

中性粒细胞胞外诱捕网通过重塑细胞外基质促进 肝癌细胞增殖并损伤肝细胞功能

钟泓灵^{1#} 王金丽^{2#} 肖思嘉² 沈侃¹ 钱辰¹ 王文喜² 詹淑玉¹ 程树群³ 郑永霞^{1*}

(¹嘉兴大学医学院, 嘉兴 314001; ²浙江工业大学药学院, 杭州 310014; ³东方肝胆外科医院肝外六科, 上海 200433)

摘要 肝细胞癌(HCC)是一种常见的恶性肿瘤, 慢性炎症是其发生发展的重要驱动因素。中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)作为炎症反应的重要组成部分, 通过影响肿瘤微环境发挥促进肿瘤增殖、迁移、免疫逃逸等作用。该研究旨在深入探讨NETs在调控HCC增殖和代谢重编程中的作用。在体外实验中, 建立NETs与肝癌细胞系Hep3B体外共培养模型, 通过CCK-8实验、细胞周期检测、软琼脂克隆形成等实验, 考察NETs对肝癌细胞增殖的影响。在体内实验中, 建立小鼠Hep1-6细胞皮下移植瘤模型并使用脂多糖诱导小鼠体内NETs形成。通过测量小鼠肿瘤大小, 检测肝脏病理变化等指标, 考察NETs对肿瘤生长的作用。另外, 通过检测肝癌组织和肝癌细胞中的糖原含量以及HCC中糖酵解相关基因的表达情况, 从而探究NETs对肝癌细胞代谢以及肝细胞功能的影响。最后, 为了探讨NETs影响HCC增殖的机制, 通过免疫荧光的方法检测了细胞外基质纤连蛋白(Fn)的表达水平, 并通过Western blot检测了Fn所介导的整合素通路的活性。体外实验表明, NETs与Hep3B细胞共培养可以显著促进Hep3B细胞增殖。体内实验进一步证实, NETs可以诱导C57BL/6小鼠炎症细胞浸润肝脏并加速Hep3B细胞移植瘤的生长。代谢分析显示, NETs降低了肝癌细胞内的糖原储备, 增强了糖酵解活性, 同时Hep3B细胞上清中的ALT水平升高提示Hep3B细胞功能受损。机制研究表明: NETs通过上调细胞外基质中Fn的表达重塑肿瘤微环境, 从而为肝癌细胞的生长提供有利条件。因此, 该研究揭示NETs通过诱导ECM重塑促进HCC增殖, 增强糖酵解, 并损伤肝细胞功能。

关键词 中性粒细胞胞外诱捕网; 肝细胞癌; 肿瘤增殖; 细胞外基质重塑; 代谢重编程

Neutrophil Extracellular Traps Promote Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Impair Hepatocyte Function by Remodeling the Extracellular Matrix

ZHONG Hongling^{1#}, WANG Jinli^{2#}, XIAO Sijia², SHEN Kan¹, QIAN Chen¹, WANG Wenxi², ZHAN Shuyu¹,
CHENG Shuqun³, ZHENG Yongxia^{1*}

(¹Medical College, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ²School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; ³Sixth Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200433, China)

收稿日期: 2024-10-17

接受日期: 2025-02-19

浙江省公益应用技术研究项目(批准号: LGD22H160004)、嘉兴市公益研究项目(批准号: 2023AY11006)和嘉兴大学大学生创新训练计划(批准号: 8517241010)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 0573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

Received: October 17, 2024

Accepted: February 19, 2025

This work was supported by the Zhejiang Province Public Welfare Applied Technology Research Project (Grant No.LGD22H160004), the Jiaxing City Public Research Project (Grant No.2023AY11006), and the Student Research Training of Jiaxing University (Grant No.8517241010)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

Abstract HCC (hepatocellular carcinoma) is a prevalent malignant tumor, and chronic inflammation is a critical driving force in its development. NETs (neutrophil extracellular traps), as key products of the inflammatory response, play a significant role in the tumor microenvironment. This study aimed to investigate the role of NETs in regulating HCC proliferation and metabolic reprogramming. *In vitro*, a co-culture system of NETs and Hep3B was established. The effects of NETs on HCC cell proliferation were evaluated using CCK-8 assays, cell cycle analysis, and soft agar colony formation assays. *In vivo*, a subcutaneous tumor xenograft model was established in mice, and NETs were induced by lipopolysaccharide. Tumor growth was evaluated by measuring tumor size and examining liver pathological changes. Moreover, the effects of NETs on the metabolism and function of liver cancer cells were explored by detecting glycogen content in liver cancer tissues and cells and the expression of glycolysis-related genes, respectively. Finally, immunofluorescence staining was used to detect the expression of Fn (fibronectin) in the extracellular matrix to explore the underlying mechanisms, and Western blot was used to measure the activity of the integrin pathway mediated by Fn. Results showed that co-culture with NETs promoted the proliferation of Hep3B cells *in vitro*. *In vivo*, NETs promoted tumor growth and inflammatory cell infiltration in the liver of C57BL/6 mice. Additionally, NETs decreased glycogen levels in HCC cells, enhanced glycolytic activity, and increased the levels of ALT (alanine transaminase) in the cell culture supernatant, suggesting impaired liver function. Mechanistically, NETs increased the expression of Fn in the extracellular matrix, remodeling the tumor microenvironment and providing a favorable condition for tumor cell growth. Therefore, this study reveals that NETs promote HCC proliferation by inducing ECM remodeling, enhance glycolysis, and impair hepatocyte function.

Keywords neutrophil extracellular traps; hepatocellular carcinoma; tumor proliferation; extracellular matrix remodeling; metabolic reprogramming

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内发病率和死亡率均位居前列的恶性肿瘤,其发生发展与慢性炎症密切相关^[1]。研究表明,慢性炎症不仅通过直接诱导肝细胞基因突变驱动癌变^[2],还通过构建肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)促进肿瘤的增殖、侵袭及转移^[3]。

中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞激活后释放的DNA-组蛋白-颗粒蛋白复合物,最初被发现参与宿主防御病原体入侵^[4]。近年来研究发现,NETs在肿瘤进展中发挥双重作用:一方面NETs通过促进肿瘤转移和血栓形成加速疾病恶化^[5],另一方面通过重塑TME影响肿瘤生物学行为^[6]。临床证据表明,血管内NETs水平与肿瘤患者不良预后显著相关^[7],例如创伤后脓毒症患者的循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)水平显著升高^[8],而血清中的cfDNA水平可以部分反映血管中NETs的水平,因此这提示NETs可能是炎症-肿瘤恶性转化的潜在介质。

