

·论著·烧创伤感染与免疫·

本文亮点:

- (1) 证实红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)能够提高正常状态下中性粒细胞的吞噬能力,改善感染状态下中性粒细胞的趋化功能及活性氧、颗粒蛋白、炎症因子水平。
- (2) 创新性地提出了Nr-CWS在先天免疫层面能通过调控中性粒细胞的趋化、吞噬、杀菌等生物学功能而发挥抗感染功能的概念,为Nr-CWS的临床应用提供了更广阔的思路。



红色诺卡菌细胞壁骨架对人中性粒细胞生物学功能的调节作用

杨云稀 黄佳敏 刘璐 李林斌 郑淳方 周于莹 孙炳伟

南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科,苏州 215002

通信作者:孙炳伟,Email:sunbinwe@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)对人中性粒细胞生物学功能的调节作用及其机制。方法 采用实验研究方法。2022年5—10月招募于苏州市体检中心体检的成年健康志愿者15名(男7名、女8名,年龄24~45岁),采集外周静脉血,采用免疫磁珠分选法提取中性粒细胞。将细胞分为不进行任何处理的正常对照组、仅用终质量浓度为60 ng/mL Nr-CWS处理的单纯Nr-CWS组、仅用终质量浓度1 μ g/mL内毒素/脂多糖(LPS)刺激的单纯LPS组、用同前LPS刺激后再用Nr-CWS处理的LPS+Nr-CWS组。培养1 h,采用改良后的琼脂糖趋化模型检测中性粒细胞的趋化距离、趋化细胞百分比、趋化指数、最大趋化速度、趋化功能评分;采用流式细胞术检测发生吞噬的细胞占比与荧光强度,活性氧水平,颗粒蛋白CD35、CD66b、CD63的蛋白表达水平,以及细胞培养上清液中炎症因子白细胞介素2(IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ 干扰素浓度。以上实验各组样本数均为15。对数据行析因设计方差分析与独立样本 t 检验。结果 培养1 h,正常对照组、单纯Nr-CWS组、单纯LPS组、LPS+Nr-CWS组细胞趋化功能评分分别为15.0、(14.5 \pm 0.5)、(1.5 \pm 0.5)、(12.0 \pm 1.5)分;与正常对照组比较,单纯LPS组与LPS+Nr-CWS组细胞趋化距离、趋化细胞百分比、趋化指数、最大趋化速度与趋化功能评分均显著降低(t 值分别为18.36、18.88、54.28、18.36、46.77、10.58、14.74、6.84、10.58、4.24, $P<0.05$);与单纯LPS组比较,LPS+Nr-CWS组细胞上述5项趋化功能指标均显著升高(t 值分别为11.47、14.65、11.62、11.47、13.75, $P<0.05$)。培养1 h,与正常对照组比较,单纯Nr-CWS组发生吞噬的细胞占比与荧光强度均显著升高(t 值分别为6.86、6.73, $P<0.05$),单纯LPS组(t 值分别为7.35、22.72, $P<0.05$)与LPS+Nr-CWS组(t 值分别为21.37、13.10, $P<0.05$)发生吞噬的细胞占比与荧光强度均明显降低。培养1 h,与正常对照组比较,单纯LPS组细胞活性氧水平显著升高($t=6.64$, $P<0.05$);与单纯LPS组比较,LPS+Nr-CWS组细胞活性氧水平明显降低($t=5.46$, $P<0.05$)。培养1 h,与正常对照组比较,单纯LPS组与LPS+Nr-CWS组细胞CD35、CD66b、CD63蛋白表达均显著升高(t 值分别为16.75、17.45、10.82、5.70、19.35、15.37, $P<0.05$);与单纯LPS组比较,LPS+Nr-CWS组细胞CD35、CD66b、CD63蛋白表达均明显下降(t 值分别为4.92、5.72、3.18, $P<0.05$)。培养1 h,与正常对照组比较,单纯LPS组细胞培养上清液中IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度均显著升

DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20230223-00056

本文引用格式:杨云稀,黄佳敏,刘璐,等.红色诺卡菌细胞壁骨架对人中性粒细胞生物学功能的调节作用[J].中华烧伤与创面修复杂志,2023,39(7):625-632. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20230223-00056.

Yang YX, Huang JM, Liu L, et al. Regulatory effects of the Nocardia rubra cell wall skeleton on the biological function of human neutrophils[J]. Chin J Burns Wounds, 2023, 39(7): 625-632. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20230223-00056.



