

DOI: 10.13376/j.cbls/2024088

文章编号: 1004-0374(2024)06-0857-10

中性粒细胞胞外诱捕网在炎症相关疾病及肿瘤中的作用

曾田一¹, 李丹¹, 常文科¹, 郝永伟^{1,2}, 杨志军¹, 解丽芹^{1,2*}

(1 新乡医学院生命科学技术学院, 新乡 453003; 2 新乡医学院第三附属医院, 新乡 453003)

摘要: 当外源病原体入侵或机体自身发生某种炎症时, 中性粒细胞会释放一种类似于纤维网状结构的物质, 即中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs)。NETs 在机体中发挥杀灭病原体及参与免疫应答的生理作用, 同时在肿瘤发生发展的不同阶段也发挥着促进肿瘤细胞增殖或远端扩散的作用。本文综述了 NETs 的形成、NETs 在炎症相关疾病及肿瘤发生发展过程中的作用机制的研究进展, 并探讨了 NETs 作为靶点的治疗策略。

关键词: 中性粒细胞胞外诱捕网; 炎症相关疾病; 肿瘤; 治疗靶点

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

The role of neutrophil extracellular traps in inflammation related diseases and tumors

ZENG Tian-Yi¹, LI Dan¹, CHANG Wen-Ke¹, HAO Yong-Wei^{1,2}, YANG Zhi-Jun¹, XIE Li-Qin^{1,2*}

(1 School of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2 The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: When there is an invasion of foreign pathogens or some kind of inflammation in the organism, neutrophils will release a substance similar to the fibrous network structure, named neutrophil extracellular traps (NETs). NETs play a physiological role in killing pathogens and participating in immune response in the body. At the same time, NETs also play a role in promoting the proliferation or distal diffusion of tumor cells at different stages of tumor development. This review summarizes the formation of NETs, the correlative mechanisms of NETs involved in the inflammation-related diseases and the progression of tumors, and discusses the therapeutic strategies of NETs as targets.

Key words: neutrophil extracellular traps; inflammation related diseases; tumor; therapeutic targets

当外界病原体入侵时, 作为防御机制的中性粒细胞释放出网状结构的物质, 将病原体捕获并杀灭, 这种网状结构被称为中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs)^[1]。NETs 是 Brinkmann Volker 发现的中性粒细胞新的防御机制^[2-3], 其化学组成主要是染色质、脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 和蛋白质等 (图 1)。NETs 不仅是中性粒细胞诱捕和杀死病原体的一种手段, NETs 的过量释放还是某些疾病的病变指标^[4]。例如血栓、子痫前期、慢性炎症性疾病以及心肌缺血再灌注损伤等, 都会导致 NETs 的过量释放。而肿瘤发生的一个重要生物标志是炎症负荷升高, 进而表现为 NETs 释放量的增多^[5]。NETs 的过量释放会

引起机体的持续炎症, 大量 NETs 通过降解细胞外基质、捕获循环肿瘤细胞、破坏血管的完整性、诱导上皮间质转化, 促进肿瘤血管的生成, 为肿瘤的发生和转移提供适宜的“转移前微环境”^[6]。而肿瘤细胞从原发灶脱离, 进入血液循环, 在 NETs 的介导下实现免疫逃逸并在远端定植^[7]。NETs 的增多为肿瘤细胞增殖和远端转移创造了有利的微环境, 加速其转移进程^[8]。基于此, 调控 NETs 的表达水平进而抑制肿瘤细胞的增殖和破坏肿瘤转移的

收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-02-28

基金项目: 博士科研启动基金项目(505089); 河南省科技攻关项目(172102210087)

*通信作者: E-mail: xieliqin230@163.com

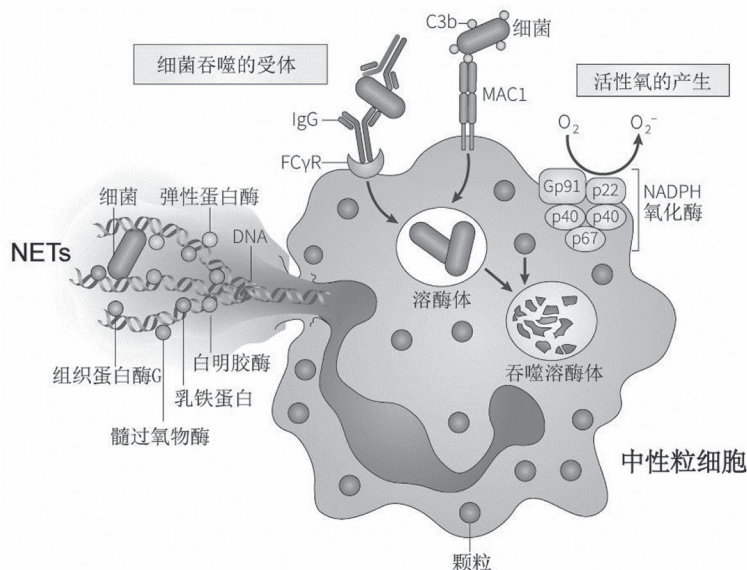


图1 中性粒细胞胞外诱捕网的防御机制及主要组成^[3]

微环境，成为肿瘤治疗的新手段^[9]。

1 NETs在体内的形成机制

NETs的形成被认为是不同于细胞坏死和凋亡的一种新型细胞死亡方式，这种特殊的方式被称为NETosis。目前发现有两种形成机制：依赖还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶诱导NETs形成和不依赖NADPH-氧化酶诱导NETs形成，如图2。

