

中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)在肝细胞癌转移中的作用与机制研究

王金丽^{1,2} 马建兵³ 王文喜² 肖思嘉¹ 王晓敏¹ 仲经亚¹ 潘巍巍^{1*} 程树群^{1,4*} 郑永霞^{1*}

(¹嘉兴学院医学院基础医学部, 嘉兴 314001; ²浙江工业大学药学院药物制剂研究所, 杭州 310014;

³嘉兴市第一医院放射科, 嘉兴 310053, ⁴东方肝胆外科医院肝外六科, 上海 200433)

摘要 肝细胞癌(HCC)是一种炎症相关癌症, 肿瘤免疫微环境在HCC的发生和发展中起关键作用。该文旨在研究中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)在HCC转移中的作用及相关机制。ELISA和免疫组化方法检测HCC患者血清和肿瘤组织中的NETs水平以检测NETs与肝癌转移的相关性。在体外实验中, 建立NETs与肝癌细胞系Hep3B和CSQT-2体外共培养模型, 通过划痕实验和Transwell等实验, 研究NETs对肝癌细胞迁移的影响。在体内实验中, 建立尾静脉注射转移瘤模型并使用脂多糖诱导小鼠体内NETs形成, 通过检测肝脏病理变化和肝脏Ki67蛋白水平等指标, 研究NETs对肿瘤转移的作用。最后, 为了探讨NETs影响HCC转移的机制, 通过质谱的方法检测了NETs对细胞外基质的修饰, 并检测了修饰的细胞外基质蛋白对整合素/FAK信号通路的影响。结果发现: 高转移HCC患者肿瘤组织中髓过氧化物酶蛋白水平较高, 且与早期HCC患者相比, 晚期HCC患者血清中的MPO和中性粒细胞弹性蛋白酶水平升高。体外实验中, NETs与Hep3B和CSQT-2细胞共培养, 可以促进Hep3B和CSQT-2细胞的迁移能力。体内实验中, NETs可以促进C57BL/6小鼠炎症细胞浸润肝脏。尾静脉注射转移瘤后, 体内诱导NETs引起肝脏组织中Ki67蛋白水平升高, 表明NETs促进肝癌细胞的肝转移。使用ATRA抑制NETs的释放缓解了NETs介导的促转移和促增殖作用。而使用ATRA抑制NETs的释放缓解了NETs介导的促转移和促增殖作用。机制研究发现, NETs形成和释放过程中会产生次氯酸, 从而导致细胞外基质中层黏连蛋白肽段中LKDYEDLR的酪氨酸氯化修饰, 且次氯酸处理的LAMC1会导致整合素/FAK信号通路的激活。因此, 该研究证实, NETs可以促进HCC的转移, 其作用机制与诱导ECM重塑, 调控整合素/FAK信号通路有关。

关键词 中性粒细胞胞外诱捕网; 肝细胞癌; 肿瘤转移; 细胞外基质; 蛋白质翻译后修饰

Role and Mechanisms of Neutrophil Extracellular Traps in Hepatocellular Carcinoma Metastasis

WANG Jinli^{1,2}, MA Jianbing³, WANG Wenxi², XIAO Sijia¹, WANG Xiaomin¹,
ZHONG Jingya¹, PAN Weiwei^{1*}, CHENG Shuqun^{1,4*}, ZHENG Yongxia^{1*}

(¹Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ²Institute of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014; ³Department of Radiology, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China; ⁴Department of Hepatic Surgery VI, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

收稿日期: 2023-12-22

接受日期: 2024-02-27

浙江省公益应用技术研究项目(批准号: GD22H163452)、嘉兴市公益研究项目(批准号: 2023AY11006)和嘉兴学院大学生创新训练项目(批准号: 8517221168、8517231313)资助的课题

*通信作者。Tel: 0573-83643808, E-mail: wwpan@163.com; Tel: 021-81875114, E-mail: chengshuqun@aliyun.com; Tel: 0573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

Received: December 22, 2023

Accepted: February 27, 2024

This work was supported by Zhejiang Province Public Welfare Applied Technology Research Project (Grant No.GD22H163452), the Jiaxing City Public Research Project (Grant No.2023AY11006), and the Jiaxing University Student Innovation Training Project (Grant No.8517221168, 8517231313)

*Corresponding authors. Tel: +86-573-83643808, E-mail: wwpan@163.com; Tel: +86-21-81875114, E-mail: chengshuqun@aliyun.com; Tel: +86-573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

Abstract HCC (hepatocellular carcinoma) is an inflammation-related cancer, and the tumor immune microenvironment plays a crucial role in the occurrence and development of HCC. This study aims to investigate the role and related mechanisms of NETs (neutrophil extracellular traps) in HCC metastasis. The levels of NETs in serum and tumor tissues of HCC patients were detected by ELISA and immunohistochemistry to examine the correlation between NETs and liver cancer metastasis. In *in vitro* experiments, a co-culture model of NETs and HCC cell lines Hep3B and CSQT-2 was established, and the effects of NETs on HCC cell migration were investigated through scratch assays and Transwell experiments. In *in vivo* experiments, a tail vein injection metastasis model was established, and NETs formation was induced in mice using lipopolysaccharide. The effects of NETs on tumor metastasis were examined by evaluating liver pathological changes and levels of Ki67 protein in the liver. Finally, to explore the mechanisms by which NETs influence HCC metastasis, the modification of extracellular matrix by NETs was detected using mass spectrometry, and the effects of the modified extracellular matrix protein on the integrin/FAK signaling pathway were assessed. The results showed that the levels of MPO (myeloperoxidase) protein were higher in tumor tissues of high-metastatic HCC patients, and the levels of MPO and neutrophil elastase in the serum of advanced HCC patients were elevated compared to early HCC patients. Co-culture of NETs with Hep3B and CSQT-2 cells promoted the migration ability of these cells *in vitro*. NETs promoted inflammatory cell infiltration in the liver of C57BL/6 mice *in vivo*. After tail vein injection of metastatic tumors, induction of NETs led to an increase in Ki67 protein levels in liver tissue, indicating that NETs promote liver metastasis of HCC cells. The inhibition of NETs release by ATRA can alleviate the NETs-mediated promotion of migration and proliferation. Mechanistic studies found that NETs generated hypochlorous acid, which resulted in tyrosine chlorination modification of the laminin C1 peptide segment LKDYEDLR in the extracellular matrix. Moreover, hypochlorous acid-treated LAMC1 led to activation of the integrin/FAK signaling pathway. Therefore, this study confirms that NETs can promote HCC metastasis, and its mechanism is associated with ECM remodeling induction and regulation of the Integrin/FAK signaling pathway.

Keywords neutrophil extracellular traps; hepatocellular carcinoma; tumor metastasis; extracellular matrix; protein post-translational modification

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤,具有较高的发病率和死亡率,其预后不良主要是因为肝内或者全身转移的发生,而目前仍缺乏预防或者治愈肝癌转移的方法^[1-2]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种典型的炎症相关癌症,由免疫细胞(如肝星状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞)、非免疫细胞(如成纤维细胞、内皮细胞)以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)共同构成的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在肝癌发展中起重要作用^[3-5]。中性粒细胞是肿瘤微环境中重要的细胞种类,也是机体对抗外界侵害的第一道防线。中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是一种由脱氧核糖核酸(DNA)结构骨架和镶嵌了多种活性蛋白(如髓过氧化物酶、中性粒细胞弹性蛋白酶等)的胞外网状物质,通过其特殊的三维结构捕获外源病原体,在免疫防御中发挥重要作用^[6-8]。然

