 的负性调节因子,为研究自身免疫性疾病的病理生理机制、预防或延缓炎性期组织病理性损伤提供了新思路。

由于天然提取法原料来源的限制以及产品品质的批间差异较大,因此利用工程菌或工程动植物细胞高效表达 hDNase I 具有很大的优势。大肠埃希菌表达系统具有成本低、遗传背景清楚、表达量高和表达产物分离纯化相对简单等优点^[26]。本实验采用大肠埃希菌表达系统,通过分子生物学方法设计和构建含有 DNase I 基因的表达载体 pET32a-His-DNase I,经过乳糖诱导,融合蛋白以包涵体的形式表达,表达量较高。本次实验通过添加组氨酸标签进行蛋白的纯化,充分利用了组氨酸标签系统缩短蛋白分离纯化时间、增强融合蛋白稳定性的优势,经镍柱亲和色谱纯化后,融合蛋白的纯度也较高。

生理性的 DNase I 在降解坏死细胞的染色质方面起到关键作用^[27]。高浓度 DNase I (5 mg/mL) 可以完全降解 NETs,但这个浓度远远高于生理性 DNase I 浓度 (20 ng/mL)^[28]。本研究通过分离小鼠外周血中性粒细胞在体外刺激形成 NETs,加入 DNase I 后检测游离 DNA 水平的方法判断其活性。结果表明,融合蛋白 DNase I 在高于 20 µg/mL 浓度时能显著地在体外降解 NETs 的 DNA 骨架,表现出较高的酶活性。可见在生理环境下 DNase I 活性不足时通过补充外源性的 DNase I 具有一定可行性。但由于大肠埃希菌表达的蛋白是未糖基化的,虽然具有降解活性,但是未明确糖基化及活性之间的关系。此外,有研究表明目的蛋白添加组氨酸标签可能会影响到其生物活性^[29],因此后续的研究将验证此标签对 DNase I 活性的影响。

本研究为进一步探究 DNase I 用于 NETs 相关自身免疫疾病的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes[J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 657-670.
- [2] Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J].

- Science*, 2004, **303**(5663): 1532–1535.
- [3] Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**: 577–582.
- [4] Jorch SK, Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nat Med*, 2017, **23**(3): 279–287.
- [5] Merza M, Hartman H, Rahman M, et al. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2015, **149**(7): 1920–1931.
- [6] Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, **13**(S1): S82–S91.
- [7] Clark S R, 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.
- [8] Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease[J]. *Nat Med*, 2016, **22**(2): 146–153.
- [9] Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing[J]. *Nat Med*, 2015, **21**(7): 815–819.
- [10] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, **107**(36): 15880–15885.
- [11] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, **122**(7): 2661–2671.
- [12] Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity[J]. *Blood*, 2012, **120**(15): 3007–3018.
- [13] Simon D, Simon HU, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases[J]. *Allergy*, 2013, **68**(4): 409–416.
- [14] Zhou Z, Zhu C, Ren J, et al. A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **740**: 88–92.
- [15] Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps[J]. *Sci Transl Med*, 2016, **8**(361): 361ra138.
- [16] Wen F, Shen A, Choi A, et al. Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(14): 4256–4266.
- [17] Cedervall J, Zhang Y, Huang H, et al. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals[J]. *Cancer Res*, 2015, **75**(13): 2653–2662.
- [18] Sayah DM, Mallavia B, Liu F, et al. Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, **191**(4): 455–463.
- [19] Macanovic M, Sinicropi D, Shak S, et al. The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice; studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone[J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, **106**(2): 243–252.
- [20] Stavros G, Sinuhe H, Paul H. “The NET outcome”: are neutrophil extracellular traps of any relevance to the pathophysiology of autoimmune disorders in childhood[J]? *Front Pediatr*, 2016, **4**: 97.
- [21] Chowdhury CS, Giaglis S, Walker UA, et al. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, **16**(3): R122.
- [22] Chanchal SC, Hahn S, Hasler P, et al. Elevated levels of total cell-free DNA in maternal serum samples arise from the generation of neutrophil extracellular traps[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2016, **40**(4): 263–267.
- [23] Wang Y, Xiao Y, Zhong L, et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with β -cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2014, **63**(12): 4239–4248.
- [24] Margraf S, Lögters T, Reipen J, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (CF-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis[J]. *Shock*, 2008, **30**(4): 352–358.
- [25] Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis[J]. *Crit Care*, 2012, **16**(4): R151.
- [26] Lebendiker M, Danieli T. Production of prone-to-aggregate proteins[J]. *FEBS Lett*, 2016, **588**(2): 236–246.
- [27] Vogel B, Shinagawa H, Hofmann U, et al. Acute DNase I treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, **110**(2): 1–15.
- [28] Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process[J]. *J Immunol*, 2013, **191**(5): 2647–2656.
- [29] Horchani H, Ouertani S, Gargouri Y, et al. The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*[J]. *J Mole Catal B Enzymatic*, 2009, **61**(3/4): 194–201.