

中性粒细胞外诱捕网在肿瘤形成过程中的作用机制研究

吴德海¹, 张树庚¹, 刘连新^{1,2}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江哈尔滨 150081;

2. 中国科学技术大学生命科学与医学部, 附属第一医院(安徽省立医院), 安徽合肥 230001)

摘要: 中性粒细胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是一种来源于中性粒细胞的DNA网状结构,能够捕获和杀死病原微生物,从而在宿主防御中发挥重要作用.越来越多的证据表明NETs与肿瘤的进展密切相关,且能够通过多种方式促进肿瘤的复发转移.其临床意义也逐渐突显出来.本综述重点阐述促癌微环境中NETs的形成及促进肿瘤复发转移的机制,并对NETs临床应用价值进行探究.

关键词: 中性粒细胞外诱捕网;肿瘤;机制

中图分类号: R730.2 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2018.10.002

引用格式: 吴德海,张树庚,刘连新. 中性粒细胞外诱捕网在肿瘤形成过程中的作用机制研究[J]. 中国科学技术大学学报,2018,48(10):781-784.

WU Dehai, ZHANG Shugeng, LIU Lianxin. The role of neutrophil extracellular traps in the tumor progression[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2018,48(10):781-784.

特
约
评
述

The role of neutrophil extracellular traps in the tumor progression

WU Dehai¹, ZHANG Shugeng¹, LIU Lianxin^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China;

2. The First Affiliated Hospital of USTC(Anhui Provincial Hospital), Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China)

Abstract: Neutrophil extracellular traps (NETs) are neutrophil-derived DNA structures. They have been shown to trap and kill microorganisms, playing a critical role in host defense. Increasing evidence has shown that NETs have a close relationship with tumor progression. And their contribution to tumor recurrence and metastasis has been demonstrated in a number of studies. Furthermore, the clinical significance of NETs has also been highlighted. In this review, emphasis was laid on the mechanism of the formation of NETs and their role in tumor progression in a cancer promoting microenvironment. In addition, the clinical value of NETs was also explored.

Key words: neutrophil extracellular traps (NETs); tumor; mechanism

收稿日期: 2018-09-06; 修回日期: 2018-09-26

作者简介: 吴德海,男,1988年生,博士生.研究方向:肝癌发生发展的分子机制. E-mail: tianxiadiyi_12345@126.com

通讯作者: 刘连新,教授,主任医师,博士生导师,中国科学技术大学生命科学与医学部副部长兼附属第一医院党委副书记、副院长.中组部“万人计划”领军人才,教育部“长江学者特聘教授”,科技部“中青年科技创新领军人才”,教育部“创新团队发展计划”负责人,荣获“国之名医·优秀风范”称号.担任中华医学会外科学会委员、实验外科学组副组长,中国医师协会外科医师分会委员、肝脏外科医师专业委员会副主任委员等.主要从事肝胆胰肿瘤研究.以通讯作者身份在Hepatology, Gut等期刊发表SCI论文50余篇. E-mail: liulx@ustc.edu.cn



0 引言

中性粒细胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是一种以中性粒细胞释放的粘性去聚集状态的染色质为骨架、多种炎症细胞作为填充物的细胞外网状结构,能够提高炎症细胞,尤其是中性粒细胞,对特异性抗原的识别和捕获能力^[1].NETs自2004年被首次报道以来,已被证实与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、糖尿病等多种疾病的发生发展密切相关^[2].2013年,Zychlinsky团队^[3]首次在尤文肉瘤的研究中发现了NETs,并证明NETs与肿瘤的早期复发密切相关,可以作为预示肿瘤患者不良预后的重要指标.越来越多的研究证明NETs能够促进肿瘤的复发转移及肿瘤相关的血栓形成^[4].尽管NETs是肿瘤研究的一个新领域,但或许能够为肿瘤的早期诊断和治疗提供新的思路.本综述将根据近几年的研究阐述NETs在肿瘤相关背景条件下的形成和促癌机制,以及在肿瘤诊断和治疗方面的应用价值.