而,越来越多的证据表明NETs在许多疾病的病理过程中发挥作用,尤其是肿瘤的进展。比如,首次发现NETs参与肿瘤转移是在尤文肉瘤中有25%的患者肉瘤组织中存在NETs,且这些患者都发生了肿瘤转移,这提示NETs与尤文肉瘤的转移密切相关^[9]。在乳腺癌中,NETs通过上调白细胞介素-6和白细胞介素-8的表达促进转移^[10]。另外,结肠癌细胞膜上存在NET-DNA骨架的感受器CCDC25, CCDC25通过感知肿瘤细胞胞外的NET-DNA,激活整合素链激酶/ β -parvin信号通路促进结肠癌细胞的迁移^[11]。可见,NETs促进肿瘤细胞转移的机制有多种,而我们对其研究还非常有限,因此,本文针对NETs在肝细胞癌转移中的作用和机制进行了探讨。

大多数肝细胞癌主要由肝纤维化或者肝硬化发展而来,常伴随着细胞外基质的重塑。ECM是一个高度动态且复杂的网络结构,由层黏连蛋白、纤

黏连蛋白、胶原等基质蛋白组成^[12]。细胞外基质中的蛋白积累、修饰和降解都会引起其重塑,重塑后的细胞外基质会暴露许多蛋白结合位点,这些位点直接或间接地与癌细胞和基质细胞相互作用以改变其功能^[13]。细胞外基质上的黏附分子与肿瘤细胞上的整合素结合,激活局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK),引起肿瘤细胞的迁移、侵袭、耐药等。NETs在细胞外基质重塑中发挥着重要作用,比如:NETs上的NE和MMP9依次切割层黏连蛋白暴露表位,通过整合素唤醒休眠的乳腺癌细胞并形成转移灶^[14]。又如:中性粒细胞释放的组织蛋白酶G可以切割内皮钙黏连蛋白和纤黏连蛋白,导致细胞外基质和基底膜的破坏,引发内皮功能障碍和血管炎症,进而引起肿瘤的转移^[15]。综上所述,NETs与ECM之间存在着复杂的串扰。因此,本研究的目的是从细胞外基质的角度研究NETs影响HCC转移的分子机制。

本研究中,我们研究了NETs促进HCC转移相关的分子机制。我们的数据表明:NETs释放的衍生物HClO对层黏连蛋白亚基 γ 1(laminin subunit γ -1, LAMC1)进行了氯化修饰,而被修饰的LAMC1导致了整合素 β 6/FAK通路的激活并调控了EMT相关分子的表达,从而促进了肝癌的转移。同时,临床标本中,NETs的水平与HCC的不良预后呈正相关。本研究结果将有助于扩展我们对HCC转移中NETs的认识,丰富HCC转移相关的发病机制。NETs有望成为HCC治疗的潜在靶点,进一步寻找NETs的新型抑制剂对于开发治疗HCC转移的新策略具有潜在意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 本研究中采用人源肝癌细胞系Hep3B、CSQT-2,鼠源肝癌细胞系Hep1-6。人源肝癌细胞系Hep3B和鼠源肝癌细胞系Hep1-6购自中国科学院上海细胞库,人源肝癌细胞系CSQT-2来自程树群教授。

1.1.2 实验动物 雄性,4~8周龄C57BL/6小鼠购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司。所有动物在常规动物环境下饲养。研究符合《赫尔辛基宣言》原则,并经嘉兴学院医学院实验动物伦理委员会的批准(批准号:JUMC2023-018)。

1.1.3 标本来源 本研究收集12例早期HCC患者

和10例晚期HCC患者血清标本,所有标本均是清晨采集空腹静脉血。本研究已通过嘉兴市第一医院医学伦理委员会的审查批准(批准号:LS2021-KY-418),受试对象均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 ELISA测定HCC患者血清中MPO和NE蛋白水平 所有受试者均采集外周静脉血,离心(室温、1 500 r/min、20 min)取血清-80 °C保存备用。实验时,首先将血清与ELISA试剂盒从4 °C取出,室温平衡60 min。按照标准步骤,每孔加入50 μ L标准品或待测血清,随后加入100 μ L酶标试剂(除空白孔)。封板后,37 °C温育60 min,洗涤5次,每次30 s。接着,加入显色剂A和B,37 °C避光孵育15 min。反应终止后,用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度(D)值。

1.2.2 免疫组化 4%多聚甲醛室温固定组织48 h后,脱水包埋切片。脱蜡水化,使用3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶后,在95 °C的抗原修复液中浸泡15 min,自然冷却至室温。10%山羊血清室温封闭30 min,与以下一抗[MPO(1:100)、E-cadherin(1:100)、Vimentin(1:100)、Snail(1:100)]在4 °C孵育过夜。第二天与二抗生物素高效标记山羊抗兔IgG(H+L)(1:100)室温孵育30 min, DAB染色,苏木素复染,脱水封片观察。

1.2.3 小鼠中性粒细胞分离和鉴定 剥离6~8周C57BL/6小鼠股骨和肱骨,剪去骨头两端,用无血清RPIM-1640冲洗,再将细胞悬液置于3 mL Histopaque-1077上, Histopaque-1077置于3 mL Histopaque-1119上,2 000 r/min室温离心30 min,使用吉姆萨染色检测中性粒细胞纯度。

1.2.4 NETs体外诱导 将 2×10^5 个中性粒细胞接种于24孔板中,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)(1 μ mol/L)培养3 h,肉豆蔻酸佛波酯醋酸酯(phorbol myristate acetate, PMA)(20 nmol/L)诱导3 h,收集上清-80 °C保存备用,按ELISA试剂盒说明书操作检测上清中P11瓜氨酸化的组蛋白H3(citrullinated histone H3, CitH3)水平。为了量化NETs,将 2×10^4 个中性粒细胞接种在96孔板中进行相应的处理,加入细胞不可渗透DNA染料Sytox Green(0.2 μ mol/L) 37 °C避光孵育10 min,使用荧光酶标仪测定激发/发射波长为488 nm/520 nm处的荧光值(15 min内测完)。此外,在孵育结束时可直接将

板移至荧光显微镜下观察NETs形成情况。

1.2.5 蛋白质印迹 使用带有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取细胞全蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白质的量。将每条泳道上加载20 μg 蛋白质样品到SDS-PAGE凝胶上,电泳结束后将分离的蛋白质转移到PVDF膜上。将膜与以下一抗[MPO(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、Snail(1:1 000)、TWIST(1:1 000)、FAK(1:1 000)、p-FAK(Tyr397)(1:1 000)、Integrin β 3(1:1 000)、Integrin β 6(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)和 β -Actin(1:1 000)]在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第二天与二抗(1:2 000)室温孵育60 min后显影。

1.2.6 定量实时PCR 使用Trizol试剂从肝癌细胞中提取总RNA,并使用PrimeScriptTM RT Master Mix(Perfect Real Time)将总RNA逆转录为cDNA。*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*Twist*、*N-cadherin*、*E-cadherin*和 β -*actin* mRNA使用SYBR green定量实时PCR一式三份进行定量。相对表达表示为阈值循环的函数,并通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析。引物序列详见表1。

1.2.7 肝癌细胞迁移测定 为了在体外实验中测定NETs对肝癌细胞迁移的影响,提取中性粒细胞种板后,将其随机分为4组:Control组、ATRA组、PMA组、ATRA+PMA组。ATRA组和ATRA+PMA组加入ATRA预处理3 h,之后再向PMA组和ATRA+PMA组中加入NETs诱导剂诱导3 h,诱导NETs后去上清,洗净加入新鲜培养基吹打,1 400 r/min室温离心5 min收集NETs,将收集的各组培养基和正常培养基1:1配制即得各组的条件培养基。

将 2×10^5 个Hep3B和CSQT-2细胞接种于24孔板中,当细胞融合度达到90%时对细胞进行划痕损伤,于24孔板中分别取相应条件培养基250 μL ,再用不含血清的DMEM补至500 μL ,24 h后在显微镜下拍照。

分别取 2×10^5 个Hep3B和CSQT-2细胞,接种于Transwell上室中,其中下室补充有上述不同条件培养基,培养24 h,取出Transwell小室,无水甲醇室温固定15 min,0.1%结晶紫室温染色20 min,PBS洗涤2次,倒置显微镜下观察。

