

AGM-S3基质细胞共培养对中性粒细胞自发凋亡及其免疫功能的影响

王永荣 范玉龙 吕梦楠 马润芝 孙孟宇 孔鑫垚 王彤 冯四洲 韩明哲 许元富*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 国家血液病临床医学研究中心, 天津 300020)

摘要 AGM-S3细胞是从小鼠主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM)分离的细胞系。该文通过建立体外AGM-S3基质细胞共培养体系, 以揭示AGM-S3细胞对终末分化中性粒细胞存活和功能的影响。结果表明, AGM-S3细胞共培养显著延迟了中性粒细胞的死亡(半衰期从20 h延长到48 h), 同时维持中性粒细胞正常的趋化、吞噬和活性氧释放功能。进一步研究表明, AGM-S3细胞可能通过分泌细胞因子(如IL-6、MCP-1和IL-1 α 等)激活中性粒细胞促存活信号通路(比如Akt), 促进Mcl-1和Bcl-xl持续表达, 且抑制Caspase-3分子活化。在腹膜炎小鼠模型中, 将体外共培养24 h的中性粒细胞从尾静脉输注到小鼠体内, 其可以正常募集到炎症部位。研究结论提示, AGM-S3细胞可以维持终末分化中性粒细胞的存活和功能, 而且这些中性粒细胞在移植到小鼠体内后具有正常的免疫活性。该研究将为今后针对粒缺和难治性感染病人的输注, 以及中性粒细胞功能修饰等研究提供新的策略和实验依据。

关键词 中性粒细胞; AGM-S3细胞; 凋亡; 细胞因子

Effects of Co-culture of AGM-S3 Stromal Cells on Spontaneous Apoptosis and Immune Function of Neutrophils

Wang Yongrong, Fan Yulong, Lü Mengnan, Ma Runzhi, Sun Mengyu, Kong Xinyao, Wang Tong, Feng Sizhou, Han Mingzhe, Xu Yuanfu*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, National clinical research center for hematology, Tianjin 300020, China)

Abstract AGM-S3, a cell line derived from the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region. We established a co-culture system *in vitro* to study the effect of AGM-S3 cells on the neutrophils. The results showed that co-culture with AGM-S3 cells could significantly delayed neutrophils death (the half-life was extended from 20 h to 48 h), maintained the functions of chemotaxis, phagocytosis and the release of reactive oxygen species (ROS) as well. Further studies indicated that AGM-S3 cells mainly activated pro-survival signaling pathways (such as Akt) in neutrophils by secreting cytokines (such as IL-6, MCP-1, and IL-1 α , etc.), which promoted the continuous expression

收稿日期: 2019-06-04 接受日期: 2019-07-05

重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB964903)、中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2016-12M-1-003)、国家自然科学基金(批准号: 81970107、81600083、31700783)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2018RC31002、2018PT32034)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909415, E-mail: xu9669@hotmail.com

Received: June 4, 2019 Accepted: July 5, 2019

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2015CB964903), the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2016-12M-1-003), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107, 81600083, 31700783), and the Non-profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2018RC31002, 2018PT32034)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909415, E-mail: xu9669@hotmail.com

网络出版时间: 2019-09-12 12:04:28 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1204.002.html>

of Mcl-1/Bcl-xl and inhibited the activation of Caspase-3. In the mouse model of peritonitis, neutrophils co-cultured for 24 h were reinfused from the tail vein into mice, and they could be recruited to the abdominal inflammation site. Our results indicated that AGM-S3 cells were durable in maintaining the survival and function of neutrophils *in vitro*, furthermore, those neutrophils bear normal immunological activity after being refused to mice. This study will provide new strategies and experimental basis for future studies on infusion of granulocytes in patients with granulocyte deficiency or refractory infection, as well as functional modification of neutrophils.

Keywords neutrophils; AGM-S3 cells; apoptosis; cytokines

中性粒细胞是髓系终末分化细胞,在骨髓中产生,然后在各种炎症刺激下被释放到血液循环中,它们在人体抵御病原微生物入侵方面起着重要的作用^[1-2]。中性粒细胞缺乏症(中性粒细胞绝对数小于 $0.5 \times 10^9/L$),简称粒缺,通常发生在癌症患者放疗和化疗后。粒缺患者免疫低下,易发生致命的细菌或真菌感染(如粒缺相关性肺炎)。一般来说,用抗生素治疗临床感染是有效的,然而近年来,由于抗生素的滥用,细菌产生耐药性,导致抗生素对一些感染患者没有治疗效果。因此,我们能否找到一种治疗方法来弥补传统抗生素治疗的不足?中性粒细胞输注增加外周循环的中性粒细胞无疑是一种可行的临床辅助抗感染治疗手段。由于中性粒细胞在体内循环的半衰期较短,通常只有8~20 h^[3],而在细胞输注过程中的中性粒细胞采集和体外保存阶段没有很好的维持其活性的手段,这严重影响了细胞输注方案的实施和有效性。因此,如何在体外维持中性粒细胞的存活和免疫活性是该疗法的关键问题。细胞因子或/和化学小分子处理中性粒细胞,增加存活基因的表达或/和抑制死亡基因的表达,这在理论上是可行的解决方案,而基质细胞和中性粒细胞共培养来模拟体内造血微环境维持血细胞存活无疑是另一种选择。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓造血微环境中的重要组成细胞,有文献报道,骨髓间充质干细胞与中性粒细胞共培养能够维持中性粒细胞在体外存活60 h。主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区被认为是永久性造血干细胞出现的最早区域,而AGM-S3基质细胞是AGM区造血微环境的主要组成细胞,它可以支持造血细胞的增殖和分化^[4-5],但其维持终末分化血细胞存活和功能的作用尚不清楚。在本研究中,我们对比了AGM-S3基质细胞与中性粒细胞共培养和中性粒细胞单独培养方法,以探讨共培养体系中的AGM-S3细胞在维持中性粒细胞存活和功能的作用

和机制。

1 材料和方法

1.1 小鼠和细胞株

8~11周龄的C57BL6-Ly5.2/CD45.2(C57)和C57BL6-Ly5.1/CD45.1(B6)雄性小鼠在特定的无病原体条件下进行饲养,所有实验涉及的小鼠均得到中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会的批准。AGM-S3细胞株由马峰教授和周家喜教授赠与。

1.2 中性粒细胞分离和培养

小鼠骨髓中性粒细胞经Percoll(GE公司)密度梯度离心后,吸取中性粒细胞层,用HBSS-EDTA-BSA溶液洗涤1次,2 mL重悬,再经Histopaque-1119溶液密度梯度离心去除红细胞,收集位于液面分界处的中性粒细胞,洗涤2次,然后用含10% FBS和1%双抗的RPMI-1640培养基重悬中性粒细胞。

1.3 AGM-S3细胞培养

将1 mL(2×10^4)或3 mL(1.5×10^5)的用含5% FBS(Gibico公司)和1%双抗(Thermo Fisher)的MEM α 培养基重悬的AGM-S3细胞种入经0.2%明胶处理的24孔板或6孔板中,放入37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养^[6],当贴壁细胞为80%~90%的覆盖率时,用含10 μ g/mL丝裂霉素(mitomycin, MMC)的上述培养基处理2.5 h,使AGM-S3细胞停止增殖,然后用磷酸盐缓冲液(PBS, Sigma-Aldrich公司)洗涤3次,最后加入适量上述培养基放于细胞培养箱中备用。