1 在肿瘤相关的背景条件下 NETs 的形成机制

NETs的形成过程被认为是一种区别于坏死和凋亡的细胞死亡方式.在炎症疾病中,这种死亡方式至少包括两种机制:一种是溶细胞自杀性死亡;一种是非致死性机制,不需要细胞破裂.在炎症疾病中,NETs主要依赖细菌、真菌、活化的血小板等多种抗原的刺激^[4];而在肿瘤等非炎症性疾病中,NETs的形成则更多依赖促癌微环境和肿瘤细胞的刺激.

缺血再灌注损伤(ischemia and reperfusion injury, IRI)是肝脏肿瘤复发转移的促进因素. IRI过程中形成的局部低氧环境能够诱发无菌炎症反应,这也是NETs形成的重要促进因素:一方面IRI能够通过刺激肝窦上皮细胞释放大量IL-33,通过与中性粒细胞表面受体ST2结合,促进NETs的形成^[5];另一方面IRI能够诱发肠道菌群失调,并释放大量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[6],LPS也是NETs形成的重要刺激因素^[7].非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)也是肝癌的重要风险因素之一,NASH患者间质中也发现了NETs^[8],这表明间质中大量胶原和脂质沉积也是NETs形成的重要诱因.

肿瘤细胞也可以通过多种方式促进NETs的

形成.在胰腺癌的研究中,发现胰腺癌细胞能够通过RAGE介导的自噬依赖通路促进NETs的形成^[9];同时胰腺癌细胞也能通过激活血小板,通过反应活性氧(reactive oxygen species, ROS)非依赖途径促进中性粒细胞释放DNA形成NETs^[10].肿瘤细胞也可以通过释放细胞因子促进NETs的形成^[11].Monteiro团队^[12]还发现乳腺癌细胞可以通过释放外泌体促进NETs的形成.

2 NETs 促进肿瘤发生发展的机制

近5年来,许多研究都报道了NETs与肿瘤的形成以及肿瘤相关血栓形成密切相关^[13];促进肿瘤形成的机制报道较少.目前研究表明,NETs主要参与促进肿瘤转移灶的形成.

首先,NETs的骨架是一种粘性去聚集状态的网状结构,能够捕获循环中的肿瘤细胞,并帮助肿瘤细胞锚定在组织中,从而促进转移灶的形成^[14].研究中,共聚焦和电子显微镜下均直接观察到了NETs网状DNA结构直接与肿瘤细胞的细胞膜接触,而中性粒细胞似乎不能与肿瘤细胞直接接触,由此提示循环中的肿瘤细胞种植于组织中,主要依赖于NETs网状DNA的诱捕功能^[7].同时也有研究发现这种诱捕功能是通过表达于NETs和肿瘤细胞表面的 $\beta 1$ 整合蛋白实现的^[15].NETs其他组分中也包含多种具有促癌功能的蛋白和多肽,例如MMP9,CG和NE等^[7].值得注意的是,NETs能够提供适宜的微环境,促进抗原捕获并被转运至邻近富含抗菌蛋白和多肽的区域,利于抗原的清除.而这一机制在恶性肿瘤的背景下,则有利于肿瘤细胞接触更多活性蛋白,从而利于自身的增殖和侵袭转移.

其次,NETs也能够通过分泌促癌因子促进被捕获并种植于组织中的肿瘤细胞快速增殖.NETs中除了DNA网状结构与活性蛋白和多肽,还包含大量中性粒细胞.Tsung团队^[16]在其研究中发现,NETs中被激活的中性粒细胞能够释放HMGB1,通过启动肿瘤细胞TLR9信号通路促进肿瘤增殖.在NETs形成过程中,中性粒细胞释放DNA之后产生了大量的无核细胞体,这些无核细胞体依然保留了中性粒细胞的部分免疫活性.体外抗原特异性细胞-细胞相互作用报告实验提示,这些无核细胞体在促进效应T细胞分化成 $CD4^+$ Th17细胞方面的作用甚至优于中性粒细胞^[17].Th17细胞是血浆中IL-17A的主要来源,而IL-17A在NETs介导的肝

细胞损伤过程中发挥重要作用^[18], 尽管没有直接的证据表明 NETs 能够通过 IL-17A 促进肿瘤形成, 但是 IL-17A 的促癌功能及机制已经被大量研究证实^[19].

