

中性粒细胞胞外陷阱与肿瘤的研究进展

王仲杰, 程忠平

(同济大学附属第十人民医院, 上海 200072)

摘要: 中性粒细胞作为机体的第一道防线, 在保护宿主免于感染中具有十分重要的作用, 是循环中最丰富的白细胞。2004 年发现, 中性粒细胞在活化后会释放去凝聚的染色质, 形成中性粒细胞胞外陷阱, 先前研究证明其发生在捕获和杀死细菌和其他病原体的防御机制中。然而越来越多的人认识到其参与恶性疾病的发病和发展。全文综述中性粒细胞胞外陷阱在肿瘤进展、转移和肿瘤相关血栓形成中的作用。

关键词: 肿瘤; 中性粒细胞胞外陷阱; 肿瘤相关性中性粒细胞

中图分类号: R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)01-0058-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.01.B013

Research Progress on Neutrophil Extracellular Traps in Malignant Tumors

WANG Zhong-jie, CHENG Zhong-ping

(Affiliated Shanghai Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: Neutrophils, the most abundant type of leukocytes in the blood, are the first responders to infection and injury, therefore critical for antimicrobial host defense. The activated neutrophils can release neutrophil extracellular traps (NETs) to capture and destroy microbes. Initially, NETs were considered solely an elaborate function of the innate immune system to combat invading microorganisms. However, their involvement in the pathogenesis of malignant diseases has also been recognized. In this review, we describe the roles of NETs in tumor progression, metastasis and tumor-associated thrombosis.

Subject words: malignant tumor; neutrophils extracellular traps; tumor-associated neutrophils

中性粒细胞是机体抵御病原体的第一道防线, 在非特异性细胞免疫系统中起着十分重要的作用, 可以通过多种机制介导宿主防御, 包括吞噬作用、病原体的细胞内杀伤和抗微生物肽和蛋白酶的释放, 同时, 通过释放细胞因子和趋化因子, 并通过抗原提呈编排的先天免疫和适应性免疫反应中起关键作用^[1]。大量研究证实, 中性粒细胞对肿瘤发展也起到一定的促进作用, 在肿瘤患者预后方面也发挥着重要的作用^[2]。2004 年, Brinkmann 等首次提出了中性粒细胞的胞外杀灭病原体的方式, 称为中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs)^[3]。随着

NETs 形成机制的阐明, 作为中性粒细胞在固有免疫应答系统中的方式之一, NETs 与多种疾病相关。最近的几项研究表明, NETs 在肿瘤进展、肿瘤转移和肿瘤相关血栓形成中具有重要作用。

1 中性粒细胞与肿瘤

中性粒细胞已被证实存在于肿瘤微环境中, 其被肿瘤微环境招募后, 释放细胞因子和酶类物质, 以影响肿瘤微环境中炎症细胞的招募和激活。然而, 他们在肿瘤生物学中的作用, 包括肿瘤进展和侵袭仍然存在争议。有大量证据表明中性粒细胞在癌症进展中具有促肿瘤作用^[4]; 然而, 一些研究表明中性粒细胞可以通过激活针对肿瘤的免疫应答和促进肿瘤细胞清除来发挥抗肿瘤作用^[5]。这可能与肿瘤微

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81874104)

通信作者: 程忠平, 主任医师, 教授, 博士生导师; 同济大学附属第十人民医院妇产科, 上海市静安区延长路 301 号 (200072); E-mail: mdcheng@tongji.edu.cn

收稿日期: 2019-04-16; **修回日期:** 2019-06-09

环境中的中性粒细胞的不同活化阶段相关。因此,有研究者提出,中性粒细胞染色质的释放和 NETs 形成可能与其有潜在的关联,可能影响肿瘤发展的不同步骤,包括肿瘤生长、血管生成、转移和免疫抑制。

2 中性粒细胞胞外陷阱形成

中性粒细胞胞外陷阱 (NETs) 是一种由中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 和 DNA-组蛋白复合物组成的细胞外网状结构^[3]。最初的发现将此描述为中性粒细胞区别于凋亡和坏死的一种新的死亡程序^[6],随后报道了 NETs 形成的其他机制,在没有裂解和中性粒细胞死亡的情况下也可以形成类似的结构^[7]。在这个过程中,激活的中性粒细胞核膜溶解,随后质膜崩解,核内容物释放,染色质解凝,载有颗粒蛋白的染色体释放到细胞外空间^[8]。