1.1 依赖NADPH-氧化酶诱导NETs形成

病原体如细菌、真菌、病毒，中性粒细胞胞浆抗体，以及肉豆蔻酯、细菌脂多糖、钙离子载体等，这些因子都可以刺激中性粒细胞释放NETs^[11]。NETs的释放过程是通过细胞受体激活触发内质网释放钙离子，进而激活蛋白激酶C和NADPH-氧化酶复合物，最终形成活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[12]。ROS激活精氨酸脱亚胺酶4 (peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)，PAD4促使组蛋白上的精氨酸转化为瓜氨酸，瓜氨酸化组蛋白介导染色质解聚、去致密化^[13]，进而形成NETs。此外，中性粒细胞颗粒蛋白、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 促进中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 转位到细胞核^[14]。这导致了去致密化的染色质和颗粒状物质释放到细胞外间隙中，NETs通过破坏细胞膜得到释放。中性粒细胞在NETs形成后死亡。

在肿瘤微环境中，内皮细胞白细胞介素-8

(interleukin 8, IL-8) 和肿瘤细胞粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 被认为是介导NETs形成的诱因。Park等^[15]和Gupta等^[16]发现，活化的内皮细胞与中性粒细胞共培养可诱导NETs的形成，部分NETs的形成是活化的内皮细胞产生的IL-8介导的。而G-CSF在肿瘤微环境中过表达，导致血液中中性粒细胞数量增多，产生ROS，并导致NETosis^[17-18]。

1.2 不依赖NADPH-氧化酶诱导NETs形成

不依赖NADPH-氧化酶形成NETs是在刺激后没有ROS的形成，且无细胞死亡，这一形成过程被称为非溶性NETosis^[19-20]。

在不依赖NADPH-氧化酶诱导NETs形成的过程中，中性粒细胞的激活是由细菌、细菌产物、激活的血小板、补体蛋白等诱导的，PAD4促进染色质去致密化^[21]。NETs装载到颗粒蛋白和胞质蛋白上通过胞吐的方式释放到细胞外，而不破坏细胞膜。NETs释放后，中性粒细胞仍能存活，并具有吞噬和趋化能力^[10, 22-23]。

2 NETs与炎症相关疾病

NETs的形成与炎症相关疾病的发生有关，其中血栓形成、炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)、类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、血管闭塞、胰管闭塞、胆管闭塞等，都伴随着NETs的过量释放^[18, 24-31]。此外，来自其他细胞类型 (如

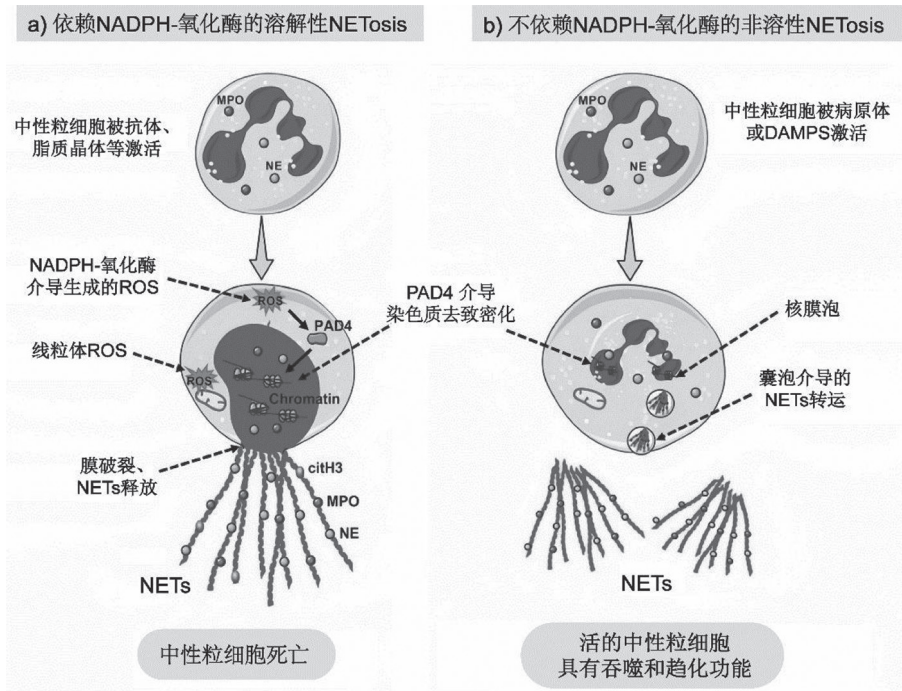


图2 NETs的形成机制^[10]

巨噬细胞或肥大细胞)的细胞外诱捕网也参与炎症和降解过程^[32-34]。

血栓形成是临床各科疾病中比较常见的一种病理学过程,血管内血栓形成会造成组织缺血和坏死,从而影响器官功能。研究发现,NETs可以通过多种途径导致血栓形成^[35]。NETs作为大分子复合物,其中的DNA和组蛋白为促进凝血、血栓形成、血小板聚集和激活提供了支架,并促进红细胞、纤维蛋白的沉积^[36-37],而且组成成分DNA可以提高蛋白酶的促凝活性。实验证明,组蛋白具有内皮细胞毒性,参与体内微血栓的形成、纤维蛋白和血小板沉积,并通过抑制血栓调节蛋白和血浆抗凝血酶的活性,从而促进血小板聚集^[38-40]。在脓毒症患者中,通过Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)启动血小板活化,增强血小板聚集,刺激中性粒细胞产生NETs,与毛细血管中受损内皮细胞进行黏附,从而造成组织损伤及凝血功能异常^[41]。因此,血液循环中的NETs不仅为血小板黏附、聚集提供支架,而且通过多种组分发挥促凝作用,导致血液处于高凝状态,直至血栓形成。