1.4 中性粒细胞与AGM-S3细胞共培养

共培养实验分为2组:中性粒细胞培养组(接种中性粒细胞)和共培养组(接种中性粒细胞与AGM-S3细胞)。将两组设置在同一块细胞培养板中,一半的孔接种AGM-S3细胞,另一半只加培养基,然后以 $5 \times 10^5/mL$ 的浓度加入中性粒细胞悬液,放入37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养。此外,采用孔径0.4 μ m

的Transwell隔离小室(#3413, Corning公司)阻断中性粒细胞和AGM-S3细胞的胞间接触, 进行分隔式共培养实验。

1.5 中性粒细胞纯度和凋亡检测

中性粒细胞在体外培养0 h、24 h、48 h、72 h后的各个时间点, 通过锥虫蓝染色后显微镜计数检测中性粒细胞的数量和活度。用CD11b-APC和Gr1-APCcy7抗体(Becton Dickinson公司)标记中性粒细胞, 同时用AnnexinV-FITC/PI(Thermo Fisher Scientific公司)标记凋亡细胞, 然后使用流式细胞仪检测其纯度和凋亡比例^[7]。此外, 通过瑞氏染色观察各个时间点的中性粒细胞形态。

1.6 免疫印迹分析

各组分别取 1×10^6 中性粒细胞, 离心弃上清, 用100 μ L 包含蛋白酶抑制剂(Invitrogen公司)和DFP的细胞裂解液将细胞充分裂解, 然后迅速加入100 μ L 提前预热到95 °C的蛋白上样缓冲液, 充分混匀后, 分装到EP管内放于-80 °C冰箱冻存或者直接做免疫印迹分析实验。

在上样之前, 细胞溶解产物须超声处理5~10 s, 经12% SDS-PAGE凝胶电泳和转膜后, 依次孵育一抗和二抗, 最后, 加曝光液并用ImageQuantLas4000(GE公司)检测免疫复合物。采用ImageJ软件来测定灰度^[8]。

1.7 活性氧检测

通过鲁米诺化学发光法测定刺激剂激活的中性粒细胞所产生的总ROS。即用含1% BSA的PBS缓冲液重悬中性粒细胞, 并将浓度调至 $5 \times 10^3/\mu$ L, 放于细胞培养箱中备用。配制阳性反应混合液, 包含: 10 mol/L的鲁米诺、1 000 U/mL的辣根过氧化物酶(Type XII, Sigma Aldrich公司)的fMLP(Genscript公司)和生理盐水。与其相对应的阴性反应液没有fMLP刺激剂, 配置过程在冰上操作。实验步骤: 取100 μ L的细胞悬液添加到96孔板(Nunc-F96 Maxisorp)小孔内, 37 °C孵育30 min后, 用酶标仪(Synergy H4, BioTek公司)上配置的自动注射器将阳性和阴性反应液分别加入含有细胞的小孔中, 定时记录其激发光情况^[9]。

1.8 中性粒细胞趋化实验

通过TAXIScan-FL趋化检测仪来检测中性粒细胞的趋化功能。将各组中性粒细胞用含10% FBS的RPMI-1640培养基重悬并调至浓度为 1×10^4 细胞/ μ L, 将260 μ m宽 \times 4 μ m厚的蚀刻硅片与相关配件组装好之后加入4 mL上述培养基, 放入提前开机预热的

TAXIScan小室中^[10]。取1 μ L中性粒细胞悬液加入硅片下孔, 用1 mL注射器从上孔轻吸培养基, 使中性粒细胞排成一条横线, 在硅片上方小孔加入1 μ L浓度为1 μ M的fMLP刺激剂, 然后每隔30 s连续捕捉硅片各通道里中性粒细胞的迁移情况, 拍摄30 min。采用Gradient-Tech软件对中性粒细胞迁移轨迹、速度和方向进行分析^[9]。

1.9 中性粒细胞吞噬实验

各组分别取 1×10^5 中性粒细胞, 标记CD11b-APC抗体。同时用含20%小鼠血清的生理盐水于37 °C调理FITC染料偶联的酵母聚糖颗粒30 min, 然后将酵母聚糖颗粒与中性粒细胞以5:1的比例混合, 并吸到一个专用的玻璃底细胞培养皿中(NEST Scientific公司, F15 mol/L), 放于细胞培养箱中孵育30 min后, 利用DV(DeltaVision Ultra-resolution living cell imaging system, GE公司)超高分辨率显微镜拍摄吞噬图片, 统计吞噬指数(中性粒细胞吞噬酵母颗粒的总数/发生吞噬的中性粒细胞数)和吞噬细胞百分比(发生吞噬的中性粒细胞数/总细胞数), 每组统计中性粒细胞100个以上^[10]。

1.10 细胞因子检测

利用LEGENDplex™小鼠炎症因子检测盒(Bio-Legend公司)检测共培养上清液中分泌的细胞因子, 可以同时检测13个小鼠细胞因子, 包括IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IL-23、IL-27、CCL2(MCP-1)、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF。

1.11 小鼠腹膜炎模型和中性粒细胞输注实验

无菌性腹膜炎模型: 给C57(CD45.2)-WT受体小鼠腹腔注射1 mL 3%的巯基乙酸盐溶液(thioglycollate medium, TG)诱导无菌性腹膜炎。中性粒细胞输注实验步骤: 分离带绿色荧光的C57(CD45.2)小鼠骨髓中性粒细胞, 与AGM-S3细胞共培养24 h, 收集存活的绿色荧光中性粒细胞, 我们称之为“共培养24 h的中性粒细胞”, 将其与新鲜分离的不带荧光的B6(CD45.1)小鼠骨髓中性粒细胞1:1混合, 调整总细胞浓度为 $8 \times 10^6/300 \mu$ L生理盐水, 然后将制备好的细胞混合液通过尾静脉注射到产生腹膜炎的C57(CD45.2)-WT受体小鼠体内。在给腹膜炎小鼠尾静脉注射细胞混合液5 h后, 用冰PE(含0.02% EDTA的PBS)灌洗小鼠腹腔, 离心收集细胞, 用Ly6G-APC抗体标记其中所有的中性粒细胞, CD45.1-PE抗体标记B6小鼠分离的新鲜中性粒细胞。最后用流式

细胞仪检测募集到腹腔的各群中性粒细胞的数量和比例。

2 结果

2.1 AGM-S3细胞共培养可以延缓中性粒细胞凋亡

AGM-S3细胞贴壁生长时形态呈梭形, 瑞氏染色显示其胞质丰富, 呈浅蓝色, 胞核为深蓝色, 细胞体积显著大于中性粒细胞(图1A)。通过流式细胞术和瑞氏染色检测小鼠骨髓分离的中性粒细胞纯度为95%左右(图1B), 新鲜分离的中性粒细胞活率为95%以上(图1C)。