HCC的恶性表征包括异常增殖和代谢重编程等表型,本研究聚焦NETs对HCC增殖和代谢的调

控作用,通过以下策略展开:基于体外实验,建立了NETs与肝癌细胞系Hep3B体外共培养模型,系统观察了NETs对Hep3B细胞增殖、克隆形成能力、细胞周期及糖酵解的影响;基于体内实验,建立了小鼠Hep1-6细胞皮下移植瘤模型,联合脂多糖诱导了NETs形成,检测了NETs对HCC细胞生长和糖酵解的作用。本研究揭示了NETs在HCC发生发展中的新机制,为靶向NETs的抗肿瘤治疗提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 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。

1.1.2 实验动物 雄性,8~12周龄C57BL/6小鼠购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司。研究符合《赫尔辛基宣言》原则,并经嘉兴大学医学院实验动物伦理委员会的批准(批准号:JUMC2023-018)。

1.1.3 实验试剂 过碘酸-雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色试剂盒、L-乳酸检测试剂盒以及 β -actin、GPI、HK2、SLC2A1、SLC2A4引物均购于上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠中性粒细胞分离和鉴定 取8~12周龄C57BL/6小鼠,处死后无菌分离股骨和肱骨,剪去骨两端,用无血清RPMI-1640培养基冲洗骨髓腔。将细胞悬液缓慢叠加于3 mL梯度混合液(Histopaque-1077与Histopaque-1119按体积比1:1混合)上,室温条件下2 000 r/min离心30 min。收集Histopaque-1077与Histopaque-1119界面处的中性粒细胞层,将收集的中性粒细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h,使用吉姆萨染色检测中性粒细胞纯度。

1.2.2 NETs体外诱导 将中性粒细胞(2×10^5 /孔)接种于24孔板中,分4组处理:Control组[14.1 mmol/L二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)]、PMA组[20 nmol/L肉豆蔻酸佛波酯醋酸酯(phorbol myristate acetate, PMA)]、ATRA组[1 μ mol/L全反式维甲酸(all-*trans* retinoic acid, ATRA)]、ATRA+PMA组[1 μ mol/L ATRA处理3 h后加入20 nmol/L PMA]。处理后PBS清洗,完全培养基培养24 h,收集上清于-80 °C保存备用。

1.2.3 CCK-8试剂盒用于检测细胞的增殖能力 分别取对数期生长的Hep3B细胞,设置Control组、PMA组、ATRA组和ATRA+PMA组;将各组诱导产生的条件培养基(具体诱导方法见1.2.2)和完全培养基按1:1的比例混合(终稀释度为50%);将Hep3B细胞以 2×10^6 /mL的密度接种于96孔板中;37 °C、5% CO₂培养箱中分别培养24、48、72 h;每孔加入10 μ L CCK-8溶液,继续孵育1 h;酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(D)值。

1.2.4 细胞周期检测实验 分别取对数期生长的Hep3B细胞,设置Control组、PMA组和ATRA+PMA组,将各组诱导产生的条件培养基(具体诱导方法见1.2.2)和完全培养基按1:1的比例混合,分别重悬Hep3B细胞,取500 μ L细胞悬液接种于24孔板中,每孔 1×10^5 个细胞。在37 °C培养箱中培养24 h。用碘化丙啶给细胞染色。

1.2.5 细胞软琼脂克隆实验 按1:1体积比例,将3 mL 1.2%琼脂糖溶液和3 mL 2 $\times$ DMEM培养基混匀,取1.5 mL注入6孔板中,等待凝固。将中性粒细胞(2×10^6 /孔)接种到24孔板中,按1.2.2步骤体外诱导NETs。弃上清液,各组加入500 μ L DMEM培养基吹打重悬,得到条件培养基,在-80 °C保存。分别取对数期生长的Hep3B细胞,将细胞悬液稀释成

2×10^4 /mL。吸取100 μ L细胞悬液加入到含0.35%琼脂糖的DMEM培养基中,混匀。将含有细胞的琼脂糖悬液加入到6孔板中。设置Control组、PMA组、ATRA组和ATRA+PMA组。于37 °C、5% CO₂培养箱中培养10~14天。在培养过程中,将各组诱导获得的条件培养基(具体诱导方法见1.2.2)和完全培养基按1:1比例混合,吸取750 μ L加入到各组中。2周后,镜下观察。

1.2.6 LPS体内诱导NETs的皮下注射转移瘤模型 为了确定LPS诱导的NETs对肝癌细胞增殖的影响,将32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。具体操作如下:将 5×10^6 个Hep1-6细胞注射到C57BL/6小鼠背部皮下组织。肿瘤生长到14天后,每隔2天,LPS组和ATRA+LPS组的小鼠通过腹腔注射的方式给予LPS(10 μ g/只),Control组和ATRA组的小鼠腹腔注射等量无菌PBS。在14~28天,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组的小鼠灌胃等量的橄榄油。4周后处死小鼠,取出肝脏和移植瘤,一部分室温固定在4%多聚甲醛中,另一部分冻存于-80 °C中,用于后续实验。

1.2.7 皮下移植瘤小鼠肝脏HE染色 将1.2.6中的移植瘤取出后,用4%多聚甲醛室温固定组织48 h后,石蜡包埋切片。苏木精室温核染10 s后脱色,伊红室温染胞质5 s。脱水封片,拍照观察。

1.2.8 糖原染色 取对数生长期的不同组别(Control组、PMA组、PMA+ATRA组)的Hep3B的细胞进行消化重悬;4%的多聚甲醛室温固定20 min;然后根据上海碧云天生物技术股份有限公司所提供的PAS染色试剂盒说明书处理:过碘酸溶液氧化10 min, Schiff试剂室温避光染色15 min,苏木精室温复染2 min,最后伊红室温对比染色30 s;中性树胶封片并在显微镜下观察。

1.2.9 ELISA检测Hep3B细胞中ALT(alanine transaminase)的水平 取对数生长期的不同组别(Control组、PMA组和PMA+ATRA组)的Hep3B细胞,将每组细胞分为两个亚组,其中一个亚组在原培养液内加入CCl₄(100 mmol/L),另一亚组更换为原培养液,培养3 h后离心(室温、800 r/min、5 min)取上清,按照常规的ELISA的实验步骤,先在室温下进行抗体的包被和包埋,之后在37 °C恒温箱中孵育90 min,再洗涤,最后除去孔中残余液体,并加入ADHP工作液,室温避光孵育5~15 min,之后加入终

