

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.02.003

中性粒细胞胞外诱捕网与肝癌关系的研究进展

张金金 周燕萍 胡作为

【摘要】 中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 是由解聚的染色质和颗粒蛋白组成的网状结构。NET 的形成过程被称为中性粒细胞炎性凋亡 (NETosis), 它被认为是从垂死的中性粒细胞中排出以捕获和杀死病原微生物。NET 与肝癌、胃癌、肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤密切相关。近年来, 大量研究表明, 在癌症患者和动物模型中都存在 NET。NET 促进了肿瘤的生长、侵袭、转移以及癌症相关血栓的形成。阻断或破坏 NET 的形成可抑制肿瘤进展和癌症相关血栓的形成。因此, 靶向 NET 可能是一种新的抗肿瘤治疗方法。该文重点阐述了 NET 的形成机制及其在肝癌中的作用。深入了解 NET 在肝癌中的发病机制, 为肝癌治疗提供新思路和新方法。

【关键词】 中性粒细胞胞外诱捕网; 肝癌; 治疗靶点

Research progress on the relationship between neutrophil extracellular traps and liver cancer Zhang Jinjin[△], Zhou Yanping, Hu Zuowei. [△]Hubei University of Chinese medicine, Wuhan 430000, China
Corresponding author, Hu Zuowei, E-mail: 827823053@qq.com

【Abstract】 Neutrophil extracellular traps (NET) are reticular structures composed of depolymerized chromatin and granule proteins. The formation process of NET refers to neutrophil inflammatory apoptosis (NETosis), which is thought to be excreted from dying neutrophils to capture and kill pathogenic microorganisms. NET is closely related to many malignant tumors such as liver cancer, gastric cancer, intestinal cancer and lung cancer. In recent years, more and more studies have shown that NET exists in both cancer patients and animal models. NET promotes tumor growth, invasion, metastasis and cancer-related thrombosis. Blocking or disrupting the formation of NET can inhibit tumor progression and cancer-related thrombosis. Therefore, targeting NET may be a new anti-tumor therapy. In this article, the formation mechanism of NET and its role in liver cancer were reviewed, and the role of NET in the pathogenesis of liver cancer was deeply analyzed, aiming to provide new ideas and treatment methods for liver cancer.

【Key words】 Neutrophil extracellular traps; Liver cancer; Therapeutic target

肝癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一。根据 2020 年全球癌症统计数据显示, 原发性肝癌在全球范围内的新增病例约 90.6 万, 死亡病例约 83 万^[1]。据 2022 年最新统计, 在中国肝癌的发病率和病死率分别占据第四位和第二位^[2]。代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 是肝癌发生的重要危险因素, 其发病率和流行率呈上升趋势, 很可能超过病毒因素成为全球肝细胞癌 (HCC) 患者发病的主要原因^[3]。虽然手术治疗、化学治疗、局部消融、分子靶向治疗等治疗手段显著提高, 但由于早期症状隐蔽、发展快、侵袭强, 肝癌患者平均生存时间仍然很短^[4]。因此, 迫切需要深入了解肝癌发生发展的分子机制, 以提高临床的治疗效果。

中性粒细胞是先天免疫系统的关键参与者。中性粒细胞通过吞噬、脱颗粒、产生活性氧 (ROS) 和中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 等不同机制来捕获或降解入侵的病原体^[5]。然而, 中性粒细胞可以增强循环肿瘤细胞的黏附性, 通过分泌细胞因子和释放 NET, 促进肿瘤的生长和转移^[5]。Brinkmann 等 (2004 年) 首次报道了 IL-8、佛波酯或脂多糖刺激中性粒细胞后形成 NET。NET 是由解聚的染色质和颗粒蛋白组成的网状结构, 具有捕获和杀死病原微生物的作用^[6]。NET 的形成被描述为一种独特的程序性细胞死亡方式, 这一过程被称为中性粒细胞炎性凋亡 (NETosis)^[7]。据报道, NET 在肿瘤生长、转移及癌症相关血栓形成中发挥着重要的作用^[8]。因此, 本研究首先阐述了

基金项目: 武汉市卫生健康委科研项目 (WZ21C11)

作者单位: 430000 武汉, 湖北中医药大学 (张金金, 周燕萍); 430000 武汉, 湖北中医药大学附属武汉市第一医院 (胡作为)

通信作者, 胡作为, E-mail: 827823053@qq.com

NET的形成机制。其次,探讨了NET在肝癌生长、侵袭、转移以及癌症相关血栓形成中的作用。笔者将根据最新的发现总结NET在肝癌中的研究进展,为抗肿瘤治疗提供新的思路和方法。NET作为抗肿瘤治疗的潜在靶点,在未来研究中具有广阔的前景。