此外, 微循环中的 NETs 能够刺激血管内皮细胞, 促使内皮细胞通过内吞机制将 NETs 摄入细胞内^[20]. 内置的 NETs 通过激活 β -catenin 通路和下调细胞间连接蛋白 VE-cadherin 促进血管内皮细胞上皮间质转变 (endothelial-to-mesenchymal transition, EMT), 从而增加了微环境中血管的渗透性^[20]. 这一机制也有利于被 NETs 捕获的肿瘤细胞向组织内转移. Egeblad 团队^[21] 最新研究甚至发现 NETs 能够通过激活整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 信号通路重构层粘连蛋白, 从而唤醒休眠状态的肿瘤细胞, 促进肿瘤的复发转移.

3 NETs 的检测

随着越来越多的证据表明 NETs 能够促进肿瘤细胞的播散和转移, 对 NETs 的检测也更加具有临床意义. 有效的 NETs 检测方法有利于肿瘤的早期筛查、监测复发以及预后的判断. NETs 是血浆中游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 的重要来源之一, 大量研究发现 cfDNA 含量在肿瘤患者的血浆中明显提高^[7], 因此有研究认为 cfDNA 可以作为检测 NETs 的一种方式^[7]. 然而也有少部分肿瘤患者的 cfDNA 中不含有 NETs, 这使得检测 NETs 组分的方法更加具有特异性. 目前至少有 3 种 NETs 组分可以用于 NETs 的检测^[22]. 1 种是 NETs 的 DNA 骨架结构, 可以通过 SYTOX 染色的方式进行检测, 这种染料可以直接插入到游离的 DNA 中, 并且能够进入死细胞, 而不会影响活细胞^[22]. 另 1 种组分是能够用来区分核 DNA 与细菌、线粒体 DNA 的组蛋白^[22]. 此外, 中性粒细胞弹性酶也可以用于检测 NETs, 这种方法可以更加有效地区分中性粒细胞来源的 cfDNA 和其他来源的 cfDNA^[22].

4 针对 NETs 的治疗

Tsung 团队^[8] 在动物研究中发现, 抑制 NETs 能够将 NASH 诱发的肝癌发生率减少 50%. 这表明抑制 NETs 的治疗方法对于肿瘤的早期防治具有重要意义. 抑制 NETs 也逐渐成为研究热点. McCarty 等^[23] 发现活性蛋白 C (activated protein C, APC) 能够通过抑制血小板活性抑制 NETs 的形

成. Horiuchi 等^[24] 发现前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 能够通过刺激中性粒细胞产生 cAMP 抑制 NETs 的形成. Zychlinsky 等^[25] 发现天然化合物四氢异喹啉也能够抑制 NETs 的形成. 这些研究也能够为抑制 NETs 的临床应用提供更多参考.

同时, 针对 NETs 的靶向治疗也能够为肿瘤治疗提供新的思路. 其中在 NETs 形成过程中发挥了重要作用的蛋白精氨酸脱亚胺酶 4 (protein-arginine deiminase 4, PAD4) 便是理想的靶点之一. PAD4 转基因敲除鼠也被广泛用于 NETs 的研究中^[8]. 因此, 针对 PAD4 的小分子抑制剂对于肿瘤的治疗存在着巨大的价值.

5 结论

中性粒细胞一直以来被认为是人体重要的防御机制, 通过 NETs 诱捕和杀灭有害病原体, 而 NETs 也能够为肿瘤细胞的侵袭转移提供良好的微环境. 这就使得中性粒细胞成为了一柄双刃剑. 同时 NETs 也为我们进一步揭示了肿瘤复发转移的机制. 尽管 NETs 促进肿瘤增殖和转移的机制仍不清晰, 但是上述研究表明 NETs 的研究具有重要的临床应用价值, 如针对 NETs 组分的肿瘤早期筛查和风险评估. 同时, NETs 抑制剂在肿瘤的防治方面存在着巨大潜力. 而针对 NETs 形成机制的靶向药物也能够为控制肿瘤复发转移和联合用药提供更多的选择.