高(t 值分别为 22.10、9.50、7.21、10.22、24.88、8.43、47.48, $P < 0.05$), LPS+Nr-CWS 组细胞培养上清液中 IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度均显著上升(t 值分别为 4.68、5.12、8.02、5.58、7.13, $P < 0.05$); 与单纯 LPS 组比较, LPS+Nr-CWS 组细胞培养上清液中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度均显著降低(t 值分别为 5.39、2.83、5.79、2.90、5.87、4.88、39.64, $P < 0.05$)。 **结论** Nr-CWS 能够提高正常状态下人中性粒细胞的吞噬能力, 改善感染状态下人中性粒细胞的趋化功能及活性氧、脱颗粒蛋白、炎症因子水平, 在先天免疫层面通过调控人中性粒细胞生物学行为, 提高抗感染能力。

【关键词】 感染; 吞噬作用; 趋化作用; 中性粒细胞; 生物学功能; 红色诺卡菌细胞壁骨架

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点项目(U21A20370); 国家自然科学基金面上项目(82072217、81772135); 江苏省自然科学基金项目(BK20201178)

Regulatory effects of the *Nocardia rubra* cell wall skeleton on the biological function of human neutrophils

Yang Yunxi, Huang Jiamin, Liu Lu, Li Linbin, Zheng Chunfang, Zhou Yuying, Sun Bingwei

Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effects and mechanism of *Nocardia rubra* cell wall skeleton (Nr-CWS) on the biological function of human neutrophils. **Methods** The experimental research method was used. Fifteen healthy adult volunteers (7 males and 8 females, aged 24 to 45 years) were recruited from Suzhou Physical Examination Center for physical examination from May to October 2022, the peripheral venous blood was collected, and neutrophils were extracted by immunomagnetic bead sorting. The cells were divided into normal control group without any treatment, Nr-CWS alone group treated with Nr-CWS of final mass concentration 60 ng/mL alone, endotoxin/lipopolysaccharide (LPS) alone group stimulated with LPS of final mass concentration 1 μ g/mL alone, and LPS+Nr-CWS group stimulated with LPS first and then treated with Nr-CWS as before. After 1 h of culture, the chemotaxis distance, chemotactic cell percentage, chemotactic index, maximum chemotactic speed, and chemotactic function score of neutrophils were detected using the modified agarose chemotactic model; the proportion and fluorescence intensity of phagocytosis cells, the level of reactive oxygen species (ROS), the protein expression levels of granular protein CD35, CD66b, and CD63, and the concentrations of inflammatory cytokines of interleukin 2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interferon- γ in cell culture supernatant were detected by flow cytometry. The number of samples in each group in the above experiments was 15. Data were statistically analyzed with analysis of variance for factorial design and independent sample t test. **Results** After 1 h of culture, the chemotactic function score of cells in normal control group, Nr-CWS alone group, LPS alone group, and LPS+Nr-CWS group were 15.0, 14.5 \pm 0.5, 1.5 \pm 0.5, 12.0 \pm 1.5, respectively. Compared with those in normal control group, the chemotaxis distance, chemotactic cell percentage, chemotactic index, maximum chemotactic speed, and chemotactic function score of cells were significantly decreased in LPS alone group and LPS+Nr-CWS group (with t values of 18.36, 18.88, 54.28, 18.36, 46.77, 10.58, 14.74, 6.84, 10.58, and 4.24, respectively, $P < 0.05$); compared with those in LPS alone group, the five chemotactic function indexes as above in LPS+Nr-CWS group were significantly increased (with t values of 11.47, 14.65, 11.62, 11.47, and 13.75, respectively, $P < 0.05$). After 1 h of culture, compared with those in normal control group, the proportion and fluorescence intensity of phagocytosis cells were significantly increased in Nr-CWS alone group (with t values of 6.86 and 6.73, respectively, $P < 0.05$), and the above two indexes were significantly decreased in LPS alone group (with t values of 7.35 and 22.72, respectively, $P < 0.05$) and LPS+Nr-CWS group (with t values of 21.37 and 13.10, respectively, $P < 0.05$). After 1 h of culture, compared with that in normal control group, the level of ROS of cells in LPS alone group was significantly increased ($t=6.64$, $P < 0.05$); compared with that in LPS alone group, the level of ROS of cells in LPS+Nr-CWS group was significantly decreased ($t=5.46$, $P < 0.05$). After 1 h of culture, compared with those in normal control group, the protein expressions of CD35, CD66b, and CD63 of cells were significantly increased in LPS alone group and LPS+Nr-CWS group (with t values of 16.75, 17.45, 10.82, 5.70, 19.35, and 15.37, respectively, $P < 0.05$); compared with those in LPS alone group, the protein expressions of CD35, CD66b, and CD63 of cells were