止液使反应终止, 用酶标仪测定 450 nm 波长处的 D 值。

1.2.10 细胞免疫荧光 取对数生长期的不同组别(Control组、PMA组、PMA+ATRA组)的Hep3B的细胞接种于经多聚赖氨酸包被的24孔板爬片上, 37 °C培养24 h。小心吸取上清, PBS洗涤3次, 每次5 min; 4%多聚甲醛室温固定20 min, PBS洗涤3次, 每次5 min; 5% BSA-PBST室温封闭1 h; 与兔抗纤连蛋白抗体(1:100) 4 °C孵育过夜; 次日回收一抗, PBS洗涤3次, 每次5 min; 与山羊抗兔Alexa Fluor 488标记抗体(1:500)室温避光孵育1 h; PBS洗涤3次, 每次5 min; DAPI染液避光室温孵育10 min; 自发猝灭剂处理5 min, 封片后在荧光显微镜下观察拍片。

1.2.11 定量实时PCR 使用Trizol试剂从肝癌细胞中提取总RNA, 并使用Prime-Script™ RT Master Mix(Perfect Real Time)将总RNA逆转录为cDNA。*β-actin*(货号: QH00001S)、*GPI*(货号: QH03145S)、*HK2*(货号: QH03345S)、*SLC2A1*(货号: QH05633S)、*SLC2A4*(货号: QH05637S)等基因使用SYBR green进行实时定量PCR。具体反应体系为每个孔加入1 μL RNA、5 μL SYBR green、0.4 μL上游引物、0.4 μL下游引物和3.2 μL DEPC水; 具体扩增循环体系为预变性(95 °C、2 min)、变性(95 °C、30 s)、退火(60 °C、30 s)、延伸(68 °C、20 s), 其中变性、退火和延伸需重复30个循环。各基因的相对表达水平表示为Ct值, 并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

1.2.12 蛋白质印迹分析 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。等量的蛋白样品通过SDS-PAGE凝胶分离并转移至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉室温封闭2 h后, 用TBST洗涤, 加入一抗[Fn(1:1 000)、p-FAK(Tyr397)(1:2 000)、 β -actin(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)] 4 °C孵育过夜, 次日用TBST洗涤, 然后用二抗(1:1 000)孵育1 h, 最后显影。

1.2.13 乳酸检测 取各组(Control组、PMA组和PMA+ATRA组) Hep3B细胞的培养上清, 按照L-乳酸检测试剂盒(货号: S0227S)说明书检测上清L-乳酸水平: 稀释后每孔加入50 μL细胞上清, 每组设3个复孔, 加等体积反应工作液; 37 °C避光孵育30 min; 酶标仪测定570 nm波长处的 D 值。

1.2.14 统计分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进

行数据分析, 实验数据用平均值±标准误(mean±SEM)表示。两组间均数比较用 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NETs体外促进Hep3B细胞增殖

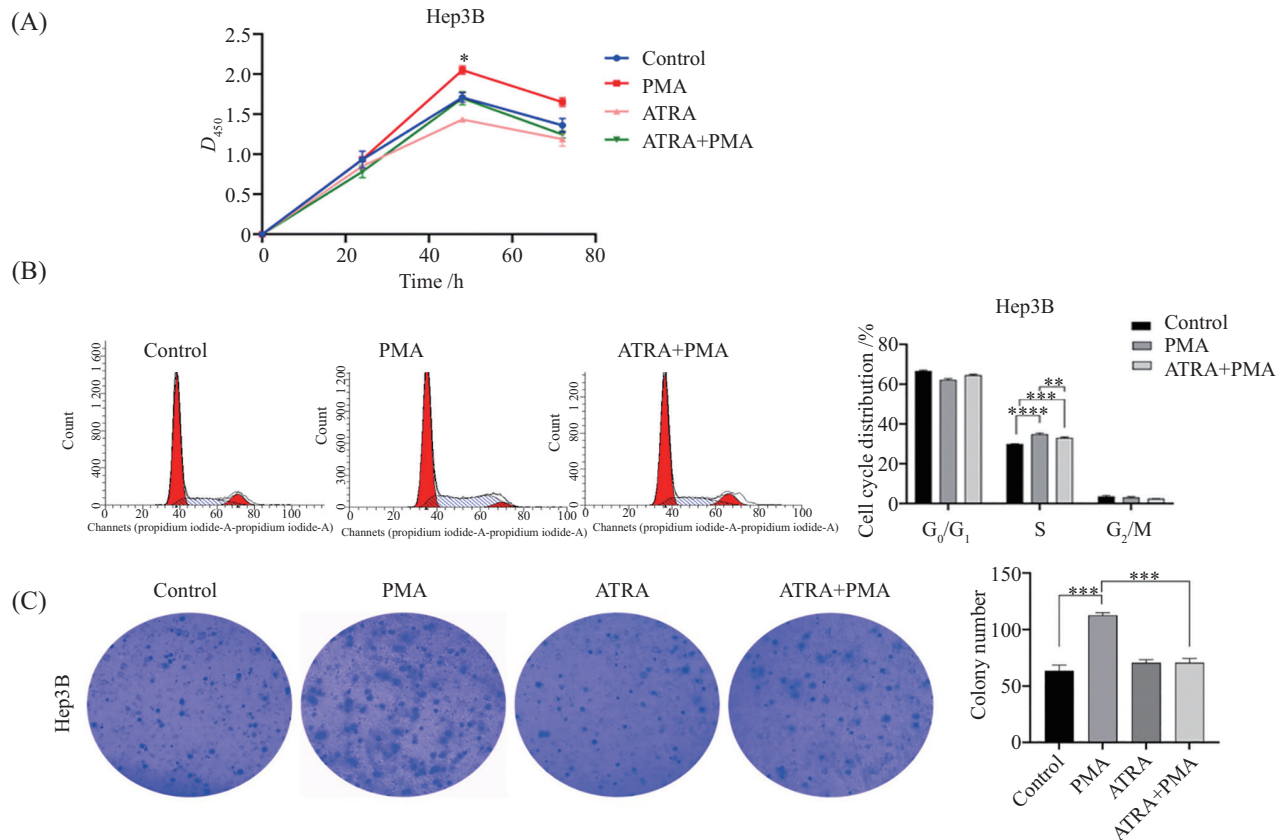
本课题组已利用PMA成功诱导了NETs的生成^[9]。为了探究NETs对肝癌细胞增殖的影响, 我们采用CCK-8法检测了Hep3B细胞在NETs条件培养基培养后的增殖能力。结果如图1A所示: 各组处理的Hep3B细胞在48 h时细胞活力达到顶峰, 我们比较了各组Hep3B细胞培养48 h的 D 值。与Control组相比, PMA组细胞活力显著升高[(2.04±0.05) vs (1.75±0.10), $P<0.05$], ATRA+PMA组细胞活力相较于PMA组有所降低[(1.75±0.10) vs (2.04±0.05), $P<0.05$]。结果表明: NETs能够促进Hep3B的增殖, 而ATRA通过抑制NETs的生成, 能够减弱NETs对肝癌细胞的促增殖作用。