一、NET的概述

1. NET结构和形成

Takei等(1996年)首次报道了NET。NET主要是核DNA和颗粒蛋白组成的网状结构,该结构上装饰有中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、髓过氧化物酶(MPO)、组织蛋白酶G(CG)、白细胞蛋白酶3、乳转铁蛋白(LTF)等。高分辨扫描电子显微镜显示,NET由直径为15~17 nm的纤维和25~50 nm聚集复合体的球形结构组成。迄今为止,多项研究已经揭示了NET形成的不同途径。在粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子、脂多糖或补体因子5a(C5a)刺激后,中性粒细胞以ROS依赖的方式释放线粒体DNA产生NET,NET的产生促进了肿瘤进展的转移前生态位^[9]。在金黄色葡萄球菌和佛波酯的刺激下,中性粒细胞核小叶形态消失,核膜破裂,去浓缩的染色质与细胞质和颗粒成分混合,内膜丧失导致细胞器消失,随后释放NET到细胞外空间,它的形成依赖于NADPH氧化酶(NOX)产生的ROS^[10]。在NETosis形成过程中还涉及不同的受体,如Toll样受体(TLR)、NOD样受体、补体受体和趋化因子受体等^[11]。

2. NET形成的机制

2.1 NOX依赖性NETosis

NET的形成过程始于病原体和多种物质的刺激,如佛波酯、抗体、胆固醇晶体、脂多糖、IL类等,这些外来刺激激活中性粒细胞表面的特异性受体,细胞表面受体的激活导致蛋白激酶C(PKC)/Raf/MEK/ERK激酶信号通路的活化和gp91phox磷酸化,促进细胞内钙离子增加,从而激活NOX的活性,随后产生ROS^[12]。ROS的产生触发NE和MPO解离。NE从膜相关复合物解离进入胞浆,并依赖于MPO激活其蛋白水解活性。在细胞质中,NE可结合并降解F肌动蛋白,然后再从嗜天青颗粒转移至细胞核。在那里NE可降解部分核小体组蛋白,促进DNA浓缩。随后,MPO消耗过氧化氢(H₂O₂)生成次氯酸,协同增强染色质解聚。解聚的染色质进入胞质,GSDMD诱导质

膜破裂,驱动染色质排出细胞外空间,导致中性粒细胞死亡,释放出NET。此外,在这个过程中,肽基精氨酸脱亚胺酶4(PAD4)也被激活,在中性粒细胞中PAD4高表达,催化组蛋白精氨酸残基转化为瓜氨酸,导致染色质去浓缩,核肿胀,核膜和质膜通透性增加,核层粘连蛋白形成网状结构,核膜和质膜破裂并释放细胞外DNA^[13-14]。这个过程也称为NOX依赖性NETosis。

2.2 NOX非依赖性NETosis

中性粒细胞在金黄色葡萄球菌、革兰阳性杆菌等刺激下,迅速释放NET,这一过程中中性粒细胞经历了明显的形态变化,表现为多叶细胞核变圆并浓缩,内、外核膜分离,囊泡出芽,囊泡内充满核DNA,然后将DNA释放到细胞外空间。整个过程是一种独特的、快速的,不依赖于NOX的途径。重要的是,在NET释放后,中性粒细胞质膜未破裂,且无核中性粒细胞仍然存活并保持迁移和吞噬能力。此外,在微生物、钙离子载体A23187和离子霉素等刺激下,中性粒细胞表面特异性受体(TLR4、TLR2受体和补体受体3)被激活,与配体结合触发内质网中钙的释放,导致细胞内钙浓度增加,然后打开质膜钙通道,触发了中性粒细胞中线粒体ROS的产生,并激活了小电导钙激活钾离子(SK)通道和PAD4^[10]。PAD4是一种瓜氨酸蛋白酶,它被激活后转移至细胞核,在那里PAD4将精氨酸转化为瓜氨酸,瓜氨酸化的组蛋白所带正电荷减少,降低了组蛋白与带负电荷DNA之间的亲和力,组蛋白从DNA中解离,导致紧密的染色质结构丧失,最后染色质解聚^[15]。这被认为是形成NOX非依赖性NETosis所必需的。此外,中性粒细胞用粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子与脂多糖或C5a联合刺激时,NETosis的形成依赖于线粒体以ROS的方式释放DNA。使用ROS抑制剂二苯基氯化碘盐时,发现在相同条件下中性粒细胞线粒体DNA释放完全阻断。因此,形成这种NET的释放被认为是线粒体NET或者NOX非依赖性NETosis^[16]。