NETs的过量释放是长期慢性炎症的重要指标。RA是慢性炎症的一种,小鼠模型中,PAD4通过产生瓜氨酸化蛋白以促进NETs的形成,且随着PAD4表达量的增加,NETs的形成也增多^[12]。而NETs的

形成会通过促进树突状细胞成熟来激活T细胞^[42],并在成纤维细胞的存在下诱导RA的发生^[43-44]。另外,在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)的结肠活检中,发现大量中性粒细胞和NETs的存在^[45]。在葡聚糖硫酸钠(DSS)或2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的UC模型中发现,提高DSS的摄入量后,NETs释放增多,且炎症的严重程度与NETs的释放量呈正相关^[46]。NETs的过量释放会导致肠穿孔、肠梗阻,甚至死亡,使用PAD4抑制剂、氯脒或链嘌呤球蛋白治疗后,NETs的水平显著降低^[47-49]。

NETs的形成也会诱导SLE的发生。Hakkim等^[50]通过实验验证,脱氧核糖核酸酶I(deoxyribonuclease I, DNase I)可有效降解NETs,而DNase I活性受损会导致NETs降解受损。由于SLE患者血清中存在DNase I抑制剂和抗NETs自身抗体,其NETs的降解相较于健康人明显受损;同时,肾脏受累、疾病活动性、血液中补体C3和C4降低也会降低DNase I活性,导致NETs降解受损,继而引发狼疮性肾炎。Leffler等^[51]发现,在SLE病情活跃期,患者血清中的NETs降解受损,血液中补体C3和C4水平也较低;同时NETs会激活血清补体C1q并使之沉积,而血清补体C1q抑制NETs降解并促进抗NETs自身抗体的产生,形成了NETs

降解受损和促炎反应的恶性循环。SLE 是一种以致病性自身抗体和免疫复合物形成并介导器官、组织损伤的自身免疫性疾病，抑制 NETs 的形成或将已形成的 NETs 降解，是其治疗的一种策略^[52-54]。

3 NETs与肿瘤

Demers 等^[17]于 2012 年首次提出肿瘤促使中性粒细胞释放 NETs，NETs 导致肿瘤相关血栓的形成。Berger-Achituv 等^[55]于 2013 年在儿童尤文氏肉瘤组织中首次证实了 NETs 的存在，并阐述肿瘤相关中性粒细胞被激活后释放 NETs。

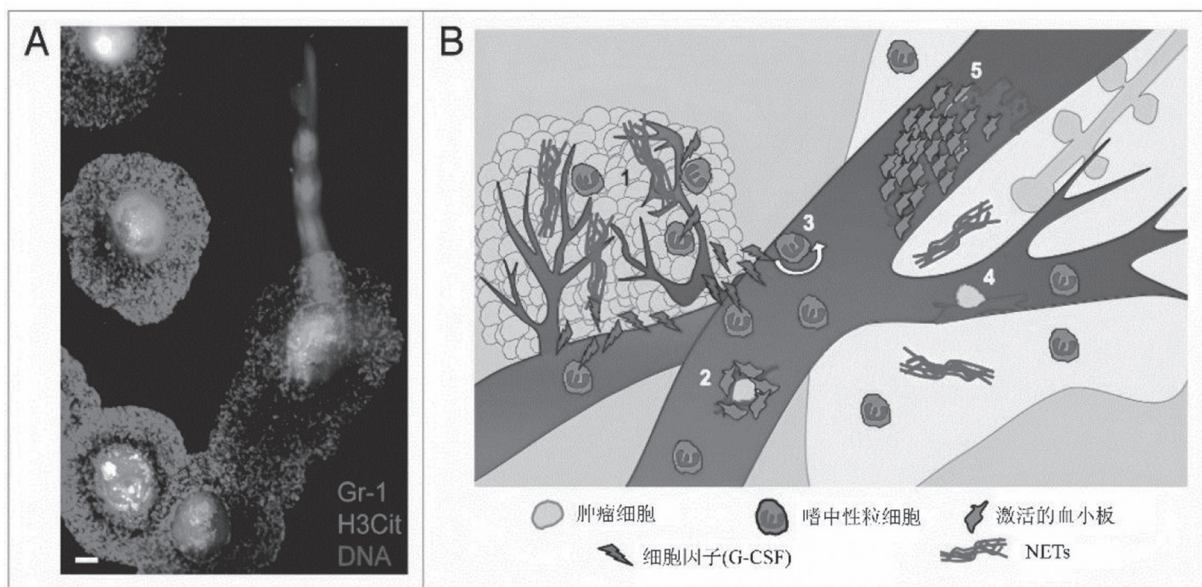
3.1 NETs在肿瘤发生、发展、转移过程中的作用

NETs 对肿瘤的抑制或促进作用与肿瘤微环境有重要关系。NETs 的抗肿瘤作用表现在它直接捕获杀伤肿瘤细胞或刺激免疫系统对抗肿瘤。Schedel 等^[56]根据人原发性黑色素瘤活检结果发现，27 例溃疡性黑色素瘤中均有 NETs，而 7 例非溃疡性黑色素瘤中无 NETs，瘤内 NETs 的数量与黑色素瘤的肿瘤进展无关。体外 NETs 的抗肿瘤作用表现为：NETs 通过整合素介导黏附黑色素瘤细胞，抑制其迁移；另外，NETs 对黑色素瘤细胞表现出细胞毒性，致其坏死。Chan 等^[57]以胰腺癌小鼠为模型，发现褪黑素可诱导肿瘤细胞分泌趋化因子配体 2 (CXCL2)，而 CXCL2 招募肿瘤相关中性粒细胞到