为了进一步探究NETs对肝癌细胞周期的影响, 我们采用流式细胞术分析了Hep3B细胞与NETs共培养后的细胞周期分布。结果如图1B所示: 与Control组相比, PMA组Hep3B细胞处于S期的比例显著升高[(37.8±0.2)% vs (29.6±0.1)%, $P<0.000 1$]; ATRA+PMA组细胞处于S期的细胞比例相较于PMA组有所降低[(35.4±0.1)% vs (37.8±0.2)%, $P<0.01$], 但仍高于对照组, 提示ATRA能够部分抑制NETs对Hep3B细胞周期的调控。流式细胞周期分析表明, NETs诱导了肝癌细胞的DNA含量分布向S期偏移, 提示细胞周期进程加快, 细胞增殖活跃。

另外, 我们通过软琼脂克隆形成实验进一步探究了NETs对肝癌细胞克隆形成能力的影响。结果显示(图1C): 与Control组比, PMA组Hep3B细胞形成的克隆数显著增加[(113±4) vs (64±9), $P<0.001$]。ATRA+PMA组的克隆数相较于PMA组显著减少[(71±6) vs (113±4), $P<0.001$]。以上实验结果表明, NETs能够显著增强Hep3B细胞的克隆形成能力。综上所述, NETs促进了肝癌细胞的增殖。

2.2 NETs能够促进皮下肿瘤的增殖

为了进一步探究NETs在体内对肝癌细胞增殖的影响, 我们建立了Hep1-6细胞皮下移植瘤模型, 并在其体内利用LPS诱导了NETs形成, 具体实验方法



A: CCK-8检测NETs对Hep3B细胞增殖能力的影响。B: 流式细胞术检测NETs对Hep3B细胞细胞周期的影响。C: 软琼脂克隆形成实验检测NETs对Hep3B细胞克隆形成能力的影响。 $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: CCK-8 assay was used to detect the effect of NETs on the proliferation ability of Hep3B cells. B: flow cytometry was used to detect the effect of NETs on the cell cycle of Hep3B cells. C: soft agar assay was used to detect the effect of NETs on the clonogenic ability of Hep3B cells. $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图1 NETs体外对肝癌细胞增殖的作用

Fig.1 The effect of NETs on the proliferation of liver cancer cells *in vitro*

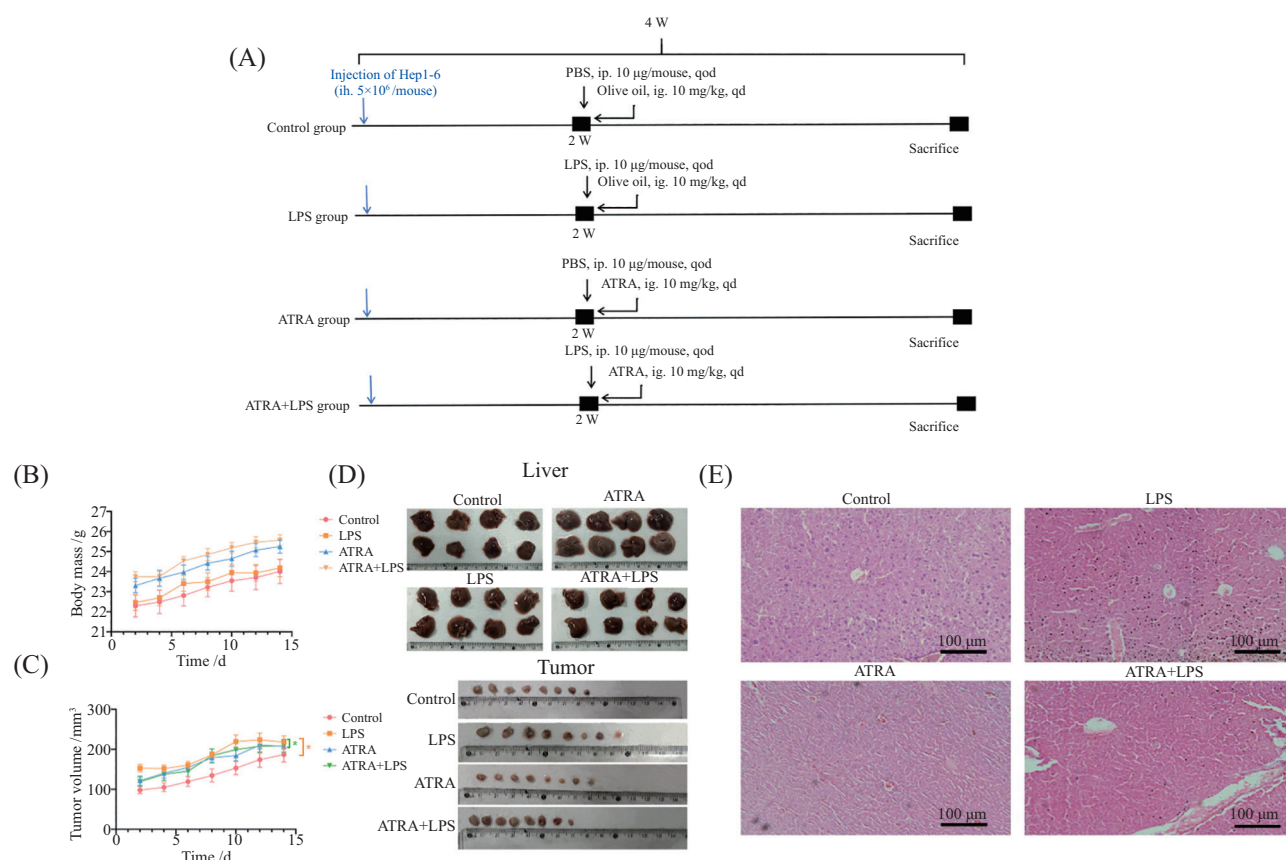
如图2A所示。通过测量小鼠体质量发现, 各组小鼠体质量基本稳定增加, 无显著差异($P>0.05$)(图2B)。处死小鼠后, 取出瘤体测量其体积, 结果如图2C和图2D所示, 在LPS诱导NETs生成后, 与Control组相比, LPS组小鼠的肿瘤体积显著增大[(218.3±0.5) mm³ vs (196.2±1.5) mm³, $P<0.05$], 表明NETs促进了肿瘤生长。而ATRA+LPS组的肿瘤体积明显小于LPS组[(212.8±1.0) mm³ vs (218.3±0.5) mm³, $P<0.05$], 提示ATRA能够抑制NETs诱导的肿瘤生长。HE染色结果显示, LPS组小鼠肝脏中存在明显的炎症细胞浸润, 而ATRA组和ATRA+LPS组的炎症反应均有所减轻, 尤其是ATRA+LPS组(图2E)。体内实验结果表明, NETs能够诱导肝脏炎症并促进肿瘤生长。