significantly decreased in LPS+Nr-CWS group (with t values of 4.92, 5.72, and 3.18, respectively, $P < 0.05$). After 1 h of culture, compared with those in normal control group, the concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , and interferon- γ in cell culture supernatant were significantly increased in LPS alone group (with t values of 22.10, 9.50, 7.21, 10.22, 24.88, 8.43, and 47.48, respectively, $P < 0.05$), and the concentrations of IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , and interferon- γ in cell culture supernatant were significantly increased in LPS+Nr-CWS group (with t values of 4.68, 5.12, 8.02, 5.58, and 7.13, respectively, $P < 0.05$); compared with those in LPS alone group, the concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , and interferon- γ in cell culture supernatant were significantly decreased in LPS+Nr-CWS group (with t values of 5.39, 2.83, 5.79, 2.90, 5.87, 4.88, and 39.64, respectively, $P < 0.05$). **Conclusions** Nr-CWS can enhance the phagocytosis ability of neutrophils in normal condition and improve the chemotactic function, ROS level, degranulation protein level, and inflammatory factor level of human neutrophils in infectious condition. Nr-CWS can enhance the anti-infection ability of human neutrophils by regulating its biological behavior in innate immunity.

【 Key words 】 Infection; Phagocytosis; Chemotaxis; Neutrophils; Biological function; *Nocardia rubra* cell wall skeleton

Fund program: Key Program of Joint Fund of National Natural Science Foundation of China (U21A20370); General Program of National Natural Science Foundation of China (82072217, 81772135); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK20201178)

中性粒细胞是人体外周血循环中含量最丰富的白细胞(占50%~70%)^[1],尽管其被定义为寿命短暂的终末细胞,但依旧被公认是先天免疫系统的“哨兵”,参与并调节多种疾病,如急性损伤、癌症、自身免疫病和慢性炎症等^[2-4]的进程。在这些过程中,中性粒细胞主要通过趋化、吞噬、脱颗粒、中性粒细胞外诱捕网、产生活性氧和分泌细胞因子等发挥其生物学功能^[5-6],并与其他免疫细胞协作,维持机体的稳态^[7]。

红色诺卡菌细胞壁骨架(*Nocardia rubra* cell wall skeleton, Nr-CWS)是从革兰阳性菌红色诺卡菌菌体提取的细胞壁骨架成分,主要由诺卡霉素酸、阿拉伯半乳糖、胞壁酸和肽聚糖组成^[8],目前被常规用于宫颈糜烂和人乳头瘤病毒感染的治疗^[9]。大量研究表明,Nr-CWS能够通过增强体内T细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的免疫活性,促进免疫细胞对病原体的吞噬和杀灭,以此上调机体的免疫功能,提高人体抗感染能力^[10-12],但Nr-CWS对中性粒细胞的作用尚未被阐述。本研究通过使用Nr-CWS对正常状态和感染状态(LPS刺激)中性粒细胞进行干预,探讨Nr-CWS对中性粒细胞生物学功能的调节作用及其机制。

1 资料与方法

本实验研究经南京医科大学附属苏州医院医学伦理委员会批准(批号:KL906014),所有健康志愿者在采血前均签署了知情同意书。所有实验均按照批准的操作指南进行。

1.1 主要试剂和仪器来源

Nr-CWS购自辽宁格瑞仕特生物制药有限公司,生理盐水购自四川科伦药业股份有限公司,Hank平衡盐溶液(HBSS)、PBS、RPMI-1640培养基、琼脂糖粉末购自美国Gibco公司,胎牛血清购自新西兰Corning公司,中性粒细胞磁珠分选试剂盒购自加拿大Stemcell公司,LPS、趋化肽、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD66b单克隆抗体、活性氧探针购自美国Sigma公司,别藻蓝蛋白(APC)标记的兔抗人CD35单克隆抗体、人Th1/Th2液相蛋白微球定量检测试剂盒购自美国BD公司,藻红蛋白标记的小鼠抗人CD63单克隆抗体购自美国Biolegend公司,吞噬功能检测试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。IX72型倒置荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司,FACSCanto II型流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 外周血中性粒细胞提取与分组处理