中性粒细胞凋亡检测结果表明在各个时间点, 中性粒细胞培养组的凋亡率(50%、70%、85%)均高于共培养组(20%、30%、50%)(图1C), 两者之间具有显著性差异($P < 0.001$)。每组取 1×10^5 个中性粒细胞标记AnnexinV-FITC和PI, 用DV成像系统拍摄两组中性粒细胞的存活情况(图1D)。从图中可以看出, 在培养24 h或48 h后, 共培养组存活细胞占比(96.1%、76.9%)均明显高于中性粒细胞培养组(37.9%、23.4%)(显示绿色荧光的细胞为早期凋亡细胞, 同时显示绿色和红色荧光的细胞为晚期凋亡细胞)。

2.2 AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞的趋化功能

通常走向凋亡的中性粒细胞趋化性受损, 采用TAXIScan-FL趋化检测仪记录共培养24 h或48 h的中性粒细胞的趋化过程(图2A), 对应的细胞趋化轨迹如图所示(图2B)。可以发现与中性粒细胞培养组相比, 共培养组的中性粒细胞在趋化过程中方向性较强, 迁移速度也较快, 即使在体外培养48 h后, 共培养组的中性粒细胞仍具有正常的趋化能力, 而中性粒细胞培养组的中性粒细胞丧失了趋化能力(图2D)。而且共培养组的中性粒细胞经fMLP刺激后, 表现出正常的多伪足, 而中性粒细胞培养组的中性粒细胞没有伪足(图2C)。

2.3 AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞内吞作用和ROS生成能力

中性粒细胞是第一批被募集到病原体入侵部位的细胞, 通过多种方式杀灭病原体。例如, 中性粒细胞会吞噬病原体, 然后通过NADPH氧化酶合成ROS或抗菌蛋白(组织蛋白酶、防御蛋白、乳铁蛋白和溶菌酶)杀灭病原体^[11]。

本研究发现, 共培养组的中性粒细胞在培养24 h

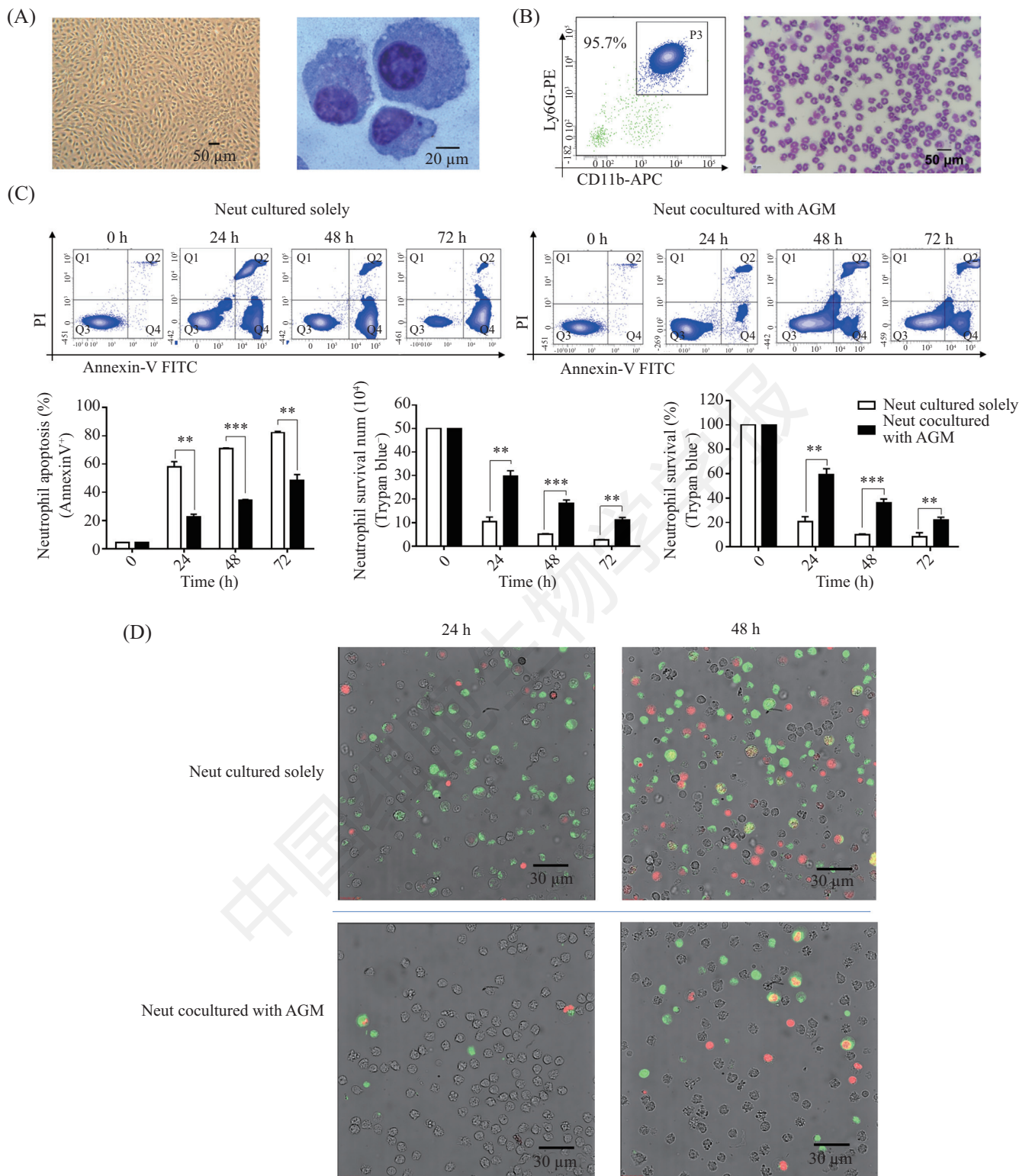
或48 h后, 仍具有几乎正常的吞噬能力, 其吞噬指数(平均每个中性粒细胞吞没4个酵母颗粒)明显多于中性粒细胞培养组(平均每个中性粒细胞吞没2.6个酵母颗粒)(图3A和图3B), 而单独培养48 h后的中性粒细胞几乎丧失了吞噬能力(图3B)。此外, 我们发现, AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞产生ROS的能力, 在fMLP刺激下, 共培养组中培养24 h或48 h的中性粒细胞, 活性氧产生明显升高, 接近新鲜分离的中性粒细胞的水平, 然而在中性粒细胞培养组中, 几乎没有ROS生成(图3C和图3D)。

2.4 AGM-S3细胞共培养延迟中性粒细胞凋亡的机制

中性粒细胞自发死亡是其主要的死亡方式, 具有凋亡的典型特征, 如细胞皱缩、细胞核浓缩、磷脂酰丝氨酸(PS)外翻等^[12-13]。在培养24 h或48 h后, 光学显微镜下观察到中性粒细胞培养组有大量中性粒细胞变暗, 有许多呈胞质空泡化或肿大的形态(有研究称之为“膨大细胞”)^[14](图4A)。此外, 细胞瑞氏染色显示培养24 h后, 中性粒细胞培养组的中性粒细胞核浓缩较多, 而共培养组的中性粒细胞的核型为正常的环状分叶核(图4B)。