2.3 NETs驱动肝癌细胞代谢重编程并诱导肝癌细胞损伤

肝癌细胞的糖代谢重编程是肝癌细胞适应恶

性生长环境的重要机制。鉴于NETs在调控肿瘤细胞增殖中的重要作用, 我们推测NETs可能也影响肝癌细胞的糖代谢过程。因此, 我们研究了NETs对肝癌细胞Hep3B糖代谢的影响, 并评估了其潜在影响。

首先, 通过糖原染色, 我们发现PMA组Hep3B细胞的糖原含量是对照组的(69±15)% (图3A, $P<0.01$)。该结果说明: NETs降低了肝癌细胞中的糖原水平。接下来, 我们通过qRT-PCR检测了糖代谢相关基因(*GPI*、*HK2*、*SLC2A1*、*SLC2A4*)的表达情况。*GPI*编码的是葡萄糖-6-磷酸异构酶, 主要参与葡萄糖-6-磷酸的糖异生过程; *HK2*编码了糖酵解中的关键酶——己糖激酶, 主要参与糖酵解的过程; *SLC2A1*和*SLC2A4*分别编码葡萄糖转运蛋白1和葡萄糖转运蛋白4, 主要负责将葡萄糖从细胞外转运到细胞内。结果如图3B所示, 与Control组所比,



A: 小鼠皮下注射转移瘤模型的实验流程图。ih.: 皮下注射; ig.: 灌胃给药; ip.: 腹腔注射; qod: 2天1次; qd: 1天1次。B: NETs对小鼠体质量的影响, $n=8$ 。C: NETs对小鼠皮下肿瘤生长的影响, $n=8$ 。D: 处死小鼠后摘取肝脏和肿瘤, $n=8$ 。E: HE染色检测小鼠肝脏中的病理变化。

A: experimental flow chart of subcutaneous injection of metastatic tumor model in mice. ih.: injectio hypodermic; ig.: intragastric; ip.: intraperitoneal; qod: once every 2 days; qd: once a day. B: effect of NETs on body mass of mice, $n=8$. C: effect of NETs on subcutaneous tumor growth in mice, $n=8$. D: livers and tumors were harvested after mice were sacrificed, $n=8$. E: HE staining was used to detect the pathological changes in mouse liver.

图2 NETs体内对皮下肿瘤和肝脏的作用

Fig.2 The effect of NETs on subcutaneous tumors and liver *in vivo*

PMA组 *SLC2A1* 的表达水平为对照组的 (3.57 ± 0.49) 倍 ($P < 0.001$); 同时, PMA组 *SCL2A1* 的表达水平是 PMA+ATRA组的 (3.04 ± 0.23) 倍 ($P < 0.001$)。同样地, 与 Control组相比, PMA组 *SLC2A4* 的表达水平为对照组的 (2.17 ± 0.03) 倍 ($P < 0.001$); 同时, PMA组 *SCL2A4* 的表达水平是 PMA+ATRA组的 (1.49 ± 0.06) 倍 ($P < 0.001$)。与 Control组相比, PMA组 *GPI* 的表达水平是 Control组的 (2.17 ± 0.31) 倍 ($P < 0.001$); 而 PMA组 *GPI* 的表达水平是 ATRA+PMA组的 (9.46 ± 0.91) 倍 ($P < 0.001$)。与 Control组所比, PMA组 *HK2* 的表达水平是 Control组的 (3.49 ± 0.38) 倍 ($P < 0.001$); 而 PMA组 *HK2* 的表达水平是 ATRA+PMA组的 (5.06 ± 0.68) 倍 ($P < 0.001$)。这说明 NETs 形成后, 细胞更倾向于通过糖酵解来产生 ATP。

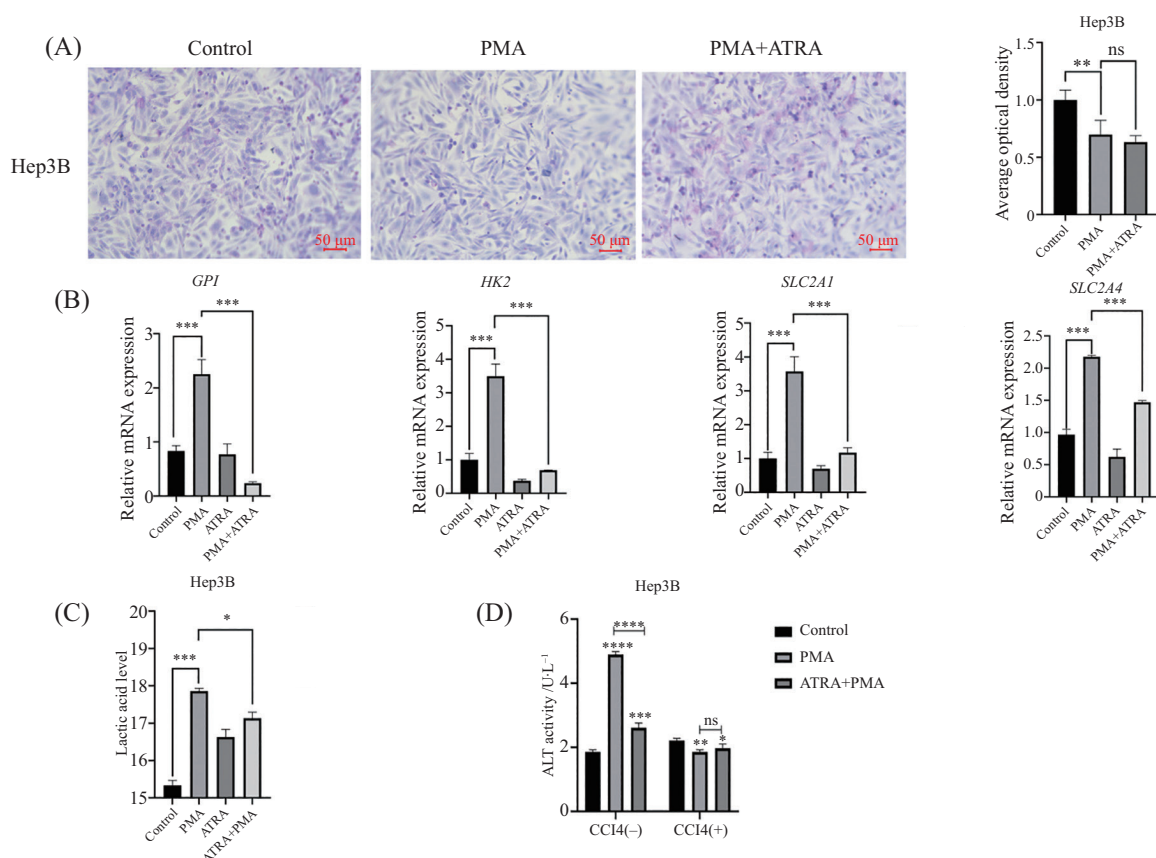
通过乳酸试剂盒检测 Hep3B 细胞上清中的乳酸含量 (图 3C), 发现与 Control 组相比, NETs (PMA