目前导致 NETs 形成的分子机制仍不十分清楚,最初显示中性粒细胞释放染色质依赖于活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[9]。慢性肉芽肿患者因编码 NADPH 氧化酶基因缺陷,细胞合成活性氧复合物的能力被破坏,从患者体内分离的中性粒细胞不能形成诱捕网结构^[10]。同时,应用 NADPH 氧化酶抑制剂二联苯碘及 NADPH 缺陷小鼠均不产生 NETs。此外,细胞内肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptidylarginine-deiminase 4, PAD4) 是一种在许多癌症和中性粒细胞中高度表达的酶,其对 NETs 形成至关重要^[11-12]。研究证明,骨肉瘤细胞系中的 PAD4 过表达可以使细胞内组蛋白转变成瓜氨酸化的组蛋白,诱导染色质去凝聚和释放。这同样可以通过 PAD4 缺陷型小鼠得到证实^[13]。

目前,通常以免疫荧光染色、免疫印迹法分析组织中细胞外 DNA 和 NETs 不同组分的表达水平和共定位情况;或通过将 Sytox Green 等染料与 DNA 特异性结合,通过 DNA 荧光/分光光度计来证实细胞外 DNA 存在以及含量。

3 中性粒细胞胞外陷阱与肿瘤进展、转移

3.1 NETs 直接促进肿瘤进展

Zychlinsky 等对 8 例尤文肉瘤患者的手术切除标本进行细胞外 MPO 阳性染色发现,2 例患者出现

肿瘤组织内 NETs 的高表达,在经过新辅助化疗和手术后发生早期复发。猜想尤文肉瘤细胞可以刺激肿瘤相关中性粒细胞释放 NETs^[14]。同样, Richardson 等一项研究也发现,与健康志愿者相比,结直肠癌患者体内 NETs 显著性增加^[15]。另外, Jin W 等纳入 317 例患者分为两组行胰腺导管癌根治性胰腺切除术,通过免疫组化染色识别 NETs,结果提示肿瘤浸润 NETs 的胰腺导管腺癌患者的术后生存率较低,这表明 NETs 可能作为胰腺导管腺癌预后不良的标志之一^[16]。Lee W 等在卵巢癌小鼠的网膜和早期卵巢癌的女性中检测到 NETs,而缺乏具有中性粒细胞特异性的 PAD4 的小鼠网膜转移减少,同时使用 PAD4 抑制剂阻断 NETs 形成也减少了网膜定植,这提示 NETs 形成与卵巢癌细胞的转移相关^[17]。上述报道说明, NETs 在多种恶性肿瘤中高度表达,并可能与部分肿瘤的治疗疗效及预后密切相关,但目前没有一项特异性大样本量的研究专注于肿瘤相关 NETs 与肿瘤预后的关系。

3.2 NETs 内含物间接介导肿瘤进展

NETs 由中性粒细胞释放的弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 和 DNA-组蛋白复合物等构成。这些高浓度的抗菌成分绑定、分解并杀灭微生物,能防止潜在的有害蛋白质的扩散,阻止损伤组织附近的炎症反应^[18-19]。在恶性肿瘤中, NETs 可能起类似的作用,使肿瘤细胞暴露于局部高浓度的活性蛋白,有利于相互作用,以促进肿瘤细胞增殖、转移,同时还可以抑制细胞凋亡。

