

中性粒细胞胞外诱捕网在消化道癌症中的研究进展*

党春萍^{1,2} 张百红^{1**}

¹中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院肿瘤科, 兰州 730050; ²甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000

[摘要] 中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 是中性粒细胞释放的一种纤维网状结构, NETs 的形成过程是中性粒细胞的炎症细胞死亡方式, 称之为 NETosis。近年研究发现, NETs 能够通过多种方式促进肿瘤的发生、发展, 与多种恶性肿瘤的进展和转移密切相关, 而我国消化道癌症的发病率和死亡率不断升高, 本文将对 NETs 的形成及其在消化道癌症中的作用进行综述。

[关键词] 中性粒细胞胞外诱捕网; 胞外诱捕网形成; 消化道癌症

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.01.019

Recent Advances in Understanding Neutrophil Extracellular Traps in the Context of Gastrointestinal Cancer

Dang Chunping^{1,2}, Zhang Baihong^{2**}

¹The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of People's Liberation Army, Lanzhou 730050; ²Department of Oncology, the First Clinical Medical School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000

** Corresponding author: Zhang Baihong, email: bhzhang1999@126.com

[Abstract] Neutrophil extracellular traps (NETs) constitute fibrous structures released by neutrophils, with the formation process termed NETosis. Emerging research has unveiled the multifaceted role of NETs in promoting the genesis and development of cancer through diverse mechanisms. Significantly, their close association with the progression and metastasis of various malignant cancers has been established. Meanwhile, the escalating morbidity and mortality rates of gastrointestinal cancers in China underscore the pressing need for a comprehensive understanding of NETs in the context of digestive tract malignancies. This paper systematically reviews the intricate process of NET formation and its pivotal role in the landscape of digestive tract cancers.

[Key words] Neutrophil extracellular traps; NETosis; Gastrointestinal cancer

中性粒细胞是机体诱捕和杀死病原体的第一道防线, 在先天免疫和适应性免疫中起重要作用^[1-2]。中性粒细胞胞外诱捕网 (Neutrophil extracellular traps, NETs) 是中性粒细胞释放到胞外的一种纤维网格样结构^[3]。与多种恶性肿瘤的增殖、侵袭及转移密切相关, 发挥抗肿瘤或促肿瘤活性, 有望成为新的预后标志物及潜在的治疗靶点^[4]。消化系统癌症的发病率和死亡率在全球均位居第一, 其中结直肠癌、胃癌、肝癌均排名前十^[5]。我国的消化道肿瘤的发病率和死亡率亦呈不断升高趋势。因此, 本文就 NETs 的形成及其在消化道肿瘤中作用的研究进展进行综述。

1 NETs 概述

1.1 NETs 的结构

NETs 的主要成分为组蛋白和 DNA, 其次是颗

粒酶和多肽, 包括中性粒细胞弹性蛋白酶 (Neutrophil elastase, NE)、基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO)、组织蛋白酶 G (Cathepsin G, CG)、白细胞蛋白酶 3、明胶酶、溶菌酶 C 以及乳铁蛋白等^[6]。在电镜下, NETs 是一种骨架直径为 15~17 nm, 周围包绕的颗粒蛋白直径约为 50 nm 的超微网状结构, 该骨架能捕获病原体, 颗粒蛋白则杀灭病原体^[7]。

1.2 NETs 的形成

NETs 的形成是一种不同于坏死和凋亡的新型细胞死亡方式。中性粒细胞在佛波酯、脂多糖和白细胞介素-8 等的刺激下, 肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (Peptidyl arginine deiminase 4, PAD4) 通过使组蛋白瓜氨酸化, 抑制 DNA 和组蛋白的结合。NE

* 甘肃省自然科学基金 (22JR5RA007)

** 通讯作者: 张百红, 电子邮箱 bhzhang1999@126.com

转移到细胞核处并作用于组蛋白, 解聚染色质, 与此同时核膜和颗粒膜消失。解聚后的 DNA、瓜氨酸化的组蛋白和颗粒蛋白在细胞质内合成 NETs, 然后被排出细胞外, 这一过程称为 NETosis, 是中性粒细胞的炎症细胞死亡方式^[8-9]。

1.3 NETs 的释放

中性粒细胞释放 NETs 有两种方式, 最为典型的方式是受刺激后释放 NETs 的同时伴随着中性粒细胞的溶解和死亡; 另一种方式是中性粒细胞合成 NETs 后, 通过囊泡排出细胞外, 细胞膜闭锁形成无核的中性粒细胞, 中性粒细胞依然保持吞噬等生物学功能^[10-11]。