1.2.8 LPS体内诱导NETs的尾静脉注射转移瘤模型 为了确定LPS诱导的NETs对肝癌细胞转移的影响,将24只4~8周龄的C57BL/6小鼠随机分为4组:Control组、LPS组、ATRA组和ATRA+LPS组。将 5×10^6 个Hep1-6细胞注射到C57BL/6小鼠尾静脉。LPS组和LPS+ATRA组:每隔4天,在小鼠腹腔注射LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)体内诱导NETs释放,Control组和ATRA组的小鼠腹腔注射等量无菌PBS。此外,ATRA组和ATRA+LPS组的小鼠每天通过灌胃的方式给予ATRA(10 mg/kg),Control组和LPS组的小鼠灌胃给予等量的橄榄油。8周后处死小鼠,取出肝脏,在室温下用4%多聚甲醛固定24 h,用于后续实验。

1.2.9 皮下移植瘤小鼠肝脏HE染色 4%多聚甲醛固定组织48 h后,脱水包埋切片。苏木精室温核染10 s后脱色,伊红染胞质5 s。脱水封片,拍照观察。

1.2.10 细胞免疫荧光 取对数期生长的Hep3B细胞,取500 μL 细胞悬液接种于铺有多聚赖氨酸爬片

表1 引物序列

Table 1 Sequence for primers

引物名称 Name	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')
β -actin F	TTG TGA TGG ACT CCG GAG AC
β -actin R	TGA TGT CAC GCA CGA TTT CC
TNF- α F	CCA CCA TCA AGG ACT CAA
TNF- α R	CAG GGA AGA ATC TGG AAA GG
IL-1 β F	GAA GTA TGC TTA GCC AGT AAG
IL-1 β R	GAG CGT CGC AAT TGT TGT GG
E-cadherin F	AGC AGA ACT AAC ACA CGG GG
E-cadherin R	ACC CAC CTC TAA GGC CAT CT
N-cadherin F	AGT GGC AGC TGG ACT TGA TC
N-cadherin R	CCG TGG CTG TGT TTG AAA AGG
Twist F	GTC CGC AGT CTT ACG AGG AG
Twist R	GCT CTG GAG GAC CTG GTA GA

的24孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,在 37°C 培养箱中培养24 h。将各组的条件培养基和完全培养基按1:1的比例混合,吸取500 μL 加入到各孔中,在 37°C 培养箱中继续培养24 h。弃培养基,4%多聚甲醛室温固定30 min,0.5% Triton X-100室温通透20 min,10%山羊血清室温封闭30 min。弃封闭液,与以下一抗[Fibronectin(1:500)、Integrin $\beta 6$ (1:500)]在 4°C 孵育过夜。第二天与二抗Alexa Fluor 488(1:500)室温孵育60 min,DAPI染色,加入适量抗荧光淬灭封片剂,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.11 质谱检测ECM相关蛋白氯化修饰 选择处于对数期生长的Hep3B细胞,取500 μL 细胞悬液接种于10 cm大皿中,每皿 1×10^6 个细胞。在 37°C 培养箱中培养24 h。将各组的条件培养基和完全培养基按1:1的比例混合,吸取10 mL加入到各皿中。在 37°C 培养箱中继续培养24 h。按细胞膜蛋白提取试剂盒(Thermo公司,美国)说明书提取细胞膜外蛋白质,收集洗脱液,将洗脱液和 $5\times$ 缓冲液按5:1的比例混合, 95°C 下煮10 min。电泳后切胶送至上海中科新生命生物科技有限公司进行LC-MS/MS分析,LC-MS/MS分析采用易高效液相色谱系统,流速为300 nL/min。用95%缓冲液A(0.1%甲酸水溶液)平衡柱后,使用自动进样器将样品上样于样品板(Thermo Scientific Acclaim公司的PepMap100,100 $\mu\text{m} \times 2$ cm, nanoViper C18)。采用分析柱(Thermo scientific EASY柱,10 cm, ID75 μm , 3 μm , C18-A2),流速为300 nL/min进行分离。分离后的样品使用Q-Exactive质谱仪进行分析。

1.2.12 Western blot检测NETs和氯化修饰的LAMC1对整合素/FAK信号通路的变化 将中性粒细胞(2×10^6)接种于24孔板中,待细胞接近融合后加入药物。实验分为4组,Control组:加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 14.1 mmol/L); NETs诱导组:加入PMA(50 nmol/L); NETs抑制剂单药组:加入ATRA(1 $\mu\text{mol/L}$); NETs抑制组:加入ATRA(1 $\mu\text{mol/L}$),再加入PMA(50 nmol/L)。其中,ATRA与PMA均用DMSO溶解。NETs抑制剂单药组和NETs抑制组先加入ATRA(1 $\mu\text{mol/L}$) 37°C 孵育3 h,Control组和NETs诱导组加入DMSO 37°C 孵育3 h。3 h后NETs诱导组和NETs抑制组加入PMA(20 nmol/L) 37°C 孵育3 h,Control组和NETs抑制剂单药组加入DMSO 37°C 孵育3 h。收细胞进行Western blot实验,检测整合素、FAK等相关蛋白水

平的变化。分别将LAMC1蛋白粉末和HClO粉末用PBS溶液配制成1 mg/L的LAMC1母液和400 $\mu\text{mol/L}$ 的HClO母液。将LAMC1母液与HClO母液室温下混合静置30 min进行氧化,同时制备PBS对照。接种中性粒细胞(2×10^6)接种到6孔板,待接近融合后加入药物,实验分为四组:Control组、LAMC1+HClO组(125 $\mu\text{g/L}$)、LAMC1组(125 $\mu\text{g/L}$)和HClO组(100 $\mu\text{mol/L}$)。培养24 h后进行Western blot实验,检测整合素、FAK等相关蛋白水平的变化。

1.3 统计分析

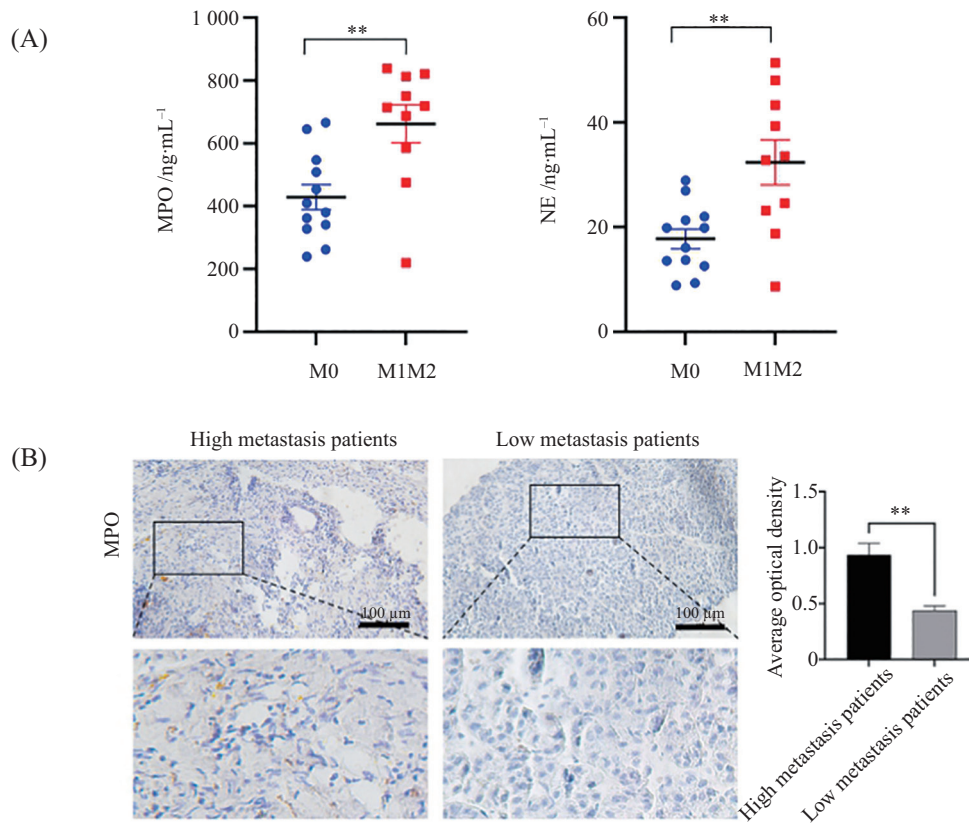
统计分析采用GraphPad Prism9.0软件。所有的值都是三次以上重复实验所得的平均值 \pm 标准误(mean \pm SEM)。实验组之间比较采用的是非成对*t*检验, $P < 0.05$ 时可以认为存在统计学意义。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$; ns,没有统计学意义。