组) 提高了肝癌细胞中的乳酸水平, 为 Control 组的 (1.16 ± 0.03) 倍 ($P < 0.001$), 然而加入 ATRA 后, 乳酸含量显著下降, 为 Control 组的 (96 ± 0.1)% ($P < 0.05$)。这说明 NETs 促进了肝癌细胞的糖酵解过程。

为了进一步探讨 NETs 对肝功能的影响, 我们检测了细胞培养上清液中 ALT 的水平。结果显示, 在 Hep3B 细胞中, NETs (PMA 组) 能够诱导肝细胞损伤, 表现为 ALT 水平升高 ($P < 0.0001$)。有趣的是, 当细胞受到 CCl_4 刺激时, PMA 组细胞的 ALT 水平没有明显变化, 这提示 NETs 与其他肝损伤因素的相互作用机制较为复杂, 需要进一步深入研究 (图 3D)。

2.4 NETs 促进 Hep3B 细胞中纤连蛋白 (Fn) 的表达

肝癌细胞中的 Fn 作为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的关键组分, 通过整合素受体介导细胞的黏附和迁移^[10]。为探究 NETs 是否通过改变 Hep3B 中 Fn 的表达或分布影响肿瘤微环境, 我们检



A: 糖原染色检测不同组别Hep3B细胞中的糖原含量。同时用ImageJ分析不同组别的灰度值。B: qRT-PCR检测NETs对糖代谢的影响。C: 乳酸试剂盒检测Hep3B细胞上清中乳酸浓度。D: NETs对Hep3B细胞ALT水平的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ^{ns} $P>0.05$ 。
A: glycogen content in Hep3B cells was detected by glycogen staining. Meanwhile, ImageJ was used to analyze the gray values of different groups. B: qRT-PCR was used to detect the effect of NETs on glucose metabolism. C: lactic acid concentration in supernatant of Hep3B cells was detected by lactic acid kit. D: effect of NETs on ALT levels in Hep3B cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ^{ns} $P>0.05$.

图3 NETs对Hep3B细胞糖代谢和肝功能的作用

Fig.3 Effects of NETs on glucose metabolism and liver function of Hep3B cells

测了NETs对Hep3B中Fn表达的调控作用: 将NETs条件培养基与Hep3B细胞共培养, 并对Hep3B中Fn进行免疫荧光染色。结果如图4所示: PMA组Hep3B中Fn的荧光强度显著高于Control组(1.12 ± 0.02)倍($P<0.001$), 表明NETs促进了Hep3B中Fn的表达; 而加入ATRA抑制NETs生成后, Hep3B中Fn的表达水平显著降低了10.44%($P<0.001$), 说明ATRA能够抑制NETs诱导的Hep3B中Fn表达水平增加。这些结果表明, NETs通过上调肝癌细胞中Fn的表达重塑细胞外基质, 进而促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性表型。

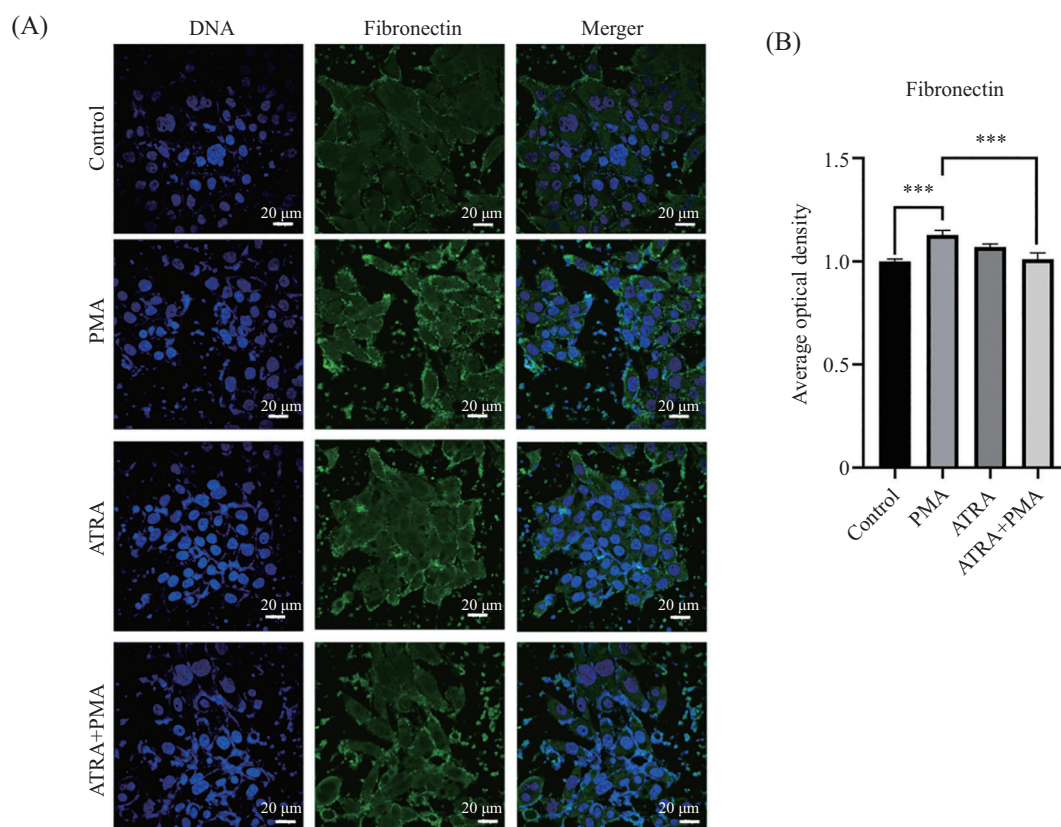
2.5 NETs激活了Hep3B细胞中的integrin $\beta 3$ /FAK信号通路

通常说来, ECM中的各种蛋白成分(如Fn、LAMC1)与肝癌细胞表面的整合素结合, 激活FAK信号通路, 从而调控肝癌细胞的增殖、迁移等生物学行

为。因此, 我们将NETs条件培养基与Hep3B细胞共培养后通过Western blot检测了Hep3B细胞中Fn的受体integrin $\beta 3$ 、总FAK和p-FAK的表达水平。结果发现, 与Control组相比, PMA组中integrin $\beta 3$ 和p-FAK蛋白水平明显升高, 而FAK总蛋白水平无明显变化。而使用ATRA抑制NETs后, 与PMA相比, ATRA+PMA组中integrin $\beta 3$ 和p-FAK蛋白水平降低(图5)。这说明NETs激活了Hep3B细胞中的integrin $\beta 3$ /FAK信号通路。

3 讨论

本研究揭示了NETs在肝癌细胞增殖及糖代谢中的重要作用, 并初步探讨了其作用机制。我们的研究(图6)表明NETs通过诱导肿瘤微环境中ECM的重塑, 促进肿瘤细胞的恶性进展。具体而言, NETs的产生伴随着肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)水平的升高, 这在我们前期的研究



A: NETs与肝癌细胞共培养后ECM相关蛋白变化情况。B: 通过ImageJ对不同组别的纤连蛋白荧光强度进行统计分析。*** $P < 0.001$ 。

A: changes of ECM-related proteins after NETs were co-cultured with hepatocellular carcinoma cells. B: statistical analysis of the fluorescence intensity of fibronectin in different groups by ImageJ. *** $P < 0.001$.