2022年5—10月招募于苏州市体检中心体检的15名成年健康志愿者(男7名、女8名,年龄24~45岁)。志愿者既往体健,无重大疾病史,血常规检测中性粒细胞数量在正常值范围内。使用含乙二胺四乙酸抗凝采血管收集志愿者外周静脉血(每人10 mL),采血后2 h内,采用免疫磁珠分选法,应用中性粒细胞磁珠分选试剂盒提取外周血中性粒细胞。将10 mL血液与500 μ L中性粒细胞分选抗体、500 μ L分选磁珠混合,室温孵育5 min。加入10 mL磁珠分选缓冲液,于磁力架上孵育10 min,吸取上清液。于上清液中再次加入500 μ L分选磁

珠,混合后于磁力架中分选 3 次,再以 $400\times g$ 离心 5 min(离心条件下)后弃去上清液,收集中性粒细胞。在 12 孔板中,将中性粒细胞以 1×10^6 个/mL 重新悬浮于含有体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(每孔 1 mL)。将细胞分为正常对照组、单纯 Nr-CWS 组、单纯 LPS 组、Nr-CWS+LPS 组。正常对照组细胞不进行任何处理,继续培养 1 h;单纯 Nr-CWS 组细胞用终质量浓度 60 ng/mL 的 Nr-CWS 处理 0.5 h 后继续培养 0.5 h;单纯 LPS 组细胞采用终质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理 0.5 h 后继续培养 0.5 h;LPS+Nr-CWS 组细胞先用终质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理 0.5 h,再用终质量浓度为 60 ng/mL 的 Nr-CWS 处理 0.5 h。

1.3 中性粒细胞趋化功能检测

取 4 组细胞,采用改良后的琼脂糖趋化模型进行趋化功能检测并在基于计算机视觉的细胞趋化分析平台(cell chemotaxis analysis platform, CCAP)中进行数据分析。将 HBSS(含钙离子、镁离子)和 RPMI-1640 培养基的混合液倒入溶化煮沸的琼脂糖溶液中,混匀制成琼脂糖凝胶溶液。取 2.7 mL 琼脂糖凝胶溶液于直径 35 mm 培养皿中,室温下冷却至凝固,放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。取 3 个孔径为 3 mm 的不锈钢空心管,制成孔间距为 2.8 mm 的趋化打孔器,垂直于凝胶平面进行打孔,用负压吸引器吸去孔内凝胶与多余的水分,于中间孔内加入 10 μL 趋化物,两侧孔中分别加入 10 μL 中性粒细胞(细胞浓度为 1×10^7 个/mL)。将整个体系放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% 的二氧化碳培养箱中孵育(下同)2 h,于倒置荧光显微镜下放大 40 倍拍摄趋化图像并上传至 CCAP 中,输出包括各项趋化功能指标的分析报告。平台中的趋化区域被划分为 3 个区:趋化距离 $<800\ \mu\text{m}$ 为 I 区,趋化距离 $800\sim 2\ 000\ \mu\text{m}$ 为 II 区,趋化距离 $>2\ 000\ \mu\text{m}$ 为 III 区。趋化功能指标包括:(1)趋化距离,即中性粒细胞于琼脂糖趋化模型中趋化 2 h 到达的最远距离;(2)趋化细胞百分比,即趋化的中性粒细胞数占细胞总数(1×10^5 个)的百分比;(3)趋化指数,即 I 区与 II 区的中性粒细胞数量与细胞总数(1×10^5 个)的比值;(4)最大趋化速度,指趋化距离与趋化时间(2 h)的比值;(5)趋化功能评分,参考文献[13]进行评定。本实验样本数为 15。

1.4 中性粒细胞吞噬功能检测

取 4 组细胞,以每孔 1×10^6 个接种于 12 孔板中

(下同)。每组加入 20 μL 荧光标记的大肠埃希菌生物颗粒溶液,避光孵育 0.5 h,随后将细胞置于冰上终止吞噬,离心后,于流式细胞仪上检测发生吞噬的细胞占比与荧光强度。本实验样本数为 15。