肿瘤微环境。肿瘤相关中性粒细胞被激活并释放 NETs，且通过诱导 ROS 依赖的 NETosis 发挥褪黑素在胰腺癌中的抗肿瘤凋亡作用。NETs 的抗肿瘤作用因肿瘤类型和肿瘤微环境而异^[58]。尽管 NETs 抑制或促进肿瘤进展还没有定论，但是促进肿瘤发展的作用更为明显，且促进肿瘤进展的分子机制研究更为透彻。

在肿瘤微环境中，中性粒细胞易被刺激因子激活产生 NETs，而 NETs 的形成往往促进肿瘤的增殖和转移，以此形成恶性循环。在慢性骨髓性白血病、乳腺癌和肺癌小鼠模型中，肿瘤细胞分泌多种炎症趋化因子，募集大量中性粒细胞聚集于肿瘤部位，形成肿瘤相关中性粒细胞。肿瘤相关中性粒细胞较正常的中性粒细胞更易于释放 NETs，且促进肿瘤生长、侵袭和血管生成^[55]。NETs 招募更多的中性粒细胞聚集于肿瘤部位，同时也捕获循环肿瘤细胞黏附于血管壁上并使其外渗。另外，NETs 通过蛋白酶黏附纤维连接蛋白等黏附分子和招募血小板来覆盖循环肿瘤细胞，增强免疫逃逸，并使肿瘤细胞转移至远处（例如：肺）。最后，大量 NETs 黏附于血管，为血小板黏附、活化和凝血酶生成提供支架，从而引发血栓形成^[35]，如图 3。

研究发现，不同类型肿瘤（例如：肺癌、胰腺癌、膀胱癌等）患者血浆中的 NETs 水平明显高于健



A: 中性粒细胞释放 NETs。B: ①肿瘤组织存在大量的中性粒细胞，且它们释放 NETs；②血液循环中的 NETs 通过黏附和招募血小板来保护转移的肿瘤细胞；③ NETs 激活内皮细胞以增强中性粒细胞的黏附性；④ NETs 黏附于内皮组织以利于转移的肿瘤细胞定植；⑤大量的 NETs 为血小板黏附、活化和凝血酶生成提供支架，引发血栓^[36]。

图3 NETs的产生及在肿瘤微环境中的作用

康人群^[59], 且参与或影响着肿瘤的发生。Li 等^[60]证明, 肿瘤细胞的细胞外 RNA 促进上皮细胞分泌白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), IL-1 β 刺激 NETs 的形成, NETs 损伤上皮细胞, 坏死上皮细胞释放的细胞外 RNA 再次引发级联反应, 诱导 NETs 形成并参与肺癌的发生。Richardson 等^[61]通过结直肠癌患者临床数据得出, 肿瘤位置和肿瘤分期似乎不影响术前 NETs 的产生, 在死亡的患者中也观察到过量 NETs 的产生。Kaltenmeier 等^[62]发现, 在结直肠癌切除手术的患者血清中, 可溶性程序死亡配体-1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 和 MPO-DNA 复合物 (二者均是 NETs 的标志物) 高水平表达, 而 PD-L1 作为免疫抑制配体可导致 T 细胞衰竭和功能障碍。在肝脏缺血再灌注的手术期间, 注射靶向 PD-L1 的阻断抗体, 可导致肿瘤在 3 周时缩小, 且肿瘤微环境中 T 细胞功能正常。由此证明 NETs 具有通过代谢和功能衰竭抑制 T 细胞的反应能力, 从而促进肿瘤生长。

NETs 促进肿瘤的远端转移。手术切除是肿瘤治疗的基本手段, 但手术的不良预后就是肿瘤的转移。术后的炎症环境, 促使中性粒细胞聚集在创伤部位并释放 NETs, NETs 捕获循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC)。Jonathan Spicer 课题组在盲肠结扎和穿刺的小鼠感染模型中, 观察到 NETs 沉积并捕获循环肺癌细胞, 且肺癌细胞注射 48 h 后, 肝转移形成, 2 周后, 肿瘤转移负荷加重^[63]。他们又以小鼠腹腔脓毒症模拟术后炎症环境, 发现 β 1- 整合素在体内炎症环境表达上调, 而 β 1- 整合素介导着 CTC 对 NETs 的黏附, 进一步证明了 NETs 促进肿瘤的转移^[64]。Tohme 等^[65]也证实 NETs 的形成会促进手术应激后的肿瘤转移, 在转移性结直肠癌肝切除的患者中, 他们观察到术后 NETs 的形成增多, 而无病生存期 NETs 的形成量降低到 1/4。同样, 以肝缺血-再灌注的手术应激小鼠为模型, 体外机制研究表明, NETs 可触发高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 释放, HMGB1 激活肿瘤细胞中 Toll 样受体 9 (TLR9) 信号通路, 以此促进肿瘤细胞的黏附、增殖、迁移和侵袭。Park 等^[15]通过共聚焦活体肺显像观察到, 在无感染情况下肿瘤细胞刺激中性粒细胞形成 NETs。尾静脉注射转移性 4T1 肺癌细胞后, NETs 在肺部形成, 且 NETs 的数量在注射后 1、3、7 d 显著升高。