2 结果

2.1 高转移HCC患者血清和肝癌组织中NETs水平升高

本研究把HCC患者分为早期无远端转移(M0)组和晚期有远端转移(M1M2)组。使用ELISA法检测HCC患者血清中的MPO和NE蛋白水平,比较M0组和M1M2组之间患者血清NETs水平的差异,结果如图1A所示。随着HCC的转移程度增加,M1M2组患者血清中MPO和NE蛋白水平逐渐升高。M0组患者血清中MPO的蛋白水平为 428.7 ± 139.1 ng/mL,M1M2组患者血清中MPO的蛋白水平为 662.4 ± 191.5 ng/mL,M1M2组患者血清中MPO蛋白水平显著高于M0组患者,约为M0组患者的1.5倍,具有统计学意义($P < 0.01$)。M0组患者血清中的NE蛋白水平为 17.77 ± 6.49 ng/mL,M1M2组患者血清中的NE蛋白水平为 32.36 ± 13.61 ng/mL,M1M2组患者血清中NE蛋白水平也高于M0组患者,约为M0组患者的1倍,具有统计学意义($P < 0.01$)。结果可得,在不同发展阶段的HCC患者体内,晚期HCC患者体内NETs水平高于早期HCC患者。

此外,为检测不同转移阶段HCC患者肝癌组织中的NETs水平,我们通过收集高转移和低转移HCC患者的肝癌组织,采用免疫组化法检测肝癌组织中MPO蛋白的表达情况。结果(图1B)发现,与低转移HCC患者相比,高转移HCC患者肝癌组织中的MPO蛋白水平显著增加,且具有统计学意义($P < 0.01$)。结



A: 不同发展阶段的HCC患者血清中MPO和NE蛋白水平, 图中不同颜色点代表不同组别, 每一个点代表一位患者; M0期($n=12$): 早期无远端转移; M1M2期($n=10$): 晚期有远端转移; MPO: 髓过氧化物酶; NE: 中性粒细胞弹性蛋白酶; $**P<0.01$; B: HCC患者肝癌组织中MPO蛋白的表达水平, $n=3$, $**P<0.01$ 。

A: levels of MPO and NE proteins in the serum of HCC patients at different stages of development, different colored dots represent different groups, with each dot representing one patient. M0 stage ($n=12$): early stage without distant metastasis; M1M2 stage ($n=10$): late stage with distant metastasis. MPO: myeloperoxidase; NE: neutrophil elastase; $**P<0.01$. B: expression levels of MPO protein in liver cancer tissue of HCC patients. $n=3$, $**P<0.01$.

图1 NETs在HCC患者血清及肝癌组织中的水平

Fig.1 Levels of NETs in the serum and liver cancer tissue of HCC patients

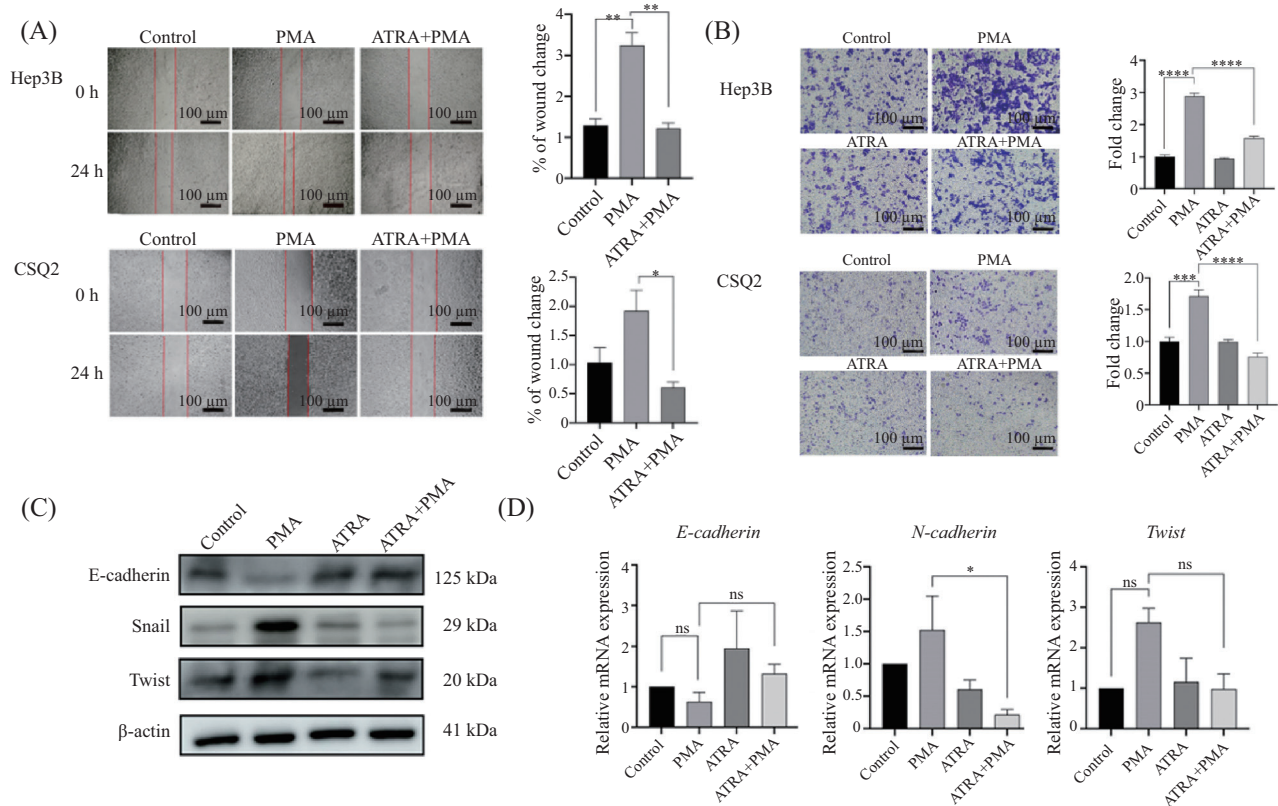
果表明, 高转移HCC患者肝癌组织中的NETs水平升高。

2.2 NETs体外促进肝癌细胞的迁移

本课题组已利用PMA成功诱导了NETs的生成^[16]。为了探究NETs对肝癌细胞迁移的影响, 分别通过划痕法和Transwell法检测NETs对Hep3B和CSQT-2细胞迁移的影响。划痕法结果显示: Hep3B细胞中Control组、PMA组(NETs诱导组)和ATRA+PMA组(NETs抑制组)的相对划痕面积分别为(12.95±2.67)%、(32.43±5.31)%、(12.14±2.36)%; CSQT-2细胞中划痕面积分别为(6.02±1.73)%、(19.25±6.13)%、(10.32±4.45)%。与Control组相比, PMA组Hep3B和CSQT-2细胞的迁移能力增强(图2A)。当使用ATRA预处理后, 与PMA组相比, ATRA+PMA组中肝癌细胞的迁移能力下调。Tran-

swell法结果(图2B)显示: 在Hep3B细胞中, 各组迁移的细胞数分别为: Control组198±2, PMA组570±3, ATRA组187±6, ATRA+PMA组312±23。与Control组相比, PMA组中迁移的细胞数明显增多, 具有统计学意义($P<0.0001$)。使用ATRA抑制NETs生成后, 与PMA组相比, ATRA+PMA组中迁移的细胞数目显著减少($P<0.0001$)。在CSQT-2细胞中, 各组迁移的细胞数分别为: Control组117±13个, PMA组199±21个, ATRA组116±8个, ATRA+PMA组88±11个(图2B)。与Control组相比, PMA组中迁移的细胞数明显增多($P<0.001$)。使用ATRA抑制NETs生成后, 与PMA组相比, ATRA+PMA组中迁移的细胞数目显著减少, 具有统计学意义($P<0.0001$)。结果表明, NETs能够促进Hep3B和CSQT-2细胞的迁移。