1.5 中性粒细胞活性氧水平检测

取 4 组细胞,加入用 100 μL RPMI-1640 培养基配制的 1 nmol 流式活性氧探针 2,7-二氯荧光素二乙酸酯,避光孵育 0.5 h,离心后,采用流式细胞仪检测活性氧水平。本实验样本数为 15。

1.6 中性粒细胞颗粒蛋白表达水平检测

取 4 组细胞,加入 APC 标记的兔抗人 CD35 单克隆抗体、FITC 标记的小鼠抗人 CD66b 单克隆抗体、藻红蛋白标记的小鼠抗人 CD63 单克隆抗体(稀释比均为 1:1 000),避光条件下孵育 0.5 h,采用流式细胞仪检测颗粒蛋白 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达水平。本实验样本数为 15。

1.7 中性粒细胞中炎症因子浓度检测

取 4 组细胞,离心后各取上清液 50 μL ,加入细胞因子 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素微球混合液 50 μL ,室温下避光孵育 0.5 h。再次离心后,加入 50 μL 藻红蛋白荧光素标记的炎症因子检测抗体孵育 3 h,采用流式细胞仪检测炎症因子的表达水平。本实验样本数为 15。

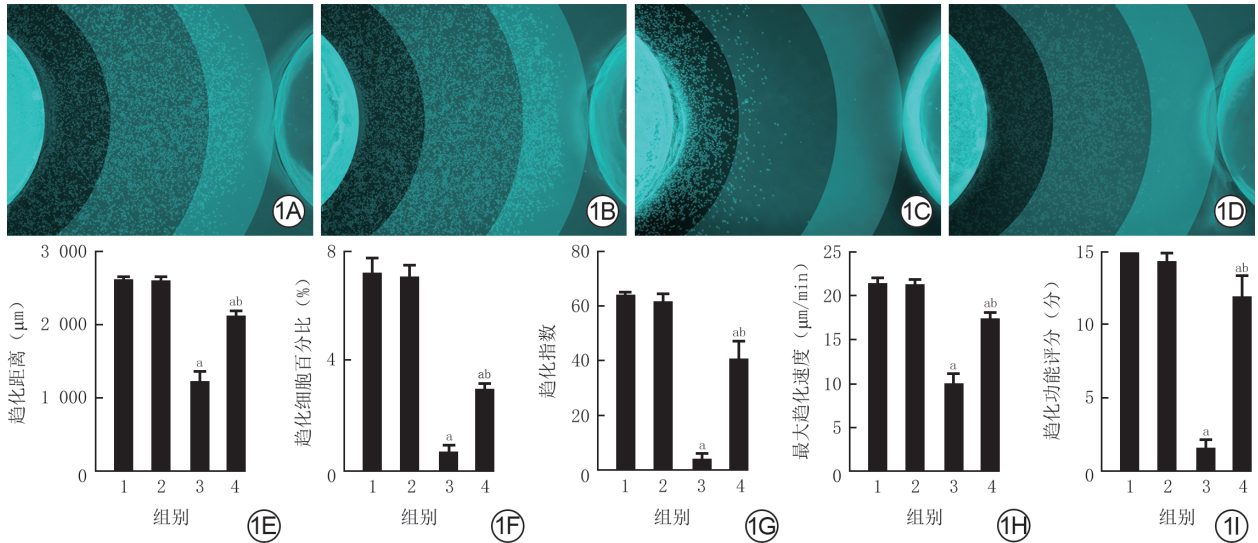
1.8 统计学处理

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据处理。所有计量资料数据均符合正态分布且方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间总体比较采用析因设计方差分析,组间两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞的趋化功能

培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 Nr-CWS 组细胞 5 项趋化功能指标,即趋化距离、趋化细胞百分比、趋化指数、最大趋化速度与趋化功能评分均无明显变化(t 值分别为 0.49、0.38、1.65、0.49、1.73, $P > 0.05$),单纯 LPS 组与 LPS+Nr-CWS 组细胞上述 5 项趋化功能指标均显著降低(t 值分别为 18.36、18.88、54.28、18.36、46.77、10.58、14.74、6.84、10.58、4.24, $P < 0.05$)。与单纯 LPS 组比较,LPS+Nr-CWS 组细胞上述 5 项趋化功能指标均显著升高(t 值分别为 11.47、14.65、11.62、11.47、13.75, $P < 0.05$)。见图 1。