NETs 起初被认为只是中性粒细胞诱捕和杀死病原体的一种手段, 后来的研究发现, 在 NETs 过量产生或清除不及时的情况下, 其参与多种疾病的发生发展, 如系统性红斑狼疮、抗中性粒细胞胞浆抗体相关性小血管炎、糖尿病、类风湿性关节炎和囊性纤维病等^[3,6]。此外, NETs 中的多种组分 (MMP-9、NE、CG 和 DNA 骨架等) 可以通过不同机制参与肿瘤侵袭转移, 与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关^[4]。

2 NETs 与结直肠癌

结直肠癌的发病率位列全世界第三位, 是第二大癌症相关死亡原因^[5]。全身炎症所产生的 NETs 与结直肠癌的发生、转移及预后密切相关^[12]。

2.1 NETs 与结直肠癌的发生

结直肠癌患者的中性粒细胞有更大的形成 NETs 的潜力。在 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) 突变的结直肠癌的小鼠模型中, 肿瘤细胞可通过释放白细胞介素-8 诱导中性粒细胞募集和 NETs 形成, 导致 NETs 在结直肠癌组织中高表达^[13]。另一项研究也表明, 与健康志愿者相比, 结肠癌患者的中性粒细胞释放的 NETs 更多, 这可能是因为结直肠癌细胞释放某些可溶性因子到循环中刺激 NETs 形成, 并且发现 NETs 主要分布在结直肠癌原发肿瘤部位和周围边界^[14]。这表明结直肠癌细胞可以刺激 NETs 的形成。

NETs 能够促进结直肠癌细胞的生长。在小鼠结直肠癌模型和结直肠癌的肝转移模型中, 敲除 PAD4 抑制 NETs 形成, 与对照组相比, PAD4 敲除组小鼠的肿瘤体积和表面的肝结节明显减少。提示 NETs 不仅能促进结直肠癌细胞增殖, 也能促进肝转移细胞的增殖。该研究还发现 NETs 通过释放 NE 来增加线粒体的生物合成及细胞氧化磷酸化, 增加癌细胞的能量来促进肿瘤生长。而这种作用能被 NETs 抑制剂所消除^[15]。

2.2 NETs 与结直肠癌的转移与预后

NETs 与较差的肿瘤分期和淋巴结转移有关, 即 NETs 水平越高, 结直肠癌患者的预后越差^[16]。NETs 的增加可促进结直肠癌的肝转移, NETs 的释放可能是中性粒细胞促进结直肠癌肝转移的主要模式^[14,17]。在小鼠模型中, NETs 的抑制剂脱氧核糖核酸酶 I (Deoxyribonuclease I, DNase I) 能够减少结直肠癌患者肝转移^[17]。由此可见, NETs 在结直肠癌转移中发挥着重要作用, 而这种作用可以被 NETs 抑制剂消除, 其机制尚未完全明确。

关于 NETs 促进结直肠癌转移的机制, 一项对 80 例接受根治性切除的结直肠癌患者的研究认为, 术后感染产生的脂多糖可能诱导 NETs 形成, 从而促进了结直肠癌的复发和转移^[18]。另一项研究认为, 体外 NETs 上的癌胚抗原细胞黏附分子 1 是介导结肠癌 - NETs 相互作用的重要黏附分子, 有助于促进小鼠和人结肠癌细胞的体外迁移^[19]。此外, 也有研究认为 NETs 激活结直肠癌细胞中的上皮 - 间质转化 (Epithelial mesenchymal transition, EMT) 过程, 从而促进了结直肠癌的转移^[16]。这些结果提示 NETs 能够通过上述途径促进结直肠癌的进展和转移, NETs 抑制剂能够减少结直肠癌的转移。

高 NETs 的结直肠癌患者预后较差^[12]。因此, NETs 有望成为新的生物标志物, 指导临床治疗。

3 NETs 与胃癌

3.1 NETs 与胃癌的发生发展

胃癌是全球范围内最常见和最具侵袭性的癌症之一, 死亡率排第三位, 且预后差^[5]。

NETs 与胃癌的发生发展及转移密切相关, 瓜氨酸化的组蛋白 H3 (Citrullination histone 3, Cit-H3) 和 MPO-DNA 是 NETs 形成的生物标志物^[20]。对 10 例胃腺癌患者手术标本的免疫荧光激光共聚焦法检测发现, NETs 来源的 NE 和 Cit-H3 在胃癌标本中高表达, 而对照组几乎没有表达; 免疫印迹法分析进一步证实, 与正常切缘相比, NETs 的重要生物标志物 Cit-H3 在胃癌组织中的表达显著高于正常切缘^[21]。另外, 有研究者首次在胃癌患者的肿瘤微环境中发现了 NETs, 从肿瘤组织到肿瘤旁组织, NETs 的数量逐渐减少; 进一步研究发现, 与胃良性疾病患者和健康志愿者相比, 胃癌患者外周血中 NETs 的水平明显升高^[22]。以上研究提示, NETs 在胃癌患者的外周血、肿瘤微环境和肿瘤组织中均表达, 表达水平与肿瘤侵袭及转移正相关, 表明 NETs 促进胃癌的发生和发展。