进一步的免疫印迹实验(Western blot)发现, 共培养组的中性粒细胞中, 活化的Caspase-3减少, 而促进细胞存活的Mcl-1和Bcl-x1的表达以及Akt的磷酸化水平显著升高($P < 0.01$, 图4C和图4D)。随后, 我们通过分隔式共培养实验来分析AGM-S3细胞对中性粒细胞的作用方式, 结果显示, 中性粒细胞与AGM-S3细胞间是否接触, 对于延迟中性粒细胞凋亡的效果没有明显差异(图5A)。此外, 用培养了48 h的AGM-S3细胞上清液加等体积的新鲜培养基培养中性粒细胞, 发现其对延迟中性粒细胞凋亡有一定作用(图5B)。因此, 我们推断, 中性粒细胞凋亡延迟与AGM-S3细胞分泌的细胞因子有关。

于是我们检测了共培养组和中性粒细胞培养组在培养12 h、24 h、48 h后的上清液中的细胞因子, 结果发现, 共培养组上清液中MCP-1、IL-6、IL-1 α 、TNF- α 的表达量均明显高于中性粒细胞培养组(图5C)。对上述细胞因子的基因转录水平进行分析, 发现在共培养条件下, AGM-S3细胞中MCP-1和IL-6的转录水平较高, 在单独培养的AGM-S3细胞中也有这两个基因的转录。而两组的中性粒细胞中MCP-1和IL-6转录水平均非常低, 但IL-1 α 和TNF- α 的转录

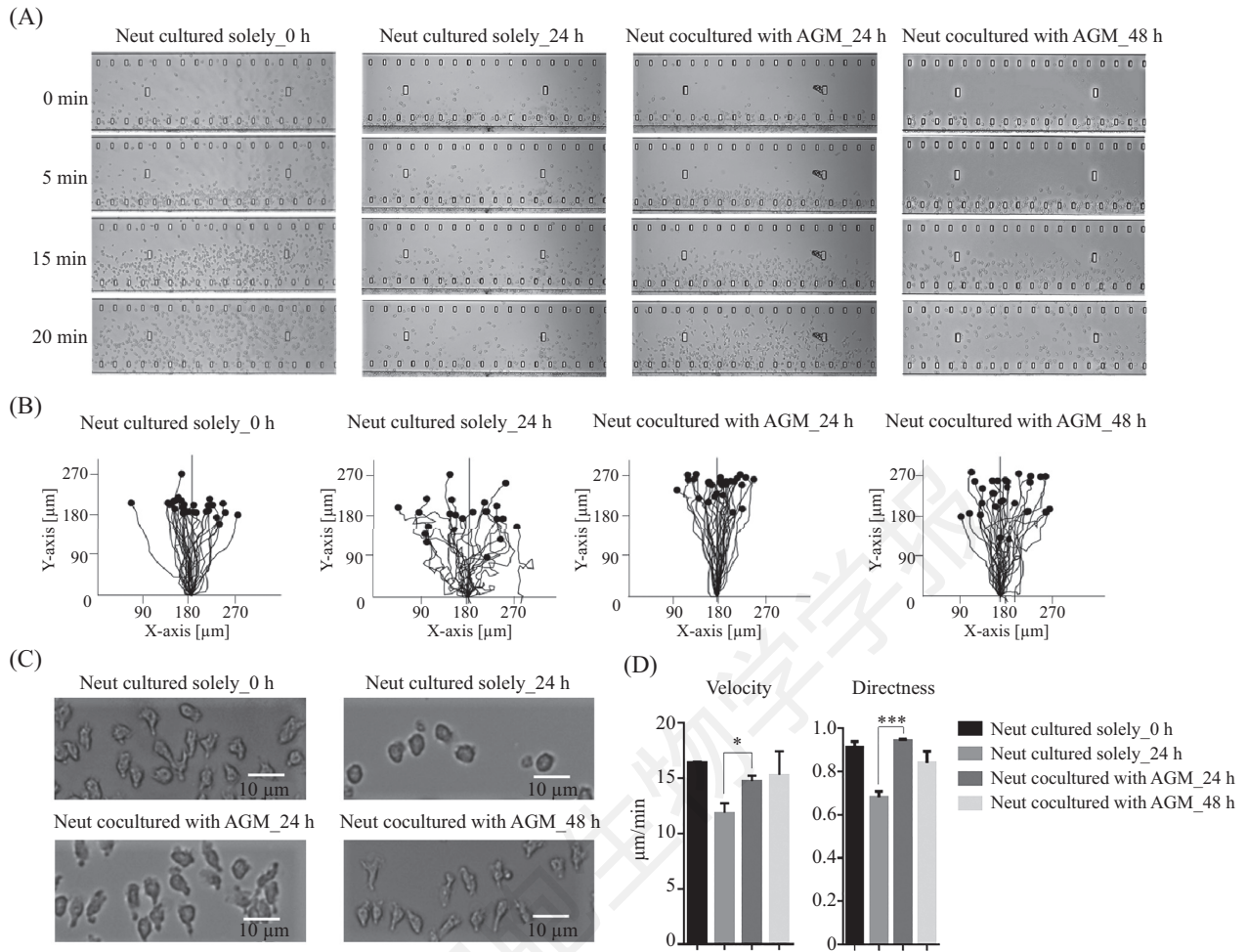


A: AGM-S3细胞在光学显微镜下的形态以及AGM-S3细胞瑞氏染色形态; B: 中性粒细胞纯度及其瑞氏染色; C: 中性粒细胞凋亡率以及存活中性粒细胞的绝对数, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; D: 荧光显微镜拍摄中性粒细胞凋亡情况。

A: light microscopy of AGM-S3 cells, and the morphology of AGM-S3 cells with Wright staining; B: the purity and morphology of neutrophils; C: the ratio of apoptotic neutrophils, and the absolute number of surviving neutrophils, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; D: neutrophil apoptosis were taken by fluorescence microscope.

图1 AGM-S3细胞共培养延迟中性粒细胞凋亡

Fig.1 Coculture with AGM-S3 cells delayed neutrophil apoptosis



A: 中性粒细胞趋化过程; B: 中性粒细胞趋化运动轨迹; C: 中性粒细胞伪足形成; D: 中性粒细胞趋化运动的速度和方向性分析, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A: the chemotaxis process of neutrophils; B: tracks of neutrophils migration; C: the formation of pseudopodia; D: the velocity and directionality analysis of neutrophil chemotaxis, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图2 AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞的趋化能力

Fig.2 Coculture with AGM-S3 cells could maintain the chemotaxis of neutrophils

水平较高(图5D)。

综上所述, AGM-S3细胞共培养通过抑制中性粒细胞凋亡基因表达, 促进其存活基因表达, 起到延缓中性粒细胞凋亡的作用。在此过程中AGM-S3细胞分泌了大量的MCP-1和IL-6, 可能对于延缓中性粒细胞凋亡和维持其免疫功能发挥了主要作用。