注:图 1E、1F、1G、1H、1I 中横坐标 1、2、3、4 分别表示正常对照组、单纯红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)组、单纯内毒素/脂多糖(LPS)组、LPS+Nr-CWS 组;趋化距离、趋化细胞百分比、趋化指数、最大趋化速度、趋化功能评分 Nr-CWS 处理因素主效应, F 值分别为 94.95、30.76、76.19、94.95、189.00, P 值均 <0.001 ; LPS 处理因素主效应, F 值分别为 428.40、690.50、427.40、428.40、466.70, P 值均 <0.001 ; 两者交互作用, F 值分别为 104.60、38.36、99.62、104.60、189.00, P 值均 <0.001 ; 与正常对照组比较, $^aP<0.05$; 与单纯 LPS 组比较, $^bP<0.05$

图 1 4 组中性粒细胞培养 1 h 趋化功能。1A、1B、1C、1D 分别为正常对照组、单纯 Nr-CWS 组、单纯 LPS 组、LPS+Nr-CWS 组趋化功能展示,图 1A 细胞趋化距离、趋化细胞数较图 1C、1D 明显增加,图 1D 细胞趋化距离、趋化细胞数较图 1C 明显增加;1E、1F、1G、1H、1I 分别为趋化距离、趋化细胞百分比、趋化指数、最大趋化速度、趋化功能评分比较(样本数为 15, $\bar{x} \pm s$)

2.2 中性粒细胞的吞噬功能

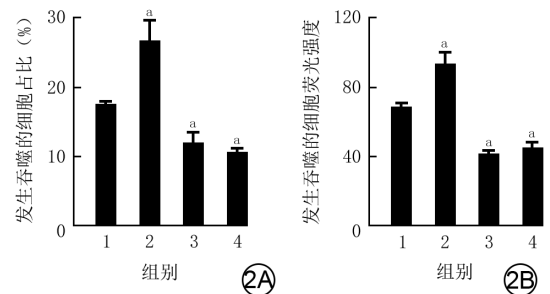
培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 Nr-CWS 组发生吞噬的细胞占比和荧光强度均显著升高(t 值分别为 6.86、6.73, P 值均为 0.001),单纯 LPS 组与 LPS+Nr-CWS 组发生吞噬的细胞占比(t 值分别为 7.35、22.72, P 值均 <0.001)和荧光强度(t 值分别为 21.37、13.10, P 值均 <0.001)均显著降低。与单纯 LPS 组比较, LPS+Nr-CWS 组发生吞噬的细胞占比和荧光强度均无明显变化(t 值分别为 1.61、2.05, P 值分别为 0.158、0.087)。见图 2。

2.3 中性粒细胞活性氧水平

培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 LPS 组细胞活性氧水平显著升高($t=6.64, P=0.003$),单纯 Nr-CWS 组与 LPS+Nr-CWS 组细胞活性氧水平均无明显变化(t 值分别为 0.56、1.30, P 值分别为 0.603、0.265)。与单纯 LPS 组比较, LPS+Nr-CWS 组细胞活性氧水平明显降低($t=5.46, P=0.006$)。见图 3。

2.4 中性粒细胞颗粒蛋白表达水平

培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 Nr-CWS 组细胞 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达均无明显变化(t 值分别为 0.34、1.24、0.85, $P>0.05$),单纯 LPS 组与 LPS+Nr-CWS 组细胞 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达均显著升高(t 值分别为 16.75、17.45、10.82,



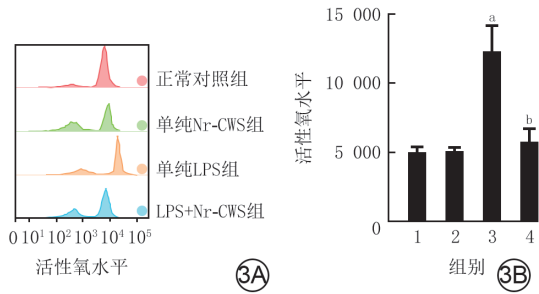
注:图 2A、2B 中横坐标 1、2、3、4 分别表示正常对照组、单纯红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)组、单纯内毒素/脂多糖(LPS)组、LPS+Nr-CWS 组;发生吞噬的细胞占比和荧光强度 Nr-CWS 处理因素主效应, F 值分别为 26.59、49.05, P 值均 <0.001 ; LPS 处理因素主效应, F 值分别为 192.30、350.20, P 值均 <0.001 ; 两者交互作用, F 值分别为 45.66、29.52, P 值均 <0.001 ; 与正常对照组比较, $^aP<0.05$