二、NET与肝癌

NASH是发展为肝癌的重要危险因素。据报道,NASH患者血清中NET标志物水平明显升高。van der Windt等(2018年)研究显示,在STAM小鼠模型中,肝脏中可见大量中性粒细胞浸润和NET的形成,NET的释放导致炎性细胞因子产生

和肝癌进展。然而,脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 减少了 STAM 小鼠中浸润性巨噬细胞和炎症因子的产生,抑制 NASH 向肝癌进展。此外,在 NASH 相关的 HCC (NASH-HCC) 中,NET 与幼稚的 CD4⁺T 细胞表面 TLR4 受体相互作用,启动代谢重编程,调节性 T 细胞 (Tr) 分化,重塑免疫抑制微环境,促进 NASH-HCC 的发生和发展。然而,在体内使用 PAD4^{-/-} 小鼠或 DNase I 可阻断 NET 的形成,降低 Tr 细胞的活性,预防 NASH-HCC^[17]。

肝癌是临床常见的恶性肿瘤之一,也是全球癌症死亡的主要原因。Yang 等^[18]在肝癌患者血清和肿瘤组织中观察到 NET 标志物 MPO-DNA 水平明显高于健康对照组。MPO-DNA 是癌症患者无复发生存期和总体生存期的独立预测标志物^[19]。最近相关研究报道,在肝癌患者中,中性粒细胞以线粒体 ROS 依赖的方式形成富含线粒体 DNA 的 NET,这些 NET 可触发肿瘤炎症反应,促进肿瘤细胞侵袭和转移^[20]。然而,NET 对肝癌增殖、侵袭和转移以及癌症相关血栓的形成中的具体机制知之甚少。Tohme 等 (2016 年) 报道,肿瘤细胞可以诱导中性粒细胞释放 NET 促进手术应激后肝脏转移的发生和发展。NET 的主要成分 DNA (NET-DNA) 与肿瘤转移有关。NET-DNA 可能作为一种趋化因子来吸引肿瘤细胞导致远处转移。跨膜蛋白 CCDC25 是肿瘤细胞上的一种 NET-DNA 受体,可感知胞外 DNA,随后激活 ILK- β -parvin-RAC1-CDC42 级联反应,促进肿瘤细胞黏附、增殖和迁移。敲除 CCDC25 基因显著抑制了 NET 对肿瘤细胞的黏附、迁移和细胞骨架重塑。使用 DNase I 处理荷瘤小鼠,防止了 NET 的形成和肝转移的发生^[21]。在小鼠肝脏缺血/再灌注 (I/R) 模型中,血小板 TLR4 以 ERK5/整合素 GP II b/III a 依赖的方式诱导血小板活化和血小板-肿瘤细胞聚集体的形成,促进 NET 捕获循环中的肿瘤细胞和手术应激后的远处转移。敲除 TLR4 可以使小鼠免受肝脏 I/R 模型中 NET 诱导的转移潜能^[22]。在盲肠穿刺不结扎的裸鼠模型中,中性粒细胞释放的 NET 激活了 TGF- β 信号通路,促进肿瘤细胞外渗,并植入肝脏和腹膜中,诱导肿瘤细胞增殖和转移。使用 TGF- β 通路抑制剂 LY2157299 可明显抑制肝脏和腹膜转移^[23]。在体外,肿瘤浸润性中性粒细胞通过糖酵解和磷酸戊糖途径激活 NOX-ROS 信号通路触发 NET 的形成,NET 诱导 HepG2 肿瘤细胞上皮-间充质转化,促进肿瘤细胞侵袭和迁移^[24]。此外,

肝癌细胞来源的 CXCL8/IL-8 以 NADPH 依赖的方式触发中性粒细胞释放 NET,与 NET 相关的 CG 下调了 E-钙黏蛋白的表达,增加体外炎症因子水平,促进肿瘤细胞的侵袭。阻断 PAD4 或抑制 CG,减少了 NET 的形成,削弱了肝癌细胞的侵袭和转移能力^[25]。

门静脉血栓形成是 HCC 患者预后不良的主要因素。据报道,HCC 患者,尤其是门静脉癌栓和肝外转移患者血清中 MPO-DNA 水平明显高于健康对照组,并与肝癌的恶性进展有关^[25]。Seo 等 (2019 年) 在 HCC 合并肝硬化患者中发现,接触系统标志物水平 (XII a) 随着 NET 的形成而逐渐升高,并与肝病严重程度呈正相关,这些标志物被发现是肝癌患者门静脉血栓的重要危险因素。NET 在肝脏 I/R 后激活血小板诱导全升高凝状态,导致远处器官损伤和免疫血栓形成。然而,利用 DNase I 处理小鼠,减少了中性粒细胞浸润,阻止了 NET 的形成,减轻和缓解肝脏 I/R 后全升高凝状态和远处器官微血栓形成^[26]。