2.5 AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞在体内的部分募集能力

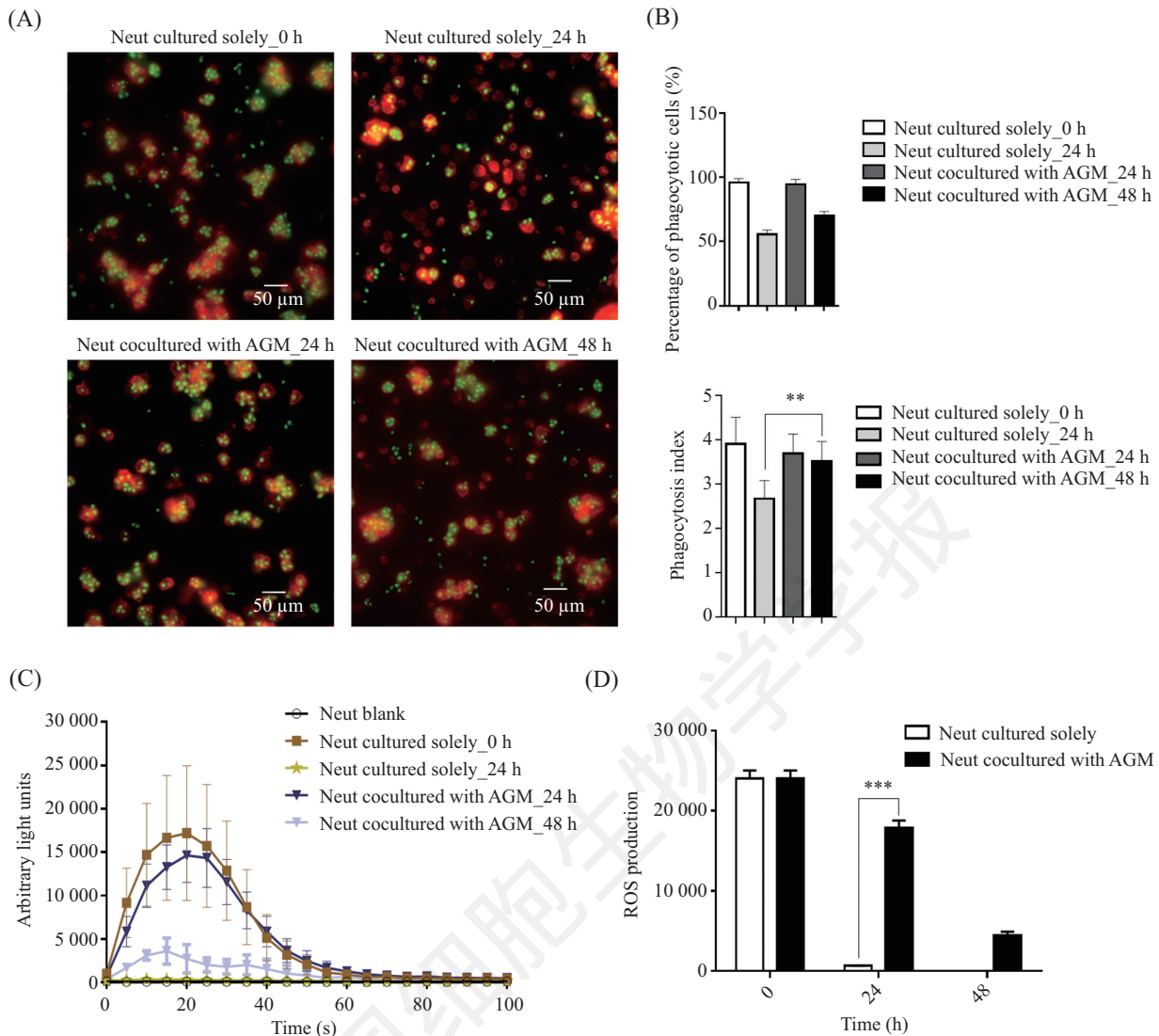
共培养24 h的中性粒细胞在体内是否仍有正常功能? 我们在小鼠腹膜炎模型下进行了中性粒细胞输注实验(图6A)。给小鼠回输这些“共培养24 h的中性粒细胞”5 h后, 收集腹腔内中性粒细胞(图6B), 经流式分析, 结果显示, “共培养24 h的中性粒细胞”具有较

好的生物学功能, 能在体内趋化到腹腔炎症部位, 与对照细胞(输注的新鲜中性粒细胞)相比, 趋化到腹腔炎症部位的细胞数较少(图6C和图6D)。

3 讨论

中性粒细胞是天然免疫系统的第一道防线, 当机体遭到病原微生物入侵时, 中性粒细胞第一时间被招募到感染部位杀灭病原体^[15]。但它们的寿命是短暂的(外周循环中, 其半衰期仅8~20 h), 即使在稳态下, 也需要不断从骨髓造血干祖细胞分化产生, 以补充损耗的中性粒细胞, 成人正常每天产生 $0.5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{11}$ 个中性粒细胞。

临床上有很多患者因为不能产生足够的中性



A: 中性粒细胞吞噬酵母聚糖颗粒的荧光图片; B: 发生吞噬的中性粒细胞占总细胞数的百分比以及吞噬指数, $**P<0.01$; C: 中性粒细胞产生的 ROS; D: ROS产生的最高水平, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: the fluorescence pictures of neutrophil phagocytosis of FITC-Zymosan. B: the percentage of phagocytosis neutrophil, and phagocytosis index, $**P<0.01$; C: the production of ROS by neutrophils; D: the maximal level of ROS production, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图3 AGM-S3细胞共培养可以维持中性粒细胞吞噬作用和ROS生成能力