为探究NETs对EMT信号通路的调控作用, 通



A: 划痕实验检测NETs对Hep3B细胞和CSQ2-2细胞迁移能力的影响; B: Transwell实验检测NETs对Hep3B细胞和CSQ2-2细胞迁移能力的影响; $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$; C: Western blot检测NETs对Hep3B细胞EMT分子标志蛋白水平的影响; D: qRT-PCR检测NETs对Hep3B细胞中EMT分子标志蛋白水平的影响, $*P<0.05$; ns, 无统计学意义。

A: the scratch assay was used to detect the effect of NETs on the migration ability of Hep3B and CSQ2-2 cells; B: the transwell assay was used to evaluate the effect of NETs on the migration ability of Hep3B and CSQ2-2 cells; $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$; C: the effect of NETs on the levels of EMT molecular marker proteins in Hep3B cells were detected by Western blot; D: the effect of NETs on the levels of EMT markers in Hep3B cells was detected by qRT-PCR, $*P<0.05$, ns, no statistically significant.

图2 NETs体外对肝癌细胞迁移的作用

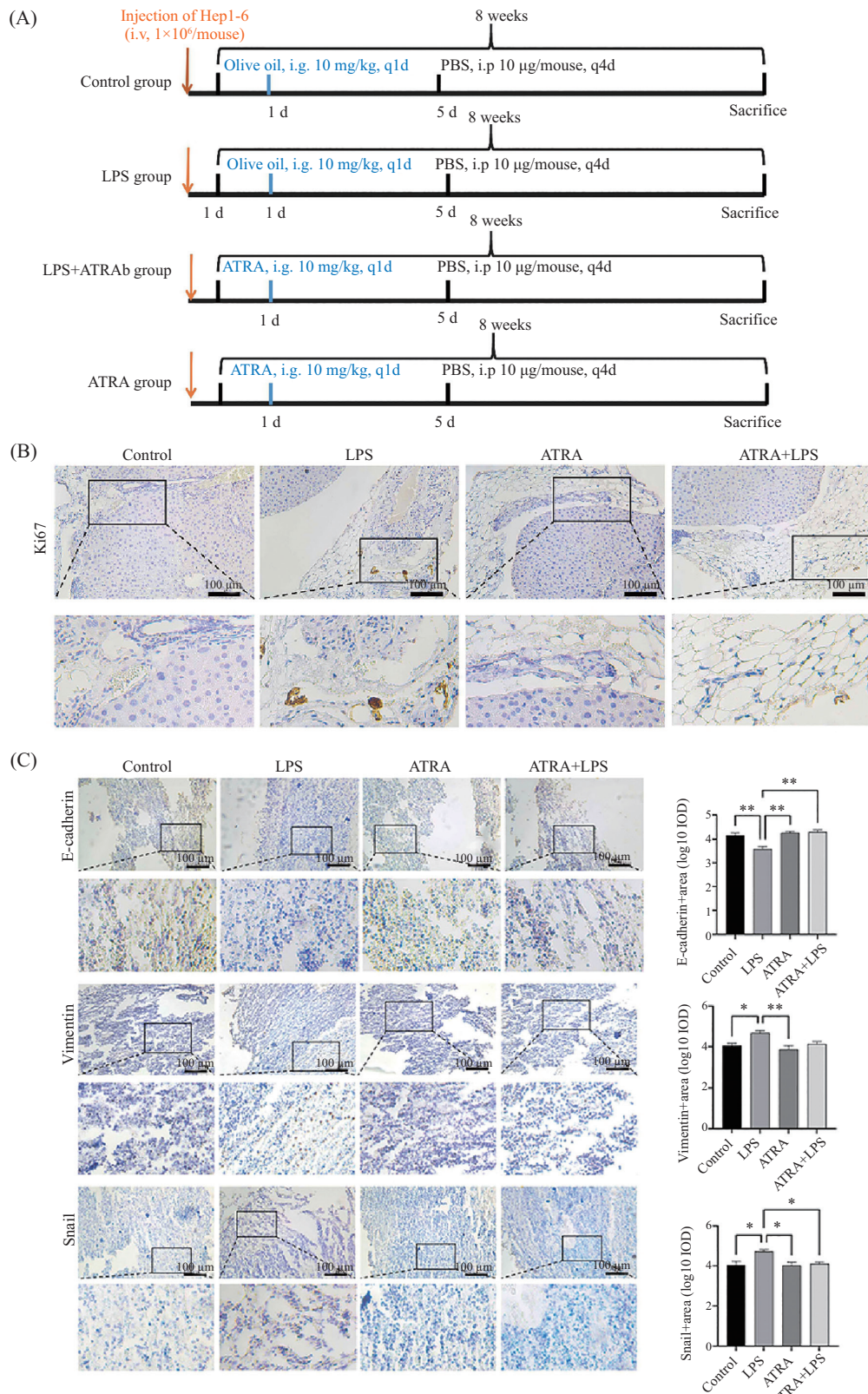
Fig.2 The effect of NETs on the migration of liver cancer cells *in vitro*

过提取蛋白质和总RNA, 进行Western blot和qRT-PCR实验, 检测Hep3B细胞EMT标志蛋白及相关转录因子的表达变化。Western blot结果(图2C)发现, 在Hep3B细胞中, 与Control组相比, ATRA组中E-cadherin、转录因子Twist和Snail的蛋白水平无显著变化, PMA组中E-cadherin表达量降低, 转录因子Twist和Snail的蛋白水平增加。qRT-PCR结果发现(图2D), 与Control组相比, PMA组中E-cadherin的mRNA相对表达水平降低, Twist的mRNA相对表达水平增加, N-cadherin的mRNA相对表达水平增加。结果表明, NETs可以促进Hep3B细胞的EMT, 降低共培养体系中的NETs水平, 抑制了Hep3B细胞的EMT。

2.3 NETs体内促进肝癌细胞的转移

为了在体内评估NETs对肝癌细胞转移的影响, 建立Hep1-6细胞小鼠尾静脉注射转移瘤模型,

并体内LPS诱导NETs生成, 连续给药8周后处死小鼠, 取出肝脏, 使用免疫组化法检测肝脏组织中的Ki67蛋白表达水平(图3A)。结果如图3B所示: 与Control组相比, ATRA组肝脏中的Ki67蛋白水平基本无显著变化, LPS组肝脏中的Ki67蛋白的表达水平升高。使用ATRA抑制NETs生成后, 与LPS组相比, ATRA+LPS组肝脏中的Ki67蛋白水平降低。结果表明, NETs的体内诱导能够促进Hep1-6细胞的肝转移。抑制NETs生成缓解了Hep1-6细胞的肝转移, 这与体外的实验结果一致。接下来, 我们进一步通过免疫组化法检测皮下瘤组织中的EMT标志蛋白的表达变化。结果如图3C所示: 与Control组相比, LPS组中E-cadherin水平降低, Vimentin水平升高, 转录因子Snail水平升高。而用ATRA处理后, 与LPS组相比, LPS+ATRA组中E-cadherin水平升高, Vimentin水平