关于 NETs 促进胃癌发生和发展的作用机制, 一项对 51 例胃癌患者的前瞻性研究发现, 晚期胃癌患者外周血中 NETs 的数量显著增加, 并且与肿瘤分期和转移的风险呈正相关。作用机制是 NETs

诱导 EMT, 促进胃癌转移^[21]。另一项研究发现, 在胃切除术后的患者中, 腹部感染性并发症会刺激中性粒细胞在外周血和腹腔中释放 NETs, 释放的 NETs 促进胃癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT, 这依赖于肿瘤生长因子 β (Tumor growth factor - beta, TGF - β) 信号通路的激活^[23]。

3.2 NETs 与胃癌的转移与预后

人表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor - 2, HER2) 表达是影响胃癌患者预后的重要因素^[24]。为了减弱 HER2 表达对研究的影响, 一项纳入了 68 例 HER2 阴性的接受一线治疗的晚期胃癌患者的研究发现, NETs 是无进展生存期的独立危险因素, 对 HER2 阴性胃癌患者的生存期有显著影响^[22]。DNase I 可通过降解 DNA 来降解 NETs, 是一种强大的抑制剂; PAD4 是将 NETs 释放到细胞外的关键酶, 抑制 PAD4 可抑制染色质解聚, 从而抑制 NETs 释放到细胞外。NETs 这两种抑制剂均可通过调节 B 细胞淋巴瘤 - 2 和核因子 - κ B 通路的表达抑制胃癌细胞凋亡及转移, 消除 NETs 的促肿瘤作用^[25]。说明 NETs 抑制剂在治疗和预防肿瘤转移方面具有一定的价值。因此, 靶向 NETs 可能为胃癌的治疗提供一种策略。

4 NETs 与肝癌

4.1 NETs 与肝癌的发生

近年来, 肝癌的发病率和死亡率均上升^[5]。在肺癌、胰腺癌、乳腺癌等小鼠模型组织中, 中性粒细胞释放 NETs 的能力较强, NETs 呈高表达状态^[26]。在肝癌患者中, NETs 水平也是升高状态^[27]。与健康志愿者相比, 肝细胞肝癌患者的中性粒细胞释放更多的 NETs, 这在人和小鼠的定量分析也得到了验证, 而与无转移的肝癌组织相比, 转移性肝癌患者的 NETs 形成增强^[28]。提示肝癌患者的中性粒细胞有更大的形成 NETs 的潜力, 并且 NETs 与肝癌的转移呈正相关。

4.2 NETs 与肝癌的转移与预后

在脂多糖诱导的 NET 小鼠模型中, 肝和肺中有显著增加的转移灶, NETs 抑制剂 DNase I 能够有效减少肝细胞肝癌在肝和肺的转移灶^[28]。提示 NETs 有促进肝癌转移的作用, 并且这种作用能够被 NETs 抑制剂所破坏。该研究还发现 NETs 通过激活 Toll 样受体 4/9 从而上调环加氧酶 2 的表达, 不仅能捕获肝癌细胞, 而且能增强其侵袭能力, 促进肝癌的转移。同样, 在原发性肝癌合并非酒精性脂肪肝患者的外周血中, NETs 的水平高于肝组织学正常或良性肝病患者的外周血, 抑制 NETs 的形成可抑制非酒精性脂肪性肝炎向肝癌进展^[29]。

术前 NETs 形成的标志物 MPO - DNA 是肝癌无复发生存期和总生存期的独立危险因素, 并且可

以在血清中测量, NETs 水平越高, 肝癌患者预后越差^[30]。因此, NETs 有望作为一种新的生物标志物, 预测原发性肝癌患者的预后。

5 小结与展望

NETs 可促进结直肠癌、胃癌、肝癌等消化道肿瘤的增殖与转移, 且预后差。使用 NETs 抑制剂能够阻断结直肠癌、胃癌和肝癌的进展, NETs 抑制剂的联合使用较单一使用有更好的抗肿瘤效果。因此, 深入探讨 NETs 及其抑制剂在消化道癌症中的作用有重要的意义, 但 NETs 能否在临床中应用, 仍需前瞻性研究进行验证。