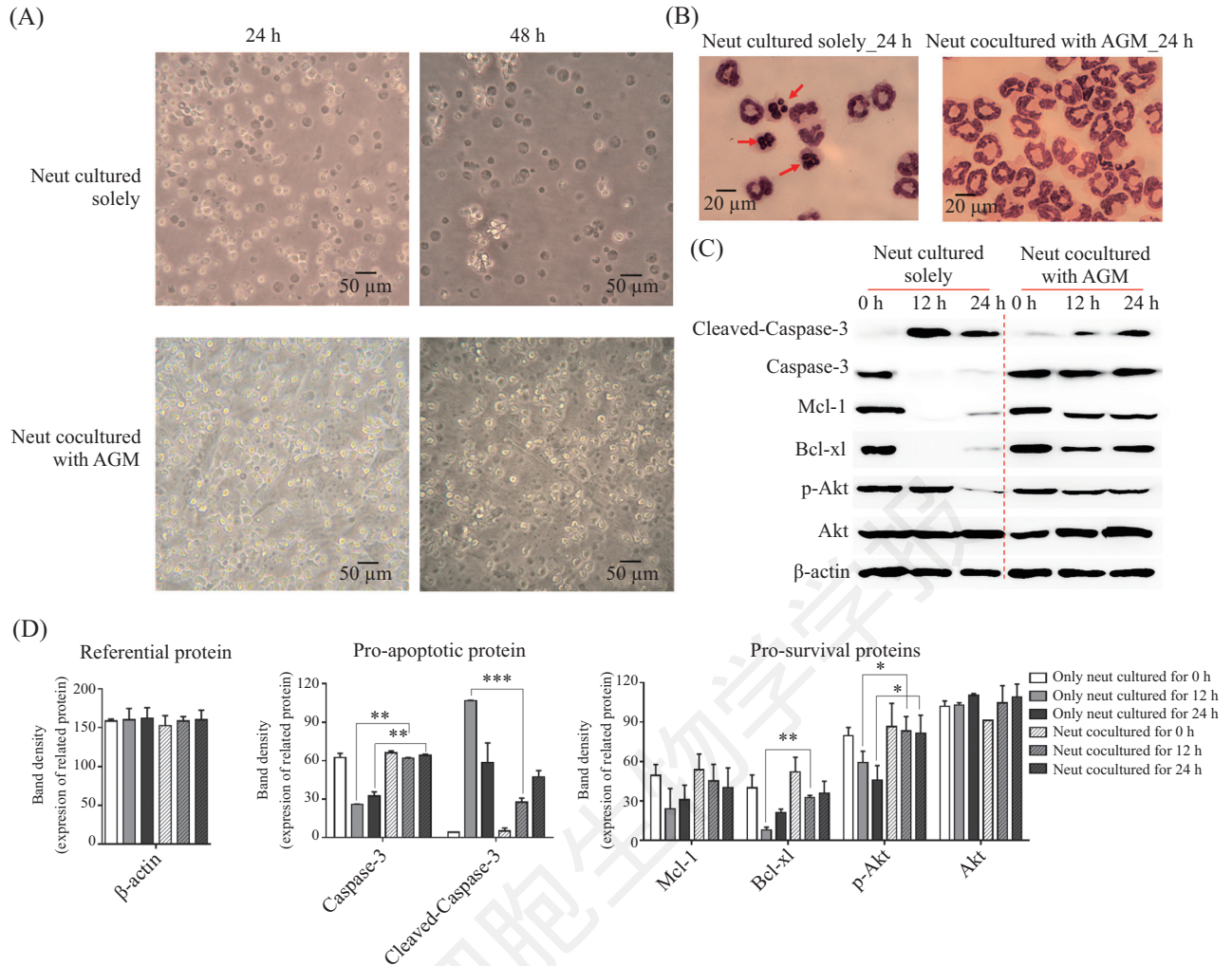
Fig.3 Coculture with AGM-S3 cells could maintain the phagocytosis and ROS production of neutrophils

粒细胞, 导致严重感染, 甚至危及生命。比如癌症患者经放疗之后, 会发生粒缺, 容易引发严重的感染。而且近年来由于抗生素的滥用, 催生了一些“超级细菌”, 目前对其没有有效的治疗手段, 患者具有很高的死亡率。粒细胞输注可能是改善粒缺状态, 优化患者预后的可行治疗方案, 但是粒细胞输注过程受限于其较短的寿命, 因此延长中性粒细胞体外存活是一个亟待解决的问题。

作为固有免疫的主力军, 中性粒细胞死亡和存活的平衡对宿主的稳态至关重要, 这一过程受到胞外各种细胞刺激因子的调节, 涉及到复杂的细胞内

死亡/存活信号网络。坏死和凋亡是中性粒细胞死亡的主要方式^[16-17], 现在也有一些关于中性粒细胞与焦亡关系的研究, 他们在小鼠腹膜炎模型中发现焦亡执行者Gasdermin D通过促进中性粒细胞死亡发挥抗炎作用^[18-19]。

我们实验室的前期研究表明, 中性粒细胞内的ROS积累会导致PI3K活性下降, 抑制PI3K-AKT信号通路, 导致细胞凋亡, 而酸性培养环境(pH6.0)可以降低中性粒细胞ROS产生, 从而延迟中性粒细胞凋亡; 香烟烟雾和尼古丁可以通过抑制IP7(5-焦磷酸-五磷酸肌醇)产生, 促进AKT磷酸化, 进而延迟中性



A: 光学显微镜下中性粒细胞的形态图; B: 培养24 h后的中性粒细胞瑞氏染色形态图, 红色箭头指示凋亡的中性粒细胞; C: Western blot检测结果; D: 蛋白条带的灰度值分析, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: the morphology of neutrophils under light microscope. B: Wright staining of neutrophils cultured for 24 h, the red arrows indicate apoptotic neutrophils; C: results of Western blot; D: gray value analysis of related protein bands, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 AGM-S3细胞共培养可以促进中性粒细胞存活基因表达, 抑制其凋亡基因表达

Fig.4 Coculture with AGM-S3 cells could promote the expression of survival genes and inhibit the expression of apoptotic genes in neutrophils

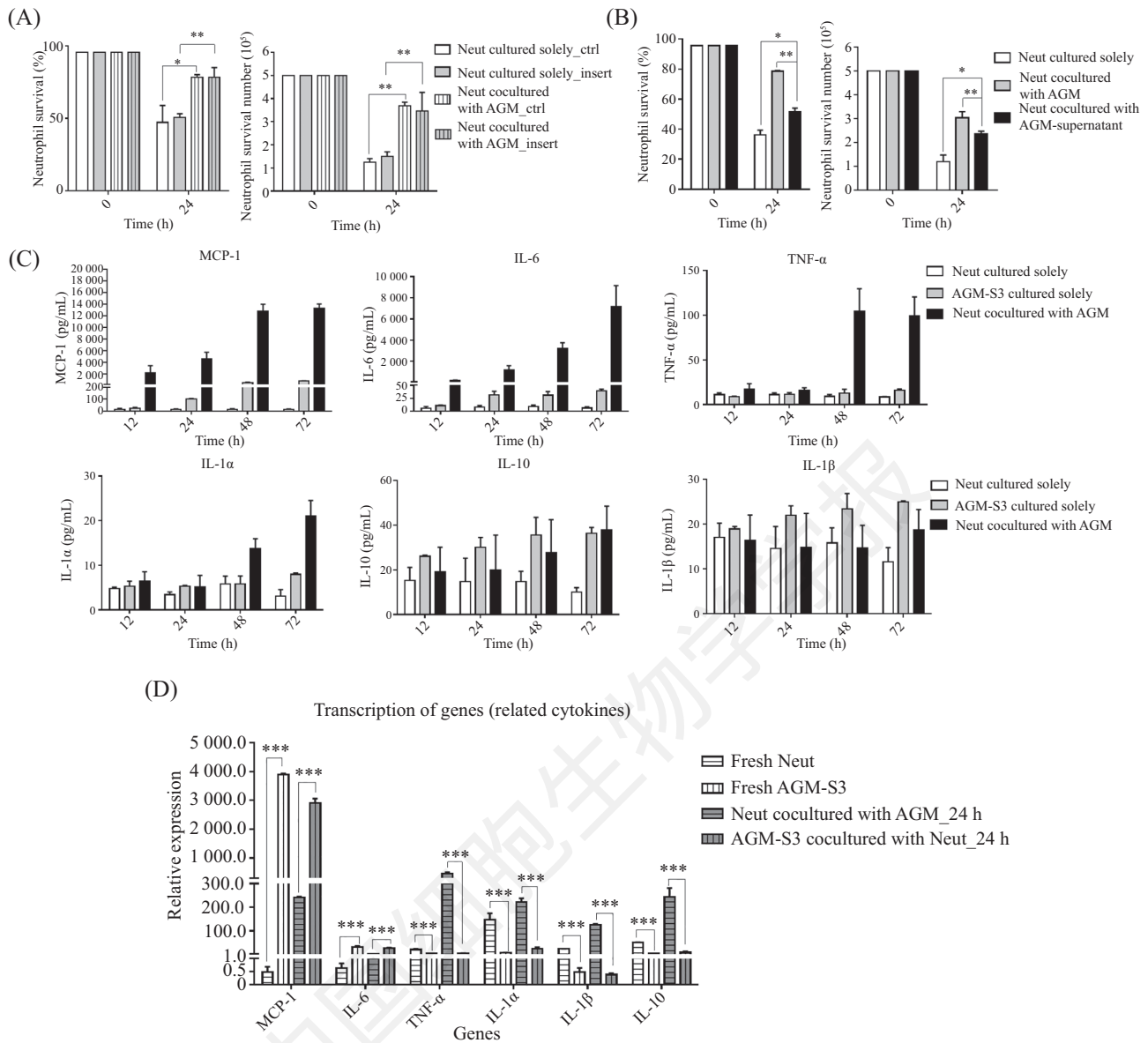
粒细胞凋亡; 我们也发现了Caspase-8/9非依赖性的细胞凋亡途径, 即中性粒细胞胞内的PR3(丝氨酸蛋白酶-3)可以直接切割Caspase-3前体, 活化Caspase-3, 导致中性粒细胞凋亡。此外, 有研究报道骨髓MSC与中性粒细胞共培养可以延迟其凋亡, 共培养40 h后, 中性粒细胞存活率为60%^[20]。