NETs 还能“唤醒”休眠的肿瘤细胞并引起转移。Albregues 等^[66]通过吸入烟草烟雾或鼻腔滴注

脂多糖诱导持续性肺部炎症, 在乳腺癌和前列腺癌小鼠模型中, NETs 的 DNA 骨架与细胞外基质中的黏连蛋白结合, 而与 NETs 相关的 NE 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP-9) 依次裂解层粘连蛋白。水解重组后的层粘连蛋白通过激活整合素 α 3 β 1 信号表位, 导致肿瘤细胞中的 FAK/ERK/MLCK/YAP 信号通路被激活, 触发肿瘤细胞的增殖。Yang 等^[67]发现 NETs 的网状结构不仅仅利于捕获肿瘤细胞, 其组成部分 DNA (NETs-DNA) 还是吸引肿瘤细胞的趋化因子。其机制为肿瘤细胞上的跨膜蛋白 CCDC25 是 NETs-DNA 的受体, 它与 NETs-DNA 特异性识别, 随后激活 ILK- β -parvin 通路以增强肿瘤细胞的运动性。若敲除跨膜蛋白 CCDC25, NETs 介导的肿瘤细胞转移也随之消失。

3.2 NETs促进肿瘤相关血栓的形成

Demers 等^[68]综述了 NETs 与肿瘤相关血栓的关系, 总结到肿瘤化学治疗后会引起 NETs 和凝血酶-抗凝血酶复合物的释放, 释放物导致 NETosis, NETosis 加重炎症和凝血, 炎症和凝血激活中性粒细胞并诱导形成更多的 NETs, 因此 NETs 被认为是肿瘤相关血栓形成的促凝剂。Jung 等^[69]探讨了 NETs 的形成是否促进了血浆凝血酶的产生, 实验证明, 胰腺癌细胞及其培养基均能诱导 NETs 的形成, 而 NETs 显著提高内源性正常血浆凝血酶的生成能力。Boone 等^[70]反向证实胰腺癌相关血栓与 NETs 形成有关, 实验中 PAD4 敲除的肿瘤负荷小鼠不能形成 NETs; 羟氯喹 (NETs 抑制剂) 能降低血小板聚集、减少循环组织因子、降低血液高凝状态。临床数据显示, 胰腺癌患者化疗后, 羟氯喹使静脉血栓栓塞率从 30% 降低到 9.1%。

Seo 等^[71]研究了肝癌患者门静脉血栓的形成机制, 通过 177 例肝癌患者和 48 例健康者的临床测定, 发现 77 例肝癌患者有门静脉血栓形成, 其 NETs 形成的标志物 (DNA- 组蛋白复合物、双链 DNA、NE) 和触点系统激活的标志物 (凝血因子 XII a、高分子量激肽原 HMWK) 均明显高于健康者, 证明了触点系统激活是血栓形成的新机制。

4 NETs作为治疗的靶点

4.1 NETs作为炎症相关疾病的治疗靶点

NETs 为血小板、红细胞和血小板黏附分子提供支架, 促进血栓形成及加剧炎症反应, 相应地也成为血栓及炎症性疾病治疗的靶点^[72-73]。抑制 NETs 的形成或降解 NETs 是其治疗策略。Drury 等^[74]

综述了 NETs 在炎症性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩病中的作用,总结了以 NETs 为靶点治疗炎症性疾病的方案。

第一种方法是抑制 NETs 的形成。抑制 NETs 的形成可通过以下几种方式进行。(1) PAD4 抑制剂(氯脒、BB-Cl amidine、新生 NETs 抑制因子、链黑霉素等):抑制 PAD4 酶活性,阻断 NETs 形成。(2) 中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂(普罗司汀、依拉铂等):抑制 NE 的酶促作用,阻止染色质去凝结,阻断 NETs 形成。(3) IL-1 β 拮抗剂(阿那白滞素、利那西普、卡那单抗等):占据 IL-1 β 的结合位点,减少 NETs 形成。(4) NETs 抑制性受体(白细胞信号抑制性受体-1)的交联:抑制 NETs 的释放。

第二种方法是降解已形成的 NETs。降解已形成的 NETs 主要是破坏 NETs 的 DNA 骨架,进而使其失去捕获病原体及外源性物质的功能。(1) DNase I: DNase I 可以降解 NETs-DNA,从而破坏 NETs 的网状结构。(2) 抗体:抗体特异性靶向 NETs,导致巨噬细胞降解,不仅能分解 DNA,还能破坏炎性蛋白。

以 NETs 为治疗靶点,通常是抑制 NETs 的形成和降解已形成的 NETs 相结合,并根据炎症所处微环境,选择合适的治疗方案。Dyer 等^[75]以下腔静脉血栓为模型研究血栓形成的机制,使用 PAD4 抑制剂 GSK199 治疗小鼠,NETs 的形成显著减少;以 DNase I 为治疗试剂,NETs 完全降解,这为深静脉血栓的治疗提供了新的思路。Zhang 等^[76]以 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBC)诱导结肠炎小鼠为模型,其淋巴细胞抗原 6G(Ly6G)、瓜氨酸化组蛋白 H3(CitH3)、PAD4 的表达增强,NETs 的释放量增加。通过氯脒治疗,降低了小鼠结肠中 PAD4 的活性和 NETs 相关蛋白的表达,抑制 NETs 的形成,有效缓解小鼠结肠炎指数和组织炎症。吴雅琪^[77]用小干扰 RNA 沉默 RA 患者外周血多形核中性粒细胞的 PAD4 基因,通过靶向抑制 NETs 的形成,显著减少抗环瓜氨酸化肽抗体的产生和炎症性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-17A、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、MMP-9 的释放,进而抑制 RA 滑膜样成纤维细胞的活化增殖和迁移侵袭功能。余春晓^[78]发现通过 Necrostatin-1(TNF- α 抑制剂)治疗后,在体内能减少胶原诱导型关节炎模型小鼠 NETs 的形成,在体外能抑制佛波酯诱导的 NETs 产生。