3.2.1 中性粒细胞弹性蛋白酶

中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 是 NETs 的杀菌功能的重要作用因素。中性粒细胞弹性蛋白酶的表达和活性在多种肿瘤中上调。Houghton 等将中性粒细胞与 A549 肿瘤细胞系的共培养导致该肿瘤细胞系的增殖增加,然而,如果使用中性粒细胞弹性蛋白酶(-)中性粒细胞进行共培养实验,则该效应被抑制^[20]。另外, Gaida 在胰腺导管腺癌细胞与多形核白细胞的共培养中也观察到中性粒细胞弹性蛋白酶对肿瘤细胞粘附能力的影响^[21]。Vaguliene 等^[22]研究发现,在肺癌患者血清中性粒细胞弹性蛋白酶升高与疾病状态和疾病进展呈正相关。同时,与慢性阻塞性肺疾病患者相比,肺癌患者的支气管肺泡灌洗液和血清中的中性粒细胞弹性蛋白酶的活性分别高出 3 倍和 5 倍,表明中性粒细胞

弹性蛋白酶可能有助于原发性肿瘤的生长和转移。

3.2.2 基质金属蛋白酶-9

基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 在脱颗粒过程中被中性粒细胞释放, 可以直接促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 促进血管生成, 并可以通过降解细胞外基质, 促进肿瘤细胞远处转移等。在 Acuff 等^[23]研究中发现, 与基质金属蛋白酶-9 阴性小鼠相比, C57 / BL6 小鼠尾静脉注射 Lewis 肺癌细胞后肺转移瘤的数量增加了 81%。而在胰腺癌和 HPV16-驱动皮肤癌的小鼠模型中, 也发现了中性粒细胞来源的基质金属蛋白酶-9 与肿瘤细胞的增殖增加有关^[24]。同时, Masso 等通过将拼贴凝胶上生长的恶性角质形成细胞皮下植入小鼠体内后, 观察到血管结构穿透胶原凝胶并进入覆盖的癌细胞, 染色证明基质金属蛋白酶-9 与宿主中性粒细胞共定位, 而不是与内皮细胞或肿瘤细胞结合, 这表明基质金属蛋白酶-9 可能与血管生成和肿瘤侵袭相关^[25]。另外, Albregues 等^[26]实验发现 NET 组分基质金属蛋白酶-9 参与介导层黏连蛋白的蛋白水解重塑, 激活整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 信号传导以触发休眠癌细胞的增殖, 而其抗体则可以阻止休眠细胞的苏醒。

3.2.3 组织蛋白酶 G

组织蛋白酶 G (cathepsin G, CG) 储存在内肽酶中, 可能有助于肿瘤进展, 以及与肿瘤动物模型和人类肿瘤疾病的转移相关。Yui 等^[27]证明人 MCF-7 乳腺癌细胞系在嗜中性粒细胞存在下培养后自发形成球形细胞聚集体, 而组织蛋白酶 G 的抑制则消除了 MCF-7 细胞的聚集。在人类肺癌中, 组织蛋白酶 G 水平的升高也被证实与肿瘤分期相关, 免疫组化发现这些组织中组织蛋白酶 G 来源于肿瘤相关中性粒细胞^[28]。Wilson 等^[29]的另一项研究也证明组织蛋白酶 G 可能有利于乳腺癌转移小鼠模型中溶骨性骨转移中的血管生成。

4 中性粒细胞胞外陷阱与肿瘤相关性血栓

肿瘤相关血栓形成中 NETs 的发现引起了人们的兴趣。Fuchs 等^[30]发现 NETs 具有网罗血小板和红细胞, 并可以为血栓形成提供网状支架结构, 从而参与血栓的发生和发展。深静脉血栓形成的小鼠模型中其血浆所含有胞外 DNA 水平显著性上升, 将形成

血栓的静脉血管进行荧光染色, 可发现大量 NETs 的主要组分存在。

而在多种不同类型的恶性肿瘤中, 均存在血浆游离 DNA 升高以及循环 NETs 增多, 与自发性血栓形成密切相关。Mélanie Demers 等研究发现, 在荷瘤小鼠中注射低剂量的脂多糖可以增加血浆 NETs 的生成, 并诱导促血栓形成状态^[31], 对荷瘤小鼠的外周中性粒细胞进行分析, 瓜氨酸化组蛋白 H3 水平较高, 而且与正常中性粒细胞相比, 更容易形成 NETs。Boone 等证实 NETs 通过刺激血小板和释放组织因子促进小鼠的高凝状态, NET 抑制剂氯喹可显著性降低血小板聚集^[32]。此外, NETs 产生的血栓形成状态似乎也与 DNA 支架有关, 在注射 LPS 之前用 DNA 酶预处理可阻止荷瘤小鼠中的血栓形成^[33]。研究表明, NETs 形成的生物标志物与癌症患者中血栓的发生有关, 这可能是肿瘤相关性血栓的新的病理机制, 而靶向 NETs 可能会改善肿瘤患者的凝血功能障碍。