基于以上研究, 我们进行了AGM-S3细胞与中性粒细胞共培养实验, 证明了AGM-S3细胞可以显著延缓中性粒细胞凋亡, 共培养48 h后, 还有70%以上的中性粒细胞存活。AGM-S3细胞是一种来源于小鼠AGM区的基质细胞系, 支持哺乳动物的早期造血, 已有研究表明, AGM-S3细胞会产生干细胞因子

(stem cell factor, SCF)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)以及抑癌蛋白M(oncostatin M, OSM)等细胞因子参与造血调控^[21], 但尚没有AGM-S3细胞维持中性粒细胞存活和功能的作用的报道。

AGM-S3细胞共培养是怎样起到延迟中性粒细胞凋亡的作用呢? 我们通过分隔式共培养实验, 发现AGM-S3细胞可能通过分泌细胞因子对中性粒细胞产生影响, 而且已有研究表明, 内皮细胞的活化对炎症部位中性粒细胞的招募和功能调节具有重要作用, 活化的内皮细胞可分泌多种细胞因子, 而这些细胞因子可以延长中性粒细胞的寿命^[22]。

通过检测共培养上清液中的细胞因子, 发现



A: 分隔式共培养24 h后, 存活中性粒细胞的数量和百分比, $*P<0.05$, $**P<0.01$; B: 利用AGM-S3细胞上清液培养中性粒细胞24 h后, 存活细胞的数量和百分比, $*P<0.05$, $**P<0.01$; C: 细胞因子检测结果; D: 细胞因子的转录水平分析, $***P<0.001$ 。

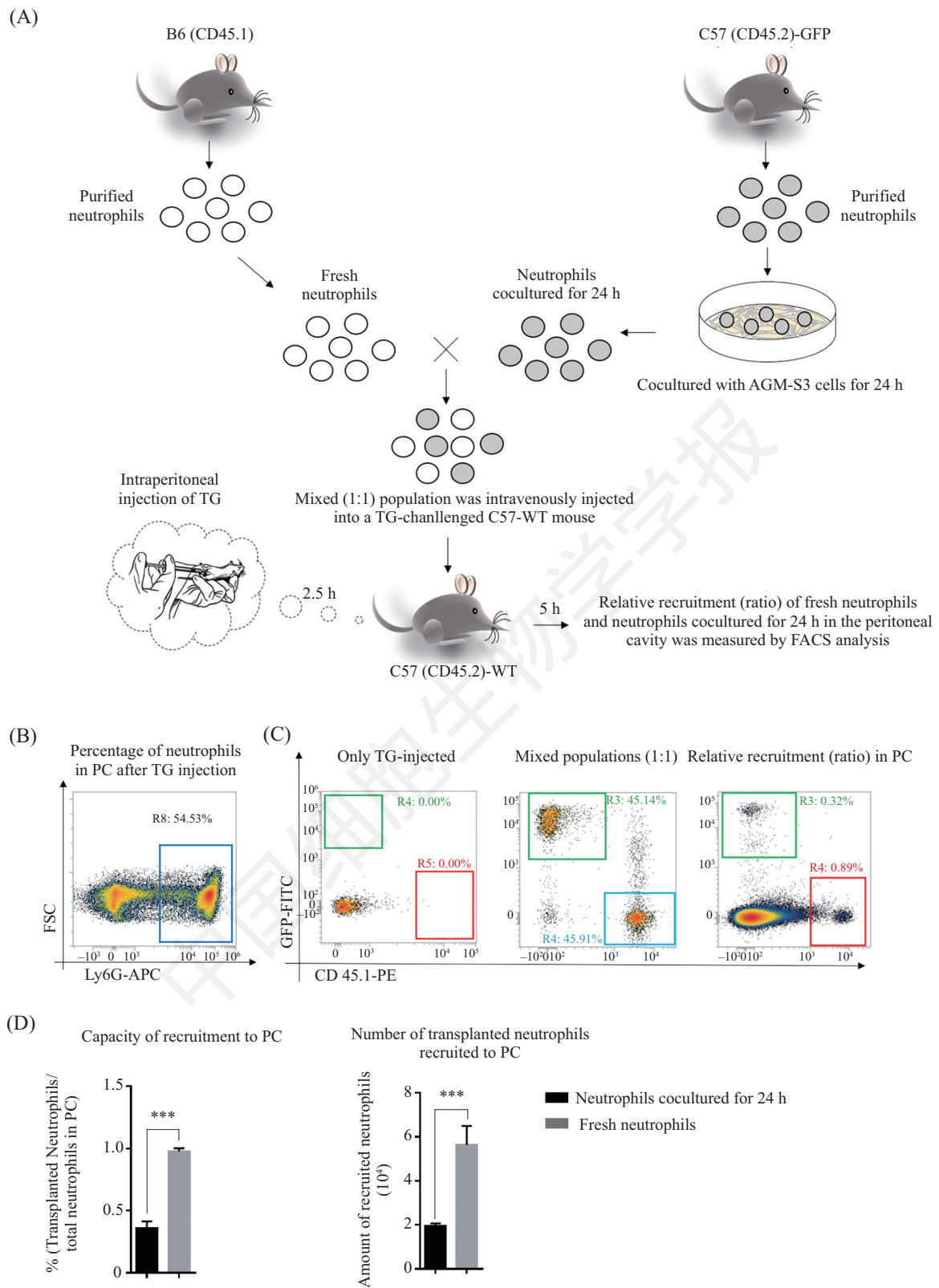
A: the number and percentage of surviving neutrophils after isolated co-culture for 24 h, $*P<0.05$, $**P<0.01$; B: the number and percentage of surviving neutrophils cultured with AGM-S3 cell supernatant for 24 h, $*P<0.05$, $**P<0.01$; C: detection of cytokines; D: transcription levels of cytokines, $***P<0.001$.