此外,一些信号通路也可减少 NETs 的形成。Domingo-Gonzalez 等^[79]发现小鼠骨髓移植后,中

性粒细胞过表达前列腺素 E2(PGE2),PGE2 促进 NETs 形成。但 PGE2 通过前列腺素 E 受体 2(EP2)或受体 4(EP4)形成的 PGE2-EP2 或 PGE2-EP4 信号通路,介导细胞内环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的释放,通过减少细胞内钙离子抑制 NETs 的形成^[80]。而 Jung 等^[69]也报道前列腺素 E1(PGE1)以相同机制抑制 NETs 形成,即 PGE1 诱导 cAMP 产生,亦通过减少细胞内钙离子抑制 NET 的形成。

在自身免疫性疾病中, DNase I 活性不足或 NETs 暴露自身抗原会促进自身免疫性疾病的进展,如系统性红斑狼疮,可能导致狼疮肾炎。Salazar-Gonzalez 等^[81]综述了 NETs 在肾病发生发展中的作用,总结了肾病中 NETosis 的标志物,如 MPO、抗中性粒细胞细胞质抗体、NE、CitH3 等。Brinkmann^[82]总结了以 NETs 作为治疗靶点的临床研究进展,重组 DNase I 已成功用于囊性纤维化患者的治疗,NE 抑制剂用于治疗慢性阻塞性肺疾病, PAD4 在大多数肿瘤中过表达, PAD4 抑制剂可以改善肿瘤临床治疗效果。随着 NETs 在炎症性疾病中的作用机制逐步成熟,如何调节 NETs 的表达水平,并以此为治疗靶点有效缓解患者临床症状亟待进一步研究。

4.2 NETs 作为肿瘤治疗靶点

NETs 参与肿瘤的发生、发展、侵袭转移和相关血栓的形成,因此也成为肿瘤治疗的潜在靶点。

DNase I 能降解 NETs 的 DNA 骨架,但 DNase I 存在在血浆中半衰期短、需大剂量多次给药等问题,因此靶向 NETs 的纳米药物载体成为肿瘤治疗的新策略。陈家圆等^[83-84]制备了金纳米粒为核、介孔聚多巴胺为壳的纳米载体 AuPB@mPDA,负载 DNase I,经近红外光二区光源辐照后, DNase I 在深部组织靶向释放,实现了结直肠癌动物模型中体内外 NETs 的高效清除。同时,将其与程序性死亡受体 1(programmed cell death protein 1, PD-1)治疗相结合,不仅靶向清除肝脏中沉积的病理性 NETs,还可遏制 NETs 介导的肿瘤转移。王照忠^[85]利用 NETs-DNA 与跨膜蛋白 CCDC25 的特异性结合,以脂质体包载 DNase I,并将跨膜蛋白 CCDC25 过表达的细胞膜与脂质体融合,增强靶向 NETs 的能力。仿生脂质体可以有效清除 NETs 并抑制中性粒细胞募集,有效抑制结直肠癌肝转移的微环境形成。Yin 等^[86]构建紫杉醇(paclitaxel, PTX)前药为核、表面修饰聚赖氨酸,并通过肽片段偶联 DNase I 的纳米载体。肽片段经 MMP-9 切割,纳米载体释放

DNase I, 降解 NETs 的 DNA 骨架; PTX 前药的二硫键被高浓度的谷胱甘肽还原, 内核裂解, 释放 PTX 杀死肿瘤细胞, 该纳米载体有效抑制肿瘤生长和远端转移。我们课题组郝永伟^[87]以富含 Mn^{2+} 的介孔二氧化硅为载体, 同时装载抗肿瘤药物阿霉素 (doxorubicin, DOX) 和 DNase I, 在低 pH 和高谷胱甘肽的肿瘤微环境中, 二氧化硅崩解释放 DOX 和 DNase I, NETs 的降解促进了化疗药物引起的细胞凋亡, 不仅抑制了肿瘤细胞的增殖且遏制了肿瘤远端转移, 为转移性乳腺癌患者提供了一种有效的治疗策略。

靶向 NETs 破坏肿瘤微环境, 诱导有效免疫应答, 也是肿瘤治疗的策略。Liang 等^[88]利用聚天冬氨酸阳离子纳米颗粒与 NETs-DNA 强的结合亲和力, 干扰肿瘤细胞上跨膜蛋白 CCDC25 与 NETs-DNA 的相互作用, 以此抑制 NETs-DNA 介导的肿瘤细胞趋化和迁移。而且聚天冬氨酸纳米颗粒具有良好的肝脏滞留性和较强的 NETs-DNA 结合亲和力, 能有效降低肝脏炎性浸润和转移灶的形成。Kaltenmeier 等^[62]以小鼠结直肠癌为模型, 用 DNase I 治疗后, 小鼠体内 NETs 形成减少; PD-L1 在 NETs 中高表达, DNase I 联合抗 PD-L1 的治疗策略, 不仅使得小鼠肿瘤减少, 且肿瘤微环境中 T 细胞的功能也恢复正常。Wu 等^[89]将光敏分子 IR780、酪氨酸酶相关蛋白 2 (tyrosinase related protein-2, TRP2) 包裹在穿膜肽 TAT 修饰的脂质体内, 形成纳米粒 τ LipIT, 将其内化到中性粒细胞形成 τ LipIT/NEs, τ LipIT/NEs 对术后残余的肿瘤细胞有主动趋化, 且纳米粒 τ LipIT 随着 NETs 被释放。经近红外激光照射, 纳米粒 τ LipIT 产生的光热和光动力效应诱导免疫原性细胞死亡, 促进树突状细胞成熟; 同时释放 TRP2 作为黑色素瘤相关抗原, 进一步加强树突状细胞成熟, 两者均促进 T 细胞活化, 诱导有效的免疫应答, 抑制肿瘤复发。