图4 NETs对ECM重塑的影响

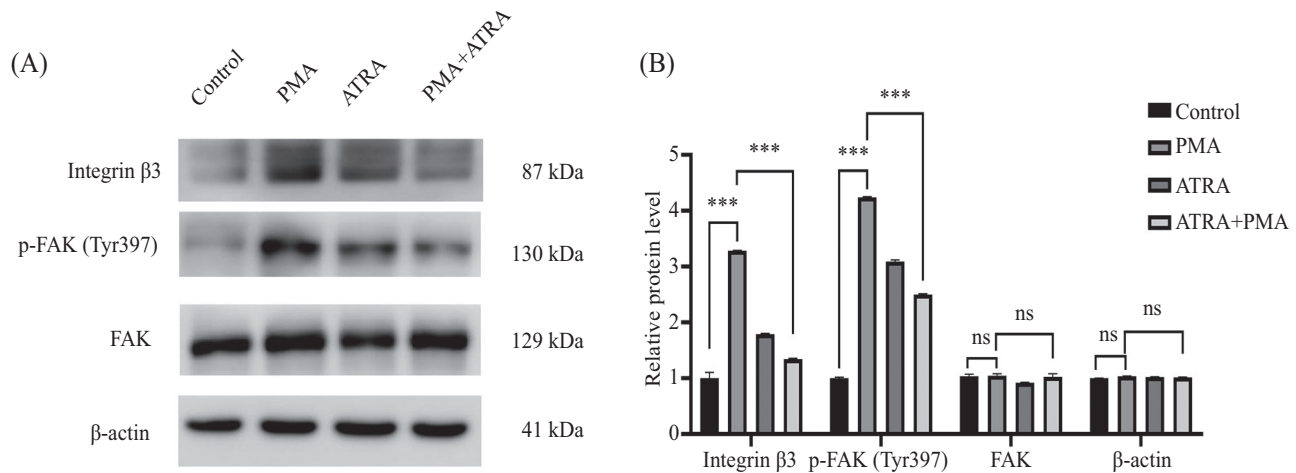
Fig.4 Effects of NETs on ECM remodeling

中已经证实。TNF- α 作为一种重要的炎症因子,一方面可以导致肝癌细胞的损伤;另一方面能够刺激ECM中Fn等基质蛋白的表达,而Fn作为一种重要的细胞黏附分子,Fn与整合素的结合会激活FAK信号通路,将细胞外信号转导到细胞内,从而促进肿瘤细胞的增殖和糖代谢的重编程。

多项研究显示:NETs通过多种机制促进肝癌细胞增殖。一方面,NETs上的配体,如DNA、组蛋白等,可以直接激活肝癌细胞表面受体,触发PI3K/Akt、MAPK等信号通路,从而促进细胞增殖^[11-12]。另一方面,NETs诱发的炎症反应释放大量的炎症因子,如TNF- α 、IL-6等,进一步激活NF- κ B、MAPK等信号通路^[13-14],放大促增殖信号。NETs形成的网状结构可以为肝癌细胞提供物理支架,促进细胞的黏附、迁移和增殖^[15]。此外,NETs诱发的炎症反应可以招募更多的免疫细胞,如肿瘤相关巨噬细胞(tumour-associated macrophages, TAMs)^[16],进一步促进肿瘤的生长和转移。本研究提出了一种新的作用机制,即

NETs通过增加细胞外基质中Fn的表达水平,重塑细胞外基质^[17]。而integrin/FAK信号通路是细胞与细胞外基质相互作用的重要信号转导通路,当细胞与ECM中的配体结合时,整合素聚集成簇,激活FAK,进而激活一系列下游信号分子,引发复杂的细胞内信号转导。Fn可以激活肝癌细胞上的整合素等信号通路,促进肿瘤的增殖、迁移以及血管生成等^[18-19]。因此,本研究从细胞外基质重塑的角度解释了NETs促进肝癌细胞增殖的机制。

肿瘤细胞为了适应快速增殖的需要,会发生代谢重编程,即从氧化磷酸化转向糖酵解,以满足能量和生物合成物质的需求。这种现象被称为Warburg效应。因此,糖酵解和代谢重编程的增强是肿瘤细胞的特征。有研究显示NETs促进了肝星状细胞的代谢重编程,即NETs通过Toll样受体3/环氧合酶-2/环氧合酶-2途径诱导HSC的代谢重编程,在代谢功能障碍相关的脂肪性肝炎的发展中起关键作用^[15]。此外,NETs通过不同的机制诱导肝癌细胞的代谢重编程。



A: NETs对Hep3B细胞中FAK相关蛋白表达水平的影响。B: 通过ImageJ对不同组别Hep3B细胞中FAK相关蛋白的Western blot灰度值定量并进行统计分析。*** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$ 。

A: effect of NETs on the expression levels of FAK-related proteins in Hep3B cells. B: statistical analysis of FAK-related protein intensity in Hep3B cells from different groups by ImageJ. *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$.