参考文献

- [1] Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, et al. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20 (9): 485 - 503.
- [2] 田伊茗, 李涛, 王蕊, 等. 以中性粒细胞与淋巴细胞比值为基础的中老年患者糖尿病肾病的临床预测模型 [J]. *国际老年医学杂志*, 2022, 43 (6): 714 - 719.
Tian YM, Li T, Wang R, et al. Clinical prediction models based on neutrophil to lymphocyte ratio for diabetic nephropathies in middle aged and older patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Geriatr*, 2022, 43 (6): 714 - 719.
- [3] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532 - 1535.
- [4] Mutua V, Gershwin LJ. A review of neutrophil extracellular traps (nets) in disease: potential anti - nets therapeutics [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 61 (2): 194 - 211.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72 (1): 7 - 33.
- [6] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18 (2): 134 - 147.
- [7] Thiam HR, Wong SL, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4 - mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (13): 7326 - 7337.
- [8] Teijeira A, Garasa S, Gato M, et al. CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity [J]. *Immunity*, 2020, 52 (5): 856 - 871. e8.
- [9] Cahilog Z, Zhao H, Wu L, et al. The role of neutrophil NETosis in organ injury: novel inflammatory cell

- death mechanisms [J]. *Inflammation*, 2020, 43 (6): 2021–2032.
- [10] Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, et al. Cellular mechanisms of NETosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36: 191–218.
- [11] Kist M, Vucic D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications [J]. *EMBO J*, 2021, 40 (5): e106700.
- [12] Zhang D, Zhao Y, Wang S, et al. A prognostic model of angiogenesis and neutrophil extracellular traps related genes manipulating tumor microenvironment in colon cancer [J]. *J Cancer*, 2023, 14 (11): 2109–2127.
- [13] Shang A, Gu C, Zhou C, et al. Exosomal KRAS mutation promotes the formation of tumor-associated neutrophil extracellular traps and causes deterioration of colorectal cancer by inducing IL-8 expression [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18 (1): 52.
- [14] Yang L, Liu L, Zhang R, et al. IL-8 mediates a positive loop connecting increased neutrophil extracellular traps (NETs) and colorectal cancer liver metastasis [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (15): 4384–4396.
- [15] Yazdani HO, Roy E, Comerci AJ, et al. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (21): 5626–5639.
- [16] Stehr AM, Wang G, Demmler R, et al. Neutrophil extracellular traps drive epithelial-mesenchymal transition of human colon cancer [J]. *J Pathol*, 2022, 256 (4): 455–467.
- [17] Xia Y, He J, Zhang H, et al. AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14 (11): 2920–2935.
- [18] Wang WW, Wu L, Lu W, et al. Lipopolysaccharides increase the risk of colorectal cancer recurrence and metastasis due to the induction of neutrophil extracellular traps after curative resection [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147 (9): 2609–2619.
- [19] Rayes RF, Vourtzoumis P, Bou Rjeily M, et al. Neutrophil extracellular trap-associated CEACAMI as a putative therapeutic target to prevent metastatic progression of colon carcinoma [J]. *J Immunol*, 2020, 204 (8): 2285–2294.
- [20] Donkel SJ, Wolters FJ, Ikram MA, et al. Circulating myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes as marker for neutrophil extracellular traps (NETs) levels and the association with cardiovascular risk factors in the general population [J]. *PLoS One*, 2021, 16 (8): e0253698.
- [21] Zhu T, Zou X, Yang C, et al. Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48 (1): 127.
- [22] Zhang Y, Hu Y, Ma C, et al. Diagnostic, therapeutic predictive, and prognostic value of neutrophil extracellular traps in patients with gastric adenocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1036.
- [23] Xia X, Zhang Z, Zhu C, et al. Neutrophil extracellular traps promote metastasis in gastric cancer patients with postoperative abdominal infectious complications [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 1017.
- [24] 王青, 杨觅, 陈敏敏. HER2 表达及肿瘤标志物水平与老年胃癌患者预后的关系 [J]. *国际老年医学杂志*, 2022, 43 (05): 525–529.
Wang Q, Yang M, Chen MM. Relationship of human epidermal growth factor receptor 2 and tumor markers with prognosis in older patients with advanced gastric cancer [J]. *Int J Geriatr*, 2022, 43 (5): 525–529
- [25] Li R, Zou X, Zhu T, et al. Destruction of neutrophil extracellular traps promotes the apoptosis and inhibits the invasion of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2, Bax and NF- κ B [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5271–5281.
- [26] Jin W, Yin H, Li H, et al. Neutrophil extracellular DNA traps promote pancreatic cancer cells migration and invasion by activating EGFR/ERK pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (12): 5443–5456.
- [27] Zenlander R, Havervall S, Magnusson M, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 18025.
- [28] Yang LY, Luo Q, Lu L, et al. Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 3.
- [29] van der Windt DJ, 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.
- [30] Kaltenmeier CT, 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 [J]. *HPB (Oxford)*, 2021, 23 (2): 309–320.