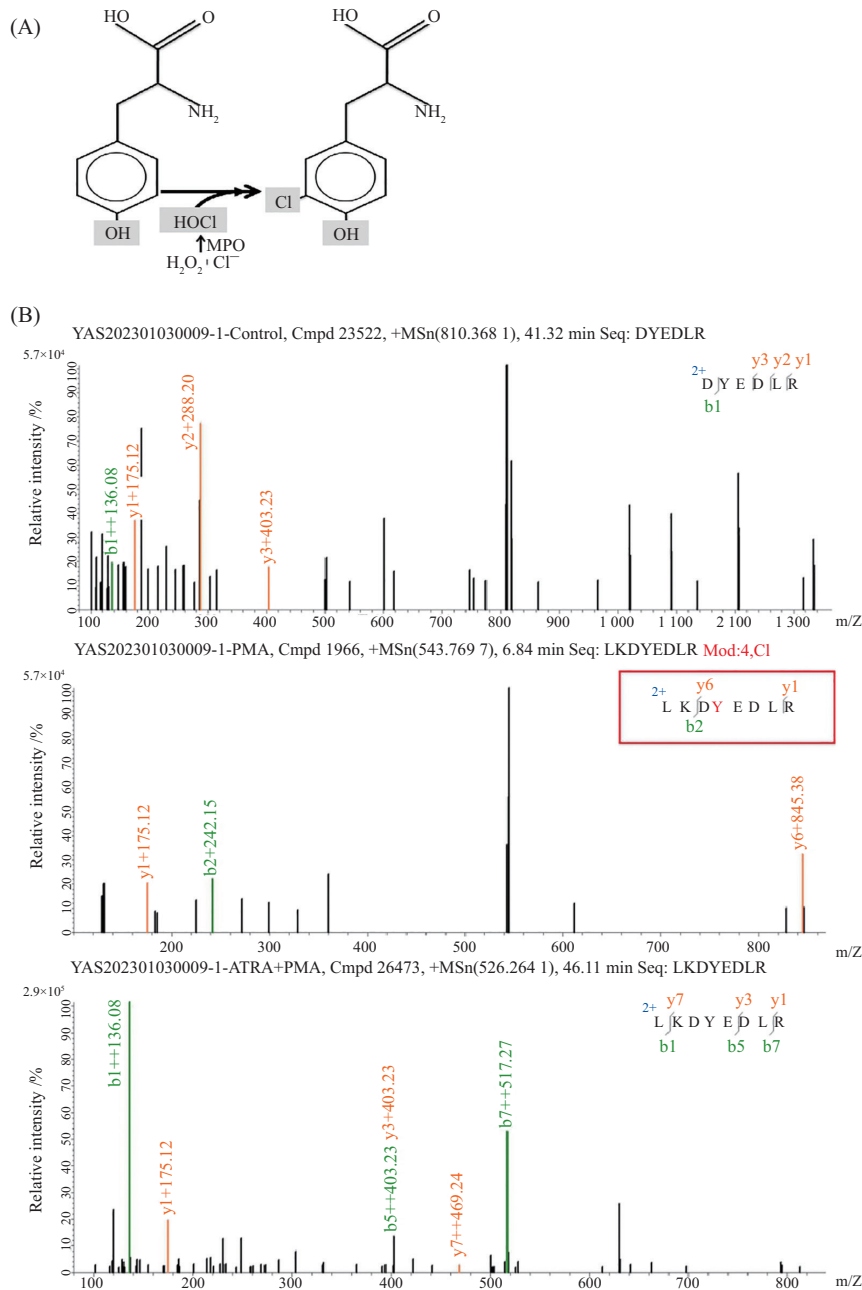


A: 小鼠尾静脉注射转移瘤模型的实验流程图。i.v: 静脉注射; i.g: 灌胃给药; i.p: 腹腔注射; q1d: 每日1次; q4d: 每4天一次; B: NETs对肝癌细胞肝转移的影响, 免疫组化法检测小鼠肝脏中的Ki67蛋白水平表达情况, $n=3$; C: NETs对EMT的影响, $n=3$ 。** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

A: diagram of experimental metastasis model by tail vein injection. i.v: intravenous injection; i.g: intragastric administration; i.p: intraperitoneal injection; q1d: once every day; q4d: once every 4 day; B: the effect of NETs on liver metastasis of liver cancer cells, the level of Ki67 protein expression in mouse liver was detected by immunohistochemistry, $n=3$; C: the effect of NETs on EMT, $n=3$. ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

图3 NETs体内对肝癌细胞转移的作用

Fig.3 The effect of NETs *in vivo* on the metastasis of liver cancer cell



A: MPO对氨基酸氯化修饰的示意图; B: NETs对Hep3B细胞ECM蛋白氯化的影响; Seq: 肽段氨基酸序列; Mod: 肽段修饰。

A: schematic illustration of amino acid chlorination modification by MPO; B: the effect of NETs on chlorination of ECM proteins in Hep3B cells; Seq: peptide amino acid sequence; Mod: peptide modification.

图4 NETs对ECM中LAMC1的修饰

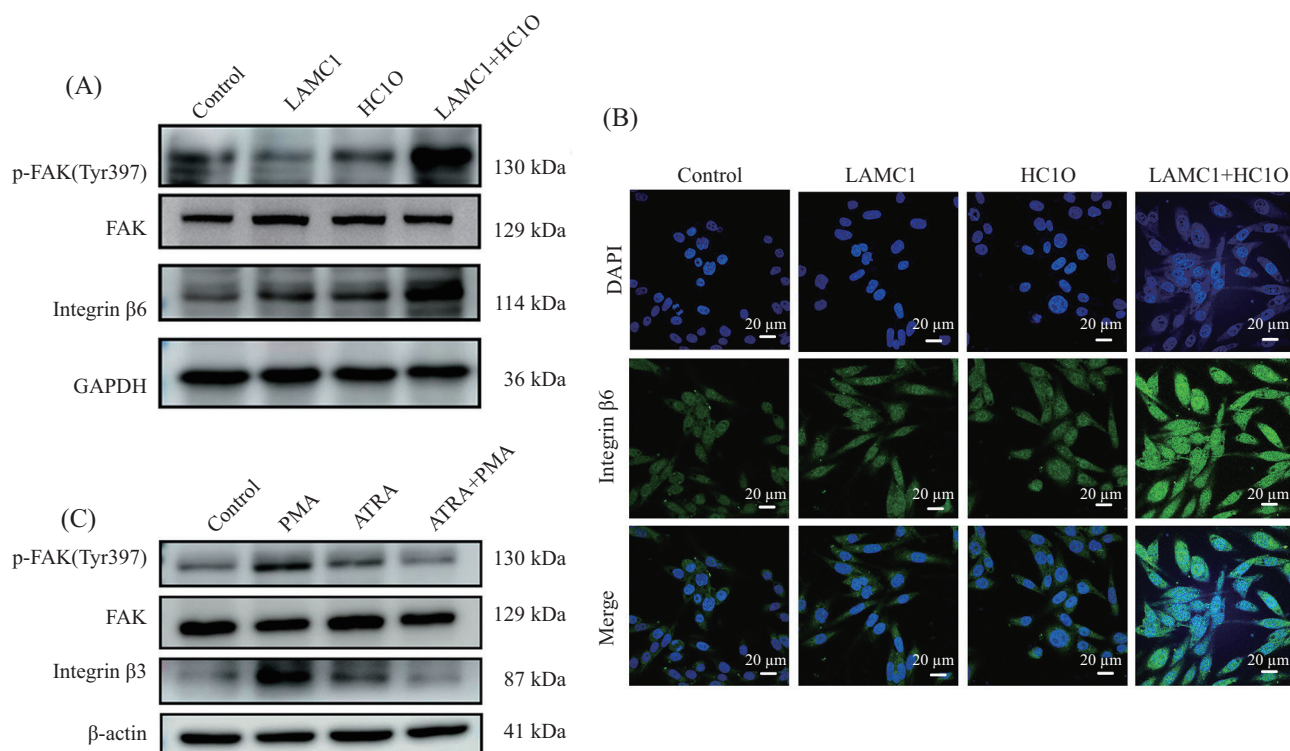
Fig.4 Modification of LAMC1 in ECM by NETs