三、结 论

最初 NET 被认为是一种捕获和杀死病原微生物的防御系统。然而,近年来相关研究表明,NET 在多种恶性肿瘤进展中发挥重要作用。本文主要阐述了 NET 的形成机制以及其在肝癌中的作用,如上所述,某些外来刺激或细胞因子触发 NET 的形成,NET 可以通过激活下游信号通路促进肿瘤发生发展。另外,NET 可以充当血栓支架,捕获和激活循环中的血小板,促进癌症相关血栓形成。靶向 NET 是一种有前途的抗肿瘤治疗策略。深入了解 NET 在肝癌发生发展中的机制,对抗肿瘤的治疗具有重大意义,为治疗方案的设计和新药物开发提供新思路。然而,目前关于 NET 在肝癌的生长、转移和癌症相关血栓形成的机制屈指可数,在未来需要更多的临床、体内及体外实验进一步研究 NET 与肝癌及其微环境的关系。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin*

- Med J, 2022, 135 (5): 584-590.
- [3] Huang D Q, El-Serag H B, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18 (4): 223-238.
- [4] 刘建军, 刘建国, 刘常林, 等. 如何从源头降低我国肝细胞癌发病率. *新医学*, 2020, 51 (4): 250-253.
- [5] Rayes R F, Vourtzoumis P, Bou R M, et al. Neutrophil extracellular trap-associated CEACAM1 as a putative therapeutic target to prevent metastatic progression of colon carcinoma. *J Immunol*, 2020, 204 (8): 2285-2294.
- [6] Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NET. *J Leukoc Biol*, 2021, 110 (4): 797-808.
- [7] Yousefi S, Stojkov D, Germic N, et al. Untangling "NETosis" from NET. *Eur J Immunol*, 2019, 49 (2): 221-227.
- [8] Poto R, Cristinziano L, Modestino L, et al. Neutrophil extracellular traps, angiogenesis and cancer. *Biomedicines*, 2022, 10 (2): 431.
- [9] Yazdani H O, Roy E, Comerci A J, et al. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth. *Cancer Res*, 2019, 79 (21): 5626-5639.
- [10] Speziale P, Pietrocola G. Staphylococcus aureus induces neutrophil extracellular traps (NET) and neutralizes their bactericidal potential. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 3451-3457.
- [11] Chen T, Li Y, Sun R, et al. Receptor-mediated NETosis on neutrophils. *Front Immunol*, 2021, 12: 775267.
- [12] Ronchetti L, Boubaker N S, Barba M, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40 (1): 231.
- [13] Zhu D, Zhang Y, Wang S. Histone citrullination: a new target for tumors. *Mol Cancer*, 2021, 20 (1): 90.
- [14] Thiam H R, Wong S L, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (13): 7326-7337.
- [15] Thiam H R, Wong S L, Wagner D D, et al. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36: 191-218.
- [16] Klopff J, Brostjan C, Eilenberg W, et al. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (2): 559.
- [17] Wang H, Zhang H, Wang Y, et al. Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 2021, 75 (6): 1271-1283.
- [18] Yang L Y, 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.
- [19] Kaltenmeier C T, Yazdani H, van der Windt D, et al. Neutrophil extracellular traps as a novel biomarker to predict recurrence-free and overall survival in patients with primary hepatic malignancies. *HPB (Oxford)*, 2021, 23 (2): 309-320.
- [20] Yang L Y, Shen X T, Sun H T, 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.
- [21] Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis *via* CCDC25. *Nature*, 2020, 583 (7814): 133-138.
- [22] Ren J, He J, Zhang H, et al. Platelet TLR4-ERK5 axis facilitates NET-Mediated capturing of circulating tumor cells and distant metastasis after surgical stress. *Cancer Res*, 2021, 81 (9): 2373-2385.
- [23] Xia X, Zhang Z, Zhu C, et al. Neutrophil extracellular traps promote metastasis in gastric cancer patients with postoperative abdominal infectious complications. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 1017.
- [24] Jiang Z Z, Peng Z P, Liu X C, et al. Neutrophil extracellular traps induce tumor metastasis through dual effects on cancer and endothelial cells. *Oncimmunology*, 2022, 11 (1): 2052418.
- [25] Guan X, Lu Y, Zhu H, et al. The crosstalk between cancer cells and neutrophils enhances hepatocellular carcinoma metastasis *via* neutrophil extracellular traps-associated cathepsin G component: a potential therapeutic target. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 451-465.
- [26] Zhang H, Goswami J, Varley P, et al. Hepatic surgical stress promotes systemic immunothrombosis that results in distant organ injury. *Front Immunol*, 2020, 11: 987.

(收稿日期: 2022-09-25)

(本文编辑: 杨江瑜)