5 结语和展望

NETs 的形成是炎症相关疾病及肿瘤发生的标志, 在炎症和肿瘤发生、发展的不同时期发挥着促进或抑制的作用。本文综述了 NETs 形成的机制、在炎症相关疾病和肿瘤中的作用, 以及以此为治疗靶点抑制其过表达或将其降解。NETs 在体内的形成依赖于其所处的微环境, 特别是关于肿瘤微环境中 NETs 的研究正在进一步地探索。以 NETs 及肿瘤微环境为靶点, 结合化疗、光热治疗、免疫治疗等,

将 NETs 表达水平调控到正常范围, 仍需要大量的基础研究。另外, NETs 与肿瘤细胞的作用机制还在探索中, 其定性、定量测定还没有标准化, 但以此为着力点的研究对肿瘤检测和治疗更具有临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 2019, 133: 2178-85
- [2] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303: 1532-5
- [3] Hickey MJ, Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 364-75
- [4] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 134-47
- [5] 石汉平. 炎症负荷是恶性肿瘤的重要生物标志物. *中华医学信息导报*, 2022, 37: 7
- [6] 夏杰, 倪浩, 汤静, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网促进肿瘤局部生长. *黄冈职业技术学院学报*, 2020, 22: 92-5
- [7] 张欣伟, 王勇, 李勇. 中性粒细胞胞外诱捕网与肿瘤转移的研究进展. *中国肺癌杂志*, 2019, 22: 600-4
- [8] Yang LY, 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: 3
- [9] Cools-Lartigue J, Spicer J, Najmeh S, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 4179-94
- [10] Khan U, Chowdhury S, Billah MM, et al. Neutrophil extracellular traps in colorectal cancer progression and metastasis. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 7260
- [11] Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*, 2017, 36: 2483-90
- [12] Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009, 1: 309-33
- [13] Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 2009, 184: 205-13
- [14] Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, et al. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*, 2014, 8: 883-96
- [15] Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 361ra138
- [16] Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3193-7

- [17] Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 13076-81
- [18] Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*, 1990, 75: 851-7
- [19] Jorch SK, Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*, 2017, 23: 279-87
- [20] Honda M, Kubers P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15: 206-21
- [21] Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 2010, 185: 7413-25
- [22] Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat Med*, 2012, 18: 1386-93
- [23] Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep*, 2015, 5: 18302
- [24] Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*, 2017, 358: 1202-6
- [25] O'Neil LJ, Kaplan MJ. Neutrophils in rheumatoid arthritis: breaking immune tolerance and fueling disease. *Trends Mol Med*, 2019, 25: 215-27
- [26] O'Neil LJ, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in vascular damage in systemic lupus erythematosus. *J Clin Med*, 2019, 8: 1325
- [27] Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, et al. NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*, 2016, 7: 485
- [28] Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14: 467-75
- [29] Daniel C, Leppkes M, Muñoz LE, et al. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15: 559-75
- [30] Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun*, 2016, 7: 10973
- [31] Muñoz LE, Boeltz S, Bilyy R, et al. Neutrophil extracellular traps initiate gallstone formation. *Immunity*, 2019, 51: 443-50
- [32] Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, et al. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nat Med*, 2018, 24: 232-8
- [33] Rayner BS, Zhang Y, Brown BE, et al. Role of hypochlorous acid (HOCl) and other inflammatory mediators in the induction of macrophage extracellular trap formation. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 25-34
- [34] Reber LL, Marichal T, Sokolove J, et al. Contribution of mast cell-derived interleukin-1 β to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66: 2881-91
- [35] Demers M, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps: a new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology*, 2013, 2: e22946
- [36] Longstaff C, Varjú I, Sótönyi P, et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*, 2013, 288: 6946-56
- [37] Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, et al. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol*, 2012, 3: 333
- [38] Zhao W, Qin Z, Zhang C, et al. A label-free double-amplification system for sensitive detection of single-stranded DNA and thrombin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem Commun*, 2014, 50: 9846-8
- [39] Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*, 2009, 15: 1318-21
- [40] Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, et al. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*, 2011, 9: 1795-803
- [41] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 2007, 13: 463-9
- [42] Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur J Immunol*, 2016, 46: 2542-54
- [43] Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 178ra40
- [44] Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Moore E, et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci Immunol*, 2017, 2: eaag3358
- [45] Gottlieb Y, Elhasid R, Berger-Achituv S, et al. Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease. *Pathol Int*, 2018, 68: 517-23
- [46] Lin EY, Lai HJ, Cheng YK, et al. Neutrophil extracellular traps impair intestinal barrier function during experimental colitis. *Biomedicine*, 2020, 8: 275
- [47] Maronek M, Gromova B, Liptak R, et al. Extracellular DNA correlates with intestinal inflammation in chemically induced colitis in mice. *Cells*, 2021, 10: 81
- [48] Dos Santos Ramos A, Viana GCS, de Macedo Brigido M, et al. Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel diseases: implications in pathogenesis and therapeutic targets. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105779
- [49] Wang P, Liu D, Zhou Z, et al. The role of protein arginine deiminase 4-dependent neutrophil extracellular traps