降低, 转录因子 Snail水平降低。该结果进一步证实 NETs能够促进Hep1-6细胞的肝转移。

2.4 NETs引起ECM中LAMC1的氯化修饰

细胞外基质重塑是肝癌细胞转移的机制之一, 细胞外基质重塑是通过基质合成、分泌、修饰和酶降解之间的平衡来调节的。中性粒细胞被激活形成 NETs时, 中性粒细胞通过NADPH氧化酶产生超氧

阴离子(O_2^-), 超氧阴离子随即在髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的催化下形成次氯酸(HClO)。HClO使周围的细胞外基质发生氯化修饰或者氧化修饰, 其中氯化修饰主要指的是3-Cl-Tyr(图4A)。为探究NETs产生的HClO对HCC细胞中的ECM蛋白的作用, 我们将NETs与Hep3B细胞共培养后提取细胞膜外蛋白, 通过质谱检测ECM相关蛋白的氯化



A: 外源添加氯化化的LAMC1对Hep3B细胞中Integrin $\beta 6$ 蛋白水平的影响; B: Western blot检测外源添加氯化化的LAMC1对Hep3B细胞中Integrin $\beta 6$ 和FAK蛋白水平的影响; C: Western blot检测NETs对Hep3B细胞中整合素 $\beta 6$ 和FAK蛋白水平的影响。

A: the effect of exogenously added chlorinated LAMC1 on the protein level of Integrin $\beta 6$ in Hep3B cells; B: Western blot analysis of the effect of exogenously added chlorinated LAMC1 on the protein levels of Integrin $\beta 6$ and FAK in Hep3B cells; C: Western blot analysis of the effect of NETs on the protein levels of Integrin $\beta 6$ and FAK in Hep3B cells.

图5 NETs对整合素/FAK信号通路的作用

Fig.5 The role of NETs in the Integrin/FAK signaling pathway

情况。结果如图4B所示, NETs与Hep3B细胞共培养24 h后, 与Control组相比, PMA组ECM中CSPG4、LAMC1、HRNR、ANXA5、SERPINB1等蛋白发生了酪氨酸的氯化修饰和蛋氨酸的氧化修饰。其中LAMC1肽段LKDYEDLR中的酪氨酸发生了氯化修饰。当使用ATRA预处理减少NETs生成后, 在Hep3B细胞ECM的LAMC1肽段LKDYEDLR上未检测到酪氨酸的氯化修饰。结果表明, NETs与Hep3B共培养, 可以引起LAMC1肽段LKDYEDLR中的酪氨酸的氯化修饰。

2.5 NETs激活整合素/FAK信号通路

LAMC1是细胞外基质成分, 通过与细胞表面的整合素 $\beta 6$ 相互作用可以激活FAK通路, 进而促进细胞的迁移等生物活性。NETs产生的次氯酸会导致LAMC1的氯化修饰, 那么氯化修饰的LAMC1如何影响整合素/FAK信号通路呢? 为探究次氯酸处理的LAMC1对整合素/FAK信号通路的影响, 首先将重组LAMC1与次氯酸孵育, 获得氯化修饰的LAMC1;

然后在Hep3B细胞中外源添加氯化修饰的LAMC1, 分别以重组LAMC1和次氯酸处理组为对照, 通过Western blot法检测FAK以及p-FAK的水平。结果(图5)显示: 与Control组相比, LAMC1组和HC1O组的p-FAK水平无显著变化, 而LAMC1+HC1O组的p-FAK水平显著升高, 上述四组FAK总蛋白水平一致。该结果说明次氯酸处理的LAMC1激活了整合素/FAK信号通路。为了更直观地观察整合素/FAK通路的激活情况, 我们通过采用免疫荧光的方法检测了整合素/FAK信号通路下游分子整合素 $\beta 6$ 的表达水平, 结果显示: 与Control组相比, LAMC1组和HC1O组的整合素 $\beta 6$ 水平无显著变化, 而LAMC1+HC1O组的整合素 $\beta 6$ 水平显著升高。说明: 次氯酸处理的LAMC1通过激活整合素/FAK信号通路提高了下游分子整合素 $\beta 6$ 的表达水平。

次氯酸处理的LAMC1会激活整合素/FAK信号通路, 而NETs产生的次氯酸会导致LAMC1的氯化修饰, 那么NETs是否会激活整合素/FAK信号通路

呢?为此,我们将NETs与Hep3B细胞共培养后,通过Western blot检测整合素 $\beta 6$ 和FAK蛋白的表达水平。结果发现,与Control组相比,PMA组中整合素 $\beta 6$ 和p-FAK蛋白水平升高,FAK总蛋白水平无显著变化。而使用ATRA抑制NETs生成后,与PMA组相比,ATRA+PMA组中整合素 $\beta 6$ 和p-FAK蛋白水平降低(图5C)。综上所述,NETs释放的HClO引起LAMC1的氯化修饰,可以激活整合素/FAK信号通路;而降低共培养体系中的NETs水平,抑制了整合素/FAK信号通路的转导。

3 讨论

在本文中,为了检测HCC患者体内的NETs水平与HCC转移间的临床联系,首先通过ELISA法检测早期无转移和晚期有转移HCC患者血清中的MPO和NE蛋白水平。结果发现,与早期HCC患者相比,晚期HCC患者体内MPO和NE的蛋白水平显著升高,这提示NETs与HCC的转移呈正相关。这一结果与YANG等^[17]的报道一致,他们发现HCC患者血清中MPO-DNA水平升高,特别是在转移性HCC患者中。但是,ZENLANDER等^[18]则报道,与肝硬化患者相比,HCC患者体内的MPO-DNA或CitH3-DNA蛋白水平并没有升高,与我们的结果不一致,这可能是因为ZENLANDER等^[18]检测的是整个HCC患者群体血浆中的NETs水平,没有单独检测不同发展阶段HCC患者体内的NETs水平。大部分HCC患者都伴有肝硬化,因此医生在诊断时往往难以区分早期HCC患者和肝硬化患者,并且不同患者的个体差异性大,所以得到了相反的结论。但是ZENLANDER等^[18]的研究还是表明,与非肝硬化或非HCC患者相比,肝硬化或HCC患者体内的NETs水平显著升高。接下来,我们通过免疫组化法检测不同转移阶段HCC患者肝癌组织中的MPO蛋白水平。结果发现,高转移HCC患者肝癌组织中的MPO蛋白水平显著高于低转移HCC患者($P < 0.01$)。我们的结果与先前几项NETs在其他肿瘤中的研究结果一致,在胃癌中,通过检测胃癌组织中CitH3和NE蛋白水平,发现与正常组织相比,胃癌组织内沉积了大量的NETs,表明NETs与胃癌的发展及转移具有密切的联系^[19]。在胶质瘤中,通过检测不同分期胶质瘤组织中的MPO和NE蛋白水平,发现IV级胶质瘤组织中的NETs水平高于II级或III级胶质瘤组织,提示

NETs的形成与胶质瘤的恶性转移显著相关^[20]。综上所述,NETs与肿瘤转移之间关系密切,检测肿瘤患者体内的NETs水平或许能够成为预测肿瘤转移的新型生物标志物,早期靶向NETs对于缓解肿瘤转移具有潜在的意义。

为探究NETs对HCC转移的影响,我们选用肝癌细胞系Hep3B和CSQT-2与NETs体外共培养,考察NETs对肝癌细胞的作用。Transwell实验结果发现,NETs能够促进Hep3B和CSQT-2细胞的迁移。在体内实验中我们也发现NETs能够促进Hep1-6细胞的肝转移。我们的结果与许多先前报道的结果一致,在乳腺癌中,XIAO等^[21]报道,组织蛋白酶C通过调节中性粒细胞的浸润和NETs的形成,促进乳腺癌的肺转移。此外,在胃癌中发现,NETs可以通过TGF- β 信号转导通路促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[22]。这些结果都表明NETs在肿瘤转移中发挥着重要的作用。