图5 AGM-S3细胞共培养通过分泌细胞因子延缓中性粒细胞凋亡

Fig.5 Coculture with AGM-S3 cells could delay neutrophil apoptosis by secreting cytokines

AGM-S3细胞主要分泌了大量的MCP-1和IL-6, 而中性粒细胞分泌了少量的TNF- α 和IL-1 α 。据相关文献报道, 许多促炎性刺激可以延长中性粒细胞的寿命, 比如: IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-15、IL-18、G-CSF、GM-CSF、TNF- α 和IFN- γ 等细胞因子可以延长中性粒细胞的存活^[23-24]。IL-6通过激活stat3转录因子延长中性粒细胞的寿命^[20]。MCP-1(CCL2)是一种化学引诱剂, 可由多种细胞产生, 包括单核细胞、巨

噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞等, 其作用的受体CCR2是一种G蛋白偶联受体, 在单核细胞、自然杀伤细胞、T细胞、B细胞和中性粒细胞中均有表达。CCL2与CCR2相互作用诱导细胞内信号转导, 引起细胞激活, 然后发挥与宿主防御相关的功能^[25]。有文献报道, 体外培养中性粒细胞时, 添加高浓度的MCP-1(100 ng/mL)可以延迟中性粒细胞凋亡, 24 h后存活50%^[25], 效果明显差于AGM-S3



A: 中性粒细胞输注实验; B: 小鼠腹腔内的中性粒细胞百分比; C: 新鲜中性粒细胞和共培养24 h的中性粒细胞的比例; D: 募集到腹腔的中性粒细胞的比例和数量, *** $P < 0.001$ 。

A: the neutrophil transfusion process; B: the percentage of neutrophils in peritoneal cavity of mice; C: the ratio of fresh neutrophils and neutrophils cocultured for 24 h; D: the proportion and number of neutrophils recruited to the peritoneal cavity, *** $P < 0.001$.

图6 共培养24 h的中性粒细胞回输到小鼠体内时仍具有部分募集能力

Fig.6 Neutrophils cocultured for 24 h with AGM-S3 cells had partial recruitment ability when they were transfused into the mouse

细胞共培养。而TNF- α 对中性粒细胞的影响是复杂的,其作用取决于浓度和时间,而且对不同亚群细胞的作用也不同^[26-27];有研究表明,在体外用高浓度TNF- α (100 ng/mL)处理中性粒细胞会诱导其加速死亡^[28]。

综上,通过AGM-S3细胞与中性粒细胞的共培养实验,我们研究了造血区基质细胞对成熟中性粒细胞寿命和功能的维持作用,发现其受到多种因素共同调节,MCP-1和IL-6可能起了主导作用。这一发现有助于探索延缓中性粒细胞凋亡的方法,推进临床上中性粒细胞输注的应用,也对中性粒细胞凋亡的调控机制有进一步认识。

参考文献 (References)

- Xu Y, Loison F, Luo HR. Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3K-gama, ROS, and actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(7): 2950-5.
- Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, *et al.* Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity* 2018; 48(2): 364-79.e8.
- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15(7): 602-11.
- Souilhol C, Lendinez JG, Rybtsov S, Murphy F, Wilson H, Hills D, *et al.* Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region. *Blood* 2016; 128(12): 1567-77.
- Hadland BK, Varnum-Finney B, Poulos MG, Moon RT, Butler JM, Rafii S, *et al.* Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2015; 125(5): 2032-45.
- Xu MJ, Tsuji K, Ueda T, Mukoyama YS, Hara T, Yang FC, *et al.* Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood* 1998; 92(6): 2032-40.
- Xu Y, Li H, Bajrami B, Kwak H, Cao S, Liu P, *et al.* Cigarette smoke (CS) and nicotine delay neutrophil spontaneous death via suppressing production of diphosphoinositol pentakisphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(19): 7726-31.
- Loison F, Zhu H, Karatepe K, Kasorn A, Liu P, Ye K, *et al.* Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation. *J Clin Invest* 2014; 124(10): 4445-58.
- Cao S, Liu P, Zhu H, Gong H, Yao J, Sun Y, *et al.* Extracellular acidification acts as a key modulator of neutrophil apoptosis and functions. *Plos one* 2015; 10(9): e0137221.
- Prasad A, Jia Y, Chakraborty A, Li Y, Jain SK, Zhong J, *et al.* Inositol hexakisphosphate kinase I regulates neutrophil function in innate immunity by inhibiting phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate signaling. *Nat Immunol* 2011; 12(8): 752-60.
- Kolaczowska E, Kubers P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3): 159-75.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83(3): 865-75.
- Teng Y, Luo HR, Kambara H. Heterogeneity of neutrophil spontaneous death. *Am J Hematol* 2017; 92(8): E156-9.
- Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 1993; 150(11): 5124-34.
- Vermeren S, Karmakar U, Rossi AG. Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death. *Eur J Clin Invest* 2018; 48 (Suppl 2): e12948.
- Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008; 83(4): 288-95.
- Aigner T. Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens? *J Pathol* 2002; 198(1): 1-4.
- Kambara H, Liu F, Zhang X, Liu P, Bajrami B, Teng Y, *et al.* GasderminD exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death. *Cell Rep* 2018; 22(11): 2924-36.
- He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res* 2015; 25(12): 1285-98.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells* 2008; 26(1): 151-62.
- Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, Kim H, *et al.* *In vitro* expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 1998; 8(1): 105-14.
- Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis *in vitro* and *in vivo*. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1999; 190(7): 923-34.
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80(8): 2012-20.
- Hirata J, Kotani J, Aoyama M, Kashiwamura S, Ueda H, Kuroda Y, *et al.* A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis. *Shock* 2008; 30(6): 628-33.
- Yang EJ, Choi E, Ko J, Kim DH, Lee JS, Kim IS. Differential effect of CCL2 on constitutive neutrophil apoptosis between normal and asthmatic subjects. *J Cell Physiol* 2012; 227(6): 2567-77.
- Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* 2003; 101(5): 1987-95.
- Chiewchengchol D, Wright HL, Thomas HB, Lam CW, Roberts KJ, Hirankarn N, *et al.* Differential changes in gene expression in human neutrophils following TNF-alpha stimulation: up-regulation of anti-apoptotic proteins and down-regulation of proteins involved in death receptor signaling. *Immun Inflamm Dis* 2016; 4(1): 35-44.
- Wicki S, Gurzeler U, Wei-Lynn WW, Jost PJ, Bachmann D, Kaufmann T. Loss of XIAP facilitates switch to TNFalpha-induced necroptosis in mouse neutrophils. *Cell Death Dis* 2016; 7(10): e2422.