- formation in ulcerative colitis. *Front Immunol*, 2023, 14: 1144976
- [50] Hakkim A, Fürrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 9813-8
- [51] Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*, 2012, 188: 3522-31
- [52] van der Linden M, van den Hoogen LL, Westerlaken GHA, et al. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology*, 2018, 57: 1228-34
- [53] Kienhöfer D, Hahn J, Stoof J, et al. Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI Insight*, 2017, 2: e92920
- [54] Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 73ra19
- [55] Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol*, 2013, 4: 48
- [56] Schedel F, Mayer-Hain S, Pappelbaum KI, et al. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. *Pigm Cell Melanoma R*, 2020, 33: 63-73
- [57] Chan Y, Tan H, Lu Y, et al. Pancreatic melatonin enhances anti-tumor immunity in pancreatic adenocarcinoma through regulating tumor-associated neutrophils infiltration and NETosis. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 1554-67
- [58] Liu Y, Liu L. The pro-tumor effect and the anti-tumor effect of neutrophils extracellular traps. *Biosci Trends*, 2020, 13: 469-75
- [59] Oklu R, Sheth RA, Wong KHK, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2017, 7: S140-9
- [60] Li Y, Yang Y, Gan T, et al. Extracellular RNAs from lung cancer cells activate epithelial cells and induce neutrophil extracellular traps. *Int J Oncol*, 2019, 55: 69-80
- [61] Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, et al. Neutrophil extracellular trap production in patients with colorectal cancer *in vitro*. *Int J Inflam*, 2017, 2017: 4915062
- [62] Kaltenmeier C, Yazdani HO, Morder K, et al. Neutrophil extracellular traps promote T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Front Immunol*, 2021, 12: 785222
- [63] Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*, 2013, 123: 3446-58
- [64] Najmeh S, Cools-Lartigue J, Rayes RF, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *Int J Cancer*, 2017, 140: 2321-30
- [65] Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res*, 2016, 76: 1367-80
- [66] Albregues J, Shields MA, Ng D, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 2018, 361: eaao4227
- [67] Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature*, 2020, 583: 133-8
- [68] Demers M, Wagner DD. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40: 277-83
- [69] Jung HS, Gu J, Kim JE, et al. Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression. *PLoS One*, 2019, 14: e0216055
- [70] Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer*, 2018, 18: 678
- [71] Seo JD, Gu JY, Jung HS, et al. Contact system activation and neutrophil extracellular trap markers: risk factors for portal vein thrombosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2019, 25: 1076029618825310
- [72] 杨茜洋, 肖纯, 杨向东. 中性粒细胞HDC/histamine信号: 抗血栓治疗的新靶点. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30: 568-74
- [73] 王娜, 段萌, 霍丽娟. 中性粒细胞胞外诱捕网在炎症性肠病中的作用机制及相关靶向治疗. *中华消化杂志*, 2023, 43: 281-4
- [74] Drury B, Hardisty G, Gray RD, et al. Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel disease: pathogenic mechanisms and clinical translation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12: 321-33
- [75] Dyer MR, Chen Q, Haldeman S, et al. Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA. *Sci Rep*, 2018, 8: 2068
- [76] Zhang T, Mei Y, Dong W, et al. Evaluation of protein arginine deiminase-4 inhibitor in TNBS-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106583
- [77] 吴雅琪. 通过siRNA沉默PAD4抑制中性粒细胞胞外诱捕网形成影响类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞功能的实验性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2022
- [78] 余春晓. Necrostatin-1通过抑制中性粒细胞胞外诱捕网形成改善胶原诱导型关节炎小鼠的病情[D]. 广州: 南方医科大学, 2019
- [79] Domingo-Gonzalez R, Martínez-Colón GJ, Smith AJ, et al. Inhibition of neutrophil extracellular trap formation after stem cell transplant by prostaglandin E2. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193: 186-97
- [80] Shishikura K, Horiuchi T, Sakata N, et al. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 319-31
- [81] Salazar-Gonzalez H, Zepeda-Hernandez A, Melo Z, et al.

- Neutrophil extracellular traps in the establishment and progression of renal diseases. *Medicina*, 2019, 55: 431
- [82] Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun*, 2018, 10: 414-21
- [83] 陈家圆. 新型纳米材料AMD靶向清除NETs用于肿瘤免疫治疗和转移抑制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2022
- [84] Chen J, Hou S, Liang Q, et al. Localized degradation of neutrophil extracellular traps by photoregulated enzyme delivery for cancer immunotherapy and metastasis suppression. *ACS Nano*, 2022, 16: 2585-97
- [85] 王照忠. 中性粒细胞胞外诱捕网靶向杂合脂质体构建及其抗结直肠癌肝转移研究[D]. 济南: 山东大学, 2022
- [86] Yin H, Lu H, Xiong Y, et al. Tumor-associated neutrophil extracellular traps regulating nanocarrier-enhanced inhibition of malignant tumor growth and distant metastasis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 59683-94
- [87] Hao YW, Li X, Liu YF, et al. Manganese doped nanosystem for degrading neutrophil extracellular traps and improving chemotherapy efficiency to synergistically inhibit lung metastasis of breast cancer. *Chem Eng J*, 2023, 466: 142957
- [88] Liang H, Du Y, Zhu C, et al. Nanoparticulate cationic poly(amino acid)s block cancer metastases by destructing neutrophil extracellular traps. *ACS Nano*, 2023, 17: 2868-80
- [89] Wu Y, Han X, Zheng R, et al. Neutrophil mediated postoperative photoimmunotherapy against melanoma skin cancer. *Nanoscale*, 2021, 13: 14825-36