ECM重塑是HCC转移的机制之一。ECM是由细胞分泌到细胞外间质中的大分子物质,构成复杂的网络结构,调节细胞的生理活动。ECM结构中最具代表性的蛋白质是胶原蛋白、弹性蛋白、FN和LAMC1等^[23]。ECM的沉积、化学修饰、蛋白降解等都会引起ECM的重塑,引起肿瘤的增殖、迁移、耐药等^[24]。当中性粒细胞被激活后,细胞膜上的NADPH氧化酶被激活,NADPH氧化酶将NADPH的电子传递给氧气,生成超氧阴离子,然后经过超氧化物歧化酶的作用,将超氧阴离子转化为 H_2O_2 。当中性粒细胞形成NETs时,释放的MPO可以催化 H_2O_2 和Cl⁻之间的反应,产生HOCl^[25]。NETs衍生的HClO会引起蛋白质广泛的氧化修饰和氯化修饰,改变蛋白质的结构和活性,并影响生物系统的功能^[26]。为探究HCC中NETs对ECM蛋白的氯化作用,我们通过质谱检测ECM相关蛋白变化发现,NETs会引起ECM中LAMC1肽段LKDYEDLR中的酪氨酸氯化修饰。我们的结果与一项关于动脉粥样硬化的研究类似,MPO衍生的HClO对FN进行了氯化修饰,在动脉粥样硬化病变中纤维帽的形成、发展和稳定中发挥了关键作用^[27]。此外,在胸主动脉瘤中,MPO衍生的HClO在调节胸主动脉瘤发病机制中也发挥着重要的作用,包括改变ECM稳态、活化基质金属蛋白酶、诱导内皮功能障碍和血管平滑肌细胞表型转化以及转导ERK1/2信号通路^[28]。我们发现NETs产生的HClO能够引起肝癌细胞ECM中的LAMC1的酪氨

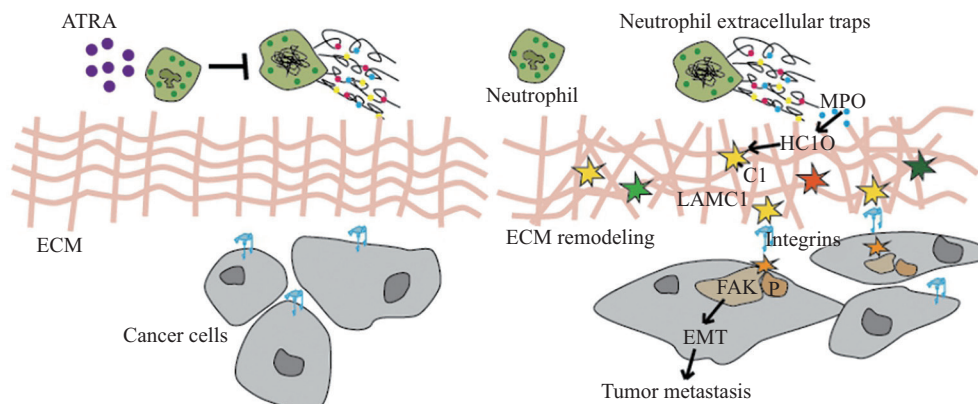


图6 NETs促进HCC转移的机制假说

Fig.6 Hypothesis of the mechanism by which NETs promote HCC metastasis

酸氯化修饰, 重塑ECM, 这对于我们认识HCC的发病机制也具有一定意义。

FAK是调控多条信号通路的交叉点, 如PI3K/Akt、MAPK、EMT等。其中, EMT是肿瘤转移的关键信号通路^[29]。体内体外实验已表明, NETs促进了HCC的转移。为探究NETs对EMT信号通路的调控作用, 通过Western blot、qRT-PCR等方法探究EMT相关蛋白的变化。Western blot结果发现, NETs与Hep3B细胞共培养24 h后, 下调了E-cadherin水平, 上调了Snail和Twist水平。在皮下肿瘤组织中也得到了一致的结果。此外, qRT-PCR实验结果和免疫组化实验结果也显示NETs促进了肝癌细胞的EMT。综上所述可得, NETs在调控HCC细胞的EMT过程中发挥着重要的作用。

4 结论

根据上述实验结果, 本章提出了NETs促进HCC转移的机制假说(图6): 中性粒细胞浸润到肝脏形成NETs, NETs释放的HClO通过对LAMC1的酪氨酸的氯化修饰, 诱导ECM的重塑并激活整合素/FAK信号通路, 进而引起肝癌细胞的迁移。因此, NETs有望成为HCC新的治疗靶点, 抑制NETs的生成或者抑制受NETs调控的信号通路对于缓解HCC的转移具有潜在的价值。

参考文献 (References)

- [1] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN S L, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 745-61.
- [2] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular

carcinoma [J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-62.

- [3] BAGHBAN R, ROSHANGAR L, JAHANBAN-ESFAHLAN R, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 59.
- [4] BELHABIB I, ZAGHDOUDI S, LAC C, et al. Extracellular matrices and cancer-associated fibroblasts: targets for cancer diagnosis and therapy [J]? *Cancers*, 2021, 13(14): 3466.
- [5] TZANAKAKIS G, NEAGU M, TSATSAKIS A, et al. Proteoglycans and immunobiology of cancer-therapeutic implications [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 875.
- [6] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-5.
- [7] SOLLBERGER G, TILLEY D O, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization [J]. *Dev Cell*, 2018, 44(5): 542-53.
- [8] HONDA M, KUBES P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(4): 206-21.
- [9] PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(2): 134-47.
- [10] BERGER-ACHITUV S, BRINKMANN V, ABED U A, et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoeediting [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 48.
- [11] MARTINS-CARDOSO K, ALMEIDA V H, BAGRI K M, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) promote pro-metastatic phenotype in human breast cancer cells through epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1542.
- [12] SANTAMATO A, FRANSVEA E, DITURI F, et al. Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production [J]. *Clin Sci*, 2011, 121(4): 159-68.
- [13] SCHRADER J, GORDON-WALKER T T, AUCOTT R L, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1192-205.
- [14] 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.
- [15] WANG J, SJOBERG S, TANG T T, et al. Cathepsin G activity lowers plasma LDL and reduces atherosclerosis [J]. *Biochim*

- Biophys Acta, 2014, 1842(11): 2174-83.
- [16] 王金丽, 刘志丹, 王晓敏, 等. 全反式维甲酸通过激活BMP2的表达抑制中性粒细胞胞外诱捕网的形成[J]. 中国细胞生物学学报(WANG J L, LIU Z D, WANG X M, et al. All trans-retinoic acid inhibits the formation of neutrophil extracellular trapping by activating BMP2 [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(11): 2057-70.
- [17] 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]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 3.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] ZHA C, MENG X, LI L, et al. Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1/RAGE/IL-8 axis [J]. Cancer Biol Med, 2020, 17(1): 154-68.
- [21] XIAO Y, CONG M, LI J, et al. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation [J]. Cancer Cell, 2021, 39(3): 423-37.
- [22] 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.
- [23] PAOLILLO M, SCHINELLI S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4947.
- [24] WINKLER J, ABISOYE-OGUNNIYAN A, METCALF K J, et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5120.
- [25] DA CRUZ NIZER W S, INKOVSKIY V, OVERHAGE J. Surviving reactive chlorine stress: responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid [J]. Microorganisms, 2020, 8(8): 1220.
- [26] HAWKINS C L. Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences [J]. Essays Biochem, 2020, 64(1): 75-86.
- [27] NYBO T, CAI H, CHUANG C Y, et al. Chlorination and oxidation of human plasma fibronectin by myeloperoxidase-derived oxidants, and its consequences for smooth muscle cell function [J]. Redox Biol, 2018, 19: 388-400.
- [28] MALECKI C, HAMBLY B D, JEREMY R W, et al. The role of inflammation and myeloperoxidase-related oxidative stress in the pathogenesis of genetically triggered thoracic aortic aneurysms [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7678.
- [29] SAITOH M. Involvement of partial EMT in cancer progression [J]. J Biochem, 2018, 164(4): 257-64.