参考文献 (References)

- [1] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3):159-175.
- [2] JORCH S K, KUBES P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease [J]. *Nat Med*, 2017, 23(3):279-287.
- [3] BERGER-ACHITUV S, BRINKMANN V, ABED U A, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting [J]. *Front Immunol*, 2013, 4:48.
- [4] ERPENBECK L, SCHON M P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? [J]. *Oncogene*, 2017, 36(18):2483-2490.
- [5] YAZDANI H O, CHEN H W, TOHME S, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(1):130-139.

- [6] ORCI L A, LACOTTE S, DELAUNE V, et al. Effects of the gut-liver axis on ischaemia-mediated hepatocellular carcinoma recurrence in the mouse liver [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(5):978-985.
- [7] COOLS-LARTIGUE J, SPICER J, NAJMEH S, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer progression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(21):4179-4194.
- [8] VAN DER WINDT D J, SUD V, ZHANG H, et al. Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2018, 68(4):1347-1360.
- [9] BOONE B A, ORLICHENKO L, SCHAPIRO N E, et al. The receptor for advanced glycation end products enhances autophagy and neutrophil extracellular traps in pancreatic cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(6):326-334.
- [10] ABDOL RAZAK N, ELASKALANI O, METHAROM P. Pancreatic cancer-induced neutrophil extracellular traps: a potential contributor to cancer-associated thrombosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):487.
- [11] ALFARO C, TEIJEIRA A, ONATE C, et al. Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of neutrophil extracellular traps[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15):3924-3936.
- [12] LEAL A C, MIZURINI D M, GOMES T, et al. Tumor-derived exosomes induce the formation of neutrophil extracellular traps: Implications for the establishment of cancer-associated thrombosis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):6438.
- [13] YANG C, SUN W, CUI W, et al. Procoagulant role of neutrophil extracellular traps in patients with gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11):14075-14086.
- [14] COOLS-LARTIGUE J, SPICER J, MCDONALD B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8):3446-3458.
- [15] NAJMEH S, COOLS-LARTIGUE J, RAYES R F, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(10):2321-2330.
- [16] TOHME S, YAZDANI H O, AL-KHAFAJI A B, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6):1367-1380.
- [17] KRISHNAMOOTHY N, DOUDA D N, BRUGGEMANN T R, et al. Neutrophil cytoplasmic granules induce Th17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma[J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(26):4747.
- [18] TOHME S, YAZDANI H O, SUD V, et al. Computational analysis supports IL-17A as a central driver of neutrophil extracellular trap-mediated injury in liver ischemia reperfusion[J]. *J Immunol*, 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1800454.
- [19] CALCINOTTO A, BREVI A, CHESI M, et al. Microbiota-driven interleukin-17 producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4832.
- [20] PIETERSE E, ROTHER N, GARSEN M, et al. Neutrophil extracellular traps drive endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(7):1371-1379.
- [21] ALBRENGUES J, SHIELDS M A, NG D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice[J]. *Science*, 2018, 361(6409):eaao4227; doi: 10.1126/science.aao4227.
- [22] HONDA M, KUBES P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(4):206-221.
- [23] HEALY L D, PUY C, FERNANDEZ J A, et al. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo[J]. *J Bio Chem*, 2017, 292(21):8616-8629.
- [24] SHISHIKURA K, HORIUCHI T, SAKATA N, et al. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(2):319-313.
- [25] MARTINEZ N E, ZIMMERMANN T J, GOOSMANN C, et al. Tetrahydroisoquinolines: New inhibitors of neutrophil extracellular trap formation[J]. *Chembiochem*, 2017, 18(10):888-893.