图5 Western blot检测NETs对Hep3B细胞中FAK蛋白水平的影响

Fig.5 Western blot analysis of the effect of NETs on the protein levels of FAK in Hep3B cells

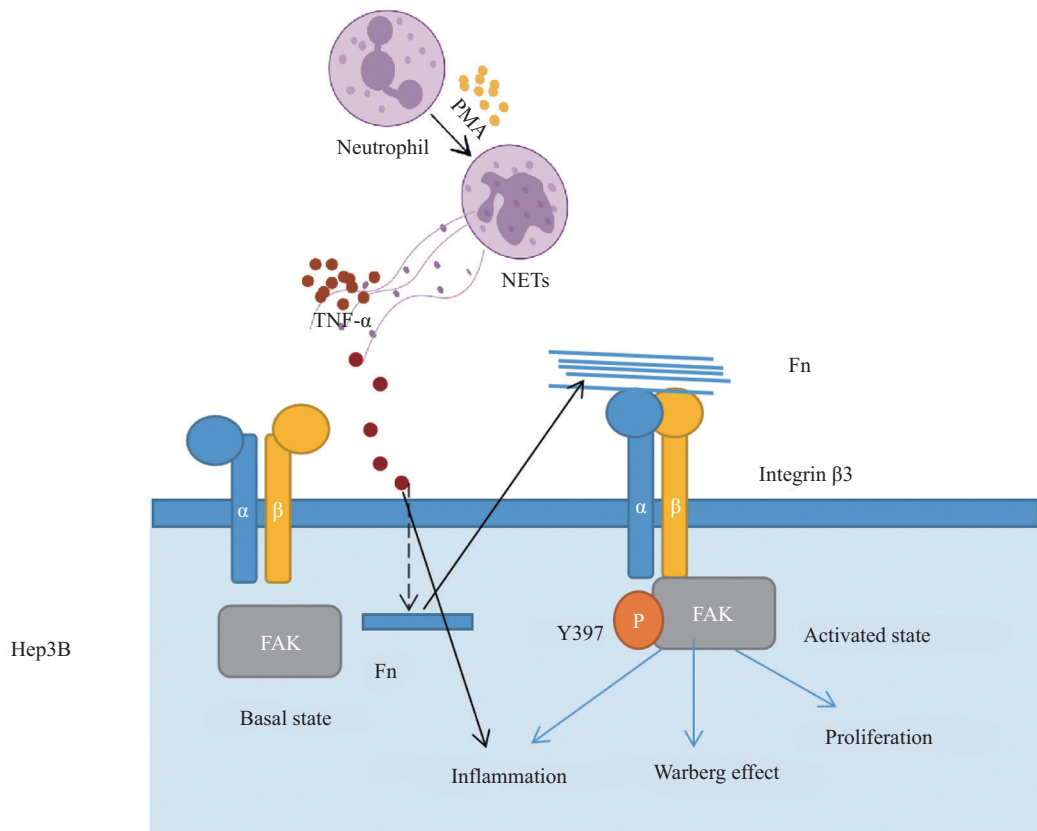


图6 NETs促进Hep3B细胞增殖的机制图

Fig.6 Mechanistic diagram of NETs promoting tumor proliferation

比如: NETs诱导的炎症反应可能导致肝癌细胞代谢发生重编程^[20-21], 以满足快速增殖的能量需求, 从而导致糖原水平的降低。再如: NETs通过影响线粒体

功能, 导致氧化磷酸化受损^[22], 进一步加剧糖原的消耗。以上研究与本实验的结果是一致的。总之, 我们的研究表明: NETs通过提高细胞外基质中Fn的表

达水平激活FAK通路, FAK的激活不仅促进了肝癌细胞的增殖, 还诱导了肝癌细胞发生代谢重编程, 从而促进了肿瘤的发生发展。

未来研究将致力于NETs对细胞外基质蛋白表达的影响以及对细胞外基质物理性质(包括细胞外基质蛋白的交联程度, 以及细胞外基质的刚性、空隙大小和水合程度)的影响。

本研究通过体外细胞实验和体内动物模型, 系统研究了NETs对肝癌细胞增殖、代谢重编程和肝细胞损伤的影响。结果表明: NETs不仅显著促进了肝癌细胞的增殖, 还诱导了其代谢重编程, 表现为糖原储存减少和糖酵解增强; 同时, NETs导致了血清ALT水平升高, 提示肝细胞功能受损。同时, NETs通过上调细胞外基质中Fn的表达水平, 重塑了肿瘤微环境, 为肝癌进展创造了有利条件。综上所述, NETs在肝癌的发生发展中发挥多重调控作用, 包括促进肿瘤增殖、介导代谢重编程及改造微环境, 因此靶向NETs形成可能成为肝癌治疗的新策略。

参考文献 (References)

- [1] RINGELHAN M, PFISTER D, O'CONNOR T, et al. The immunology of hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(3): 222-32.
- [2] BRENNER C, GALLUZZI L, KEPP O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation [J]. *Hepatology*, 2013, 59(3): 583-94.
- [3] CHEN C, WANG Z, DING Y, et al. Tumor microenvironment-mediated immune evasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1133308.
- [4] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-5.
- [5] ERPENBECK L, SCHÖN M P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression [J]? *Oncogene*, 2017, 36(18): 2483-90.
- [6] KALTENMEIER C, YAZDANI H O, MORDER K, et al. Neutrophil extracellular traps promote T cell exhaustion in the tumor microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 785222.
- [7] COOLS-LARTIGUE J, SPICER J, MCDONALD B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis [J]. *Clin Invest*, 2013, 123(8): 3446-58.
- [8] LI R H L, JOHNSON L R, KOHEN C, et al. A novel approach to identifying and quantifying neutrophil extracellular trap formation in septic dogs using immunofluorescence microscopy [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 210.
- [9] 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 traps by activating BMP2 [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(11): 2057-70.
- [10] JMAGUIRE J E, DANAHEY K M, BURKLY L C, et al. T cell receptor- and beta 1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in human T cells [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(6): 2079-90.
- [11] FENG W, CHEN J, HUANG W, et al. HMGB1-mediated elevation of KLF7 facilitates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through upregulating TLR4 and PTK2 [J]. *Theranostics*, 2023, 13(12): 4042-58.
- [12] YIN Y, DAI H, SUN X, et al. HRG inhibits liver cancer lung metastasis by suppressing neutrophil extracellular trap formation [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(6): e1283.
- [13] AN Z, LI J, YU J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 2928-38.
- [14] TEIJEIRA Á, 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): 856-71.
- [15] XIA Y, WANG Y, XIONG Q, et al. Neutrophil extracellular traps promote MASH fibrosis by metabolic reprogramming of HSC [J]. *Hepatology*, 2025, 81(3): 947-61.
- [16] CASTANHEIRA F V S, KUBES P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation [J]. *Blood*, 2019, 133(20): 2178-85.
- [17] MONTI M, IOMMELLI F, DE ROSA V, et al. Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171362.
- [18] LOOD C, BLANCO L P, PURMALEK M M, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 146-53.
- [19] MA X, LI J, LI M, et al. Nets in fibrosis: bridging innate immunity and tissue remodeling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 137: 112516.
- [20] ZHENG X, YANG L, SHEN X, et al. Targeting Gsk3 α reverses immune evasion to enhance immunotherapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Immunother Cancer*, 2024, 12(8): e009642.
- [21] SUN L, YANG X, YUAN Z, et al. Metabolic reprogramming in immune response and tissue inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(9): 1990-2001.
- [22] FANG Q, STEHR A M, NASCHBERGER E, et al. No NETs no TIME: crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1075260.