5 展望

近来研究表明, NETs 在抗病毒感染、全身性炎症反应、自身免疫性疾病、血栓形成及肿瘤转移方面发挥作用。越来越多的研究表明 NETs 参与肿瘤的发生发展, 但是其对肿瘤多种作用的潜在机制仍有待进一步明确。在肿瘤微环境中发现 NETs 的存在也为开发基于 NETs 检测的诊断工具提供了新的线索。此外, 与微环境中的 NETs 有利于导致肿瘤进展和转移的假设一致, 理所当然地, 破坏 NETs 可能会阻碍这些过程。因此, 降解或抑制 NETs 的药物, 如 DNase 或 NE、PAD4 抑制剂, 是否可以在肿瘤本身或者肿瘤相关血栓形成等方面发挥作用, 值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223-1248.
- [2] Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 983698.
- [3] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [4] Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metas-

- tasis[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 165–178.
- [5] Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nat Med*, 2017, 23(3): 279–287.
 - [6] Yousefi S, Simon HU. NETosis-does it really represent nature's "Suicide Bomber"?[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 328–331.
 - [7] Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo[J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1386–1393.
 - [8] Neubert E, Meyer D, Rocca F, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3767–3779.
 - [9] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps [J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(2): 231–241.
 - [10] Marin-Esteban V, Turbica I, Dufour G, et al. Afa/Dr diffusely adhering escherichia coli strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(5): 1891–1899.
 - [11] Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging [J]. *FASEB J*, 2018; j201800691R.
 - [12] Demers M, Wong SL, Martinod K, et al. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(5): e1134073.
 - [13] Lewis HD, Liddle J, Coote JE, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 189–191.
 - [14] Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 48.
 - [15] Richardson J, Hendrickse C, Gao-Smith F, et al. Neutrophil extracellular trap production in patients with colorectal cancer in vitro[J]. *Int J Inflam*, 2017, 2017: 4915062.
 - [16] Jin W, Xu HX, Zhang SR, et al. Tumor-infiltrating NETs predict postsurgical survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(2): 635–643.
 - [17] Lee W, Ko SY, Mohamed MS, et al. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum[J]. *J Exp Med*, 2019, 216(1): 176–194.
 - [18] Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(5): L355–L363.
 - [19] Homa-Mlak I, Majdan A, Mlak R, et al. Metastatic potential of NET in neoplastic disease[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70(10): 887–895.
 - [20] Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth[J]. *Nat Med*, 2010, 16(2): 219–223.
 - [21] Gaida MM, Steffen TG, Gunther F, et al. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(12): 3369–3380.
 - [22] Vaguliene N, Zemaitis M, Lavinskiene S, et al. Local and systemic neutrophilic inflammation in patients with lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *BMC Immunol*, 2013, 14: 36.
 - [23] Acuff HB, Carter KJ, Fingleton B, et al. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 259–266.
 - [24] Houghton AM. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(9): 1732–1737.
 - [25] Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, et al. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes[J]. *FASEB J*, 2005, 19(2): 234–236.
 - [26] Albregues J, Shields MA, Ng D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice[J]. *Science*, 2018, 361(6409).
 - [27] Yui S, Tomita K, Kudo T, et al. Induction of multicellular 3-D spheroids of MCF-7 breast carcinoma cells by neutrophil-derived cathepsin G and elastase [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(9): 560–570.
 - [28] 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.
 - [29] Wilson TJ, Nannuru KC, Futakuchi M, et al. Cathepsin G enhances mammary tumor-induced osteolysis by generating soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5803–5811.
 - [30] Fuchs TA, Brill A, Dierschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(36): 15880–15885.
 - [31] Leal AC, Mizurini DM, 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): 6438–6449.
 - [32] Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 678.
 - [33] Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(32): 13076–13081.