图 2 4 组中性粒细胞培养 1 h 吞噬功能比较(样本数为 15, $\bar{x} \pm s$)。2A. 发生吞噬的细胞占比;2B. 发生吞噬的细胞荧光强度

5.70、19.35、15.37, $P<0.05$)。与单纯 LPS 组比较, LPS+Nr-CWS 组细胞 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达均明显下降(t 值分别为 4.92、5.72、3.18, $P<0.05$)。见图 4。

2.5 中性粒细胞中炎症因子浓度

培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 Nr-CWS 组细胞培养上清液中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度均无明显变化(t 值分别为



注: Nr-CWS 为红色诺卡菌细胞壁骨架, LPS 为内毒素/脂多糖; 图 3B 中横坐标 1、2、3、4 分别表示正常对照组、单纯 Nr-CWS 组、单纯 LPS 组、LPS+Nr-CWS 组; 活性氧水平 Nr-CWS 处理因素主效应, $F=23.08, P=0.001$; LPS 处理因素主效应, $F=64.94, P<0.001$; 两者交互作用, $F=26.31, P<0.001$; 与正常对照组比较, $^aP<0.05$; 与单纯 LPS 组比较, $^bP<0.05$

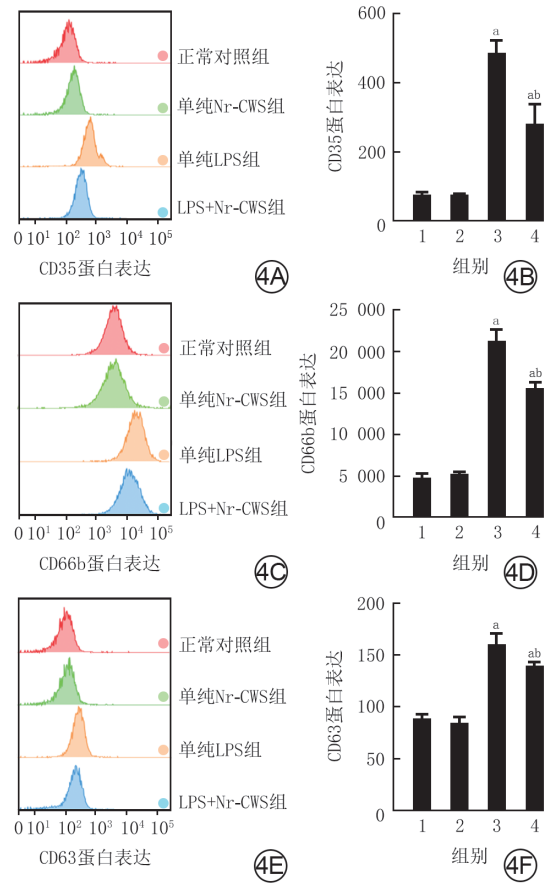
图 3 4 组中性粒细胞培养 1 h 活性氧水平比较 (样本数为 15, $\bar{x} \pm s$)。3A. 流式直方图; 3B. 条图

1.59、0.95、2.46、1.82、1.45、2.49、2.27, $P>0.05$); 单纯 LPS 组细胞培养上清液中上述 7 种炎症因子浓度均显著升高 (t 值分别为 22.10、9.50、7.21、10.22、24.88、8.43、47.48, $P<0.05$); LPS+Nr-CWS 组细胞培养上清液中 IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度均显著上升 (t 值分别为 4.68、5.12、8.02、5.58、7.13, $P<0.05$), IL-2、IL-4 浓度均无明显变化 (t 值分别为 1.23、1.60, $P>0.05$)。与单纯 LPS 组比较, LPS+Nr-CWS 组细胞培养上清液中上述 7 种炎症因子浓度均显著降低 (t 值分别为 5.39、2.83、5.79、2.90、5.87、4.88、39.64, $P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

中性粒细胞是感染和组织损伤的主要反应者^[14], 是一群复杂而功能强大的细胞^[15]。近期研究表明, 中性粒细胞能够通过调控 T 细胞和 B 细胞的活化、增殖与分化, 参与适应性免疫^[16-17]。因此中性粒细胞既是先天免疫反应的效应物, 也是适应性免疫反应的指导者^[18], 在许多疾病的发病机制中扮演重要角色, 其生物学功能的正常发挥是人体免疫系统正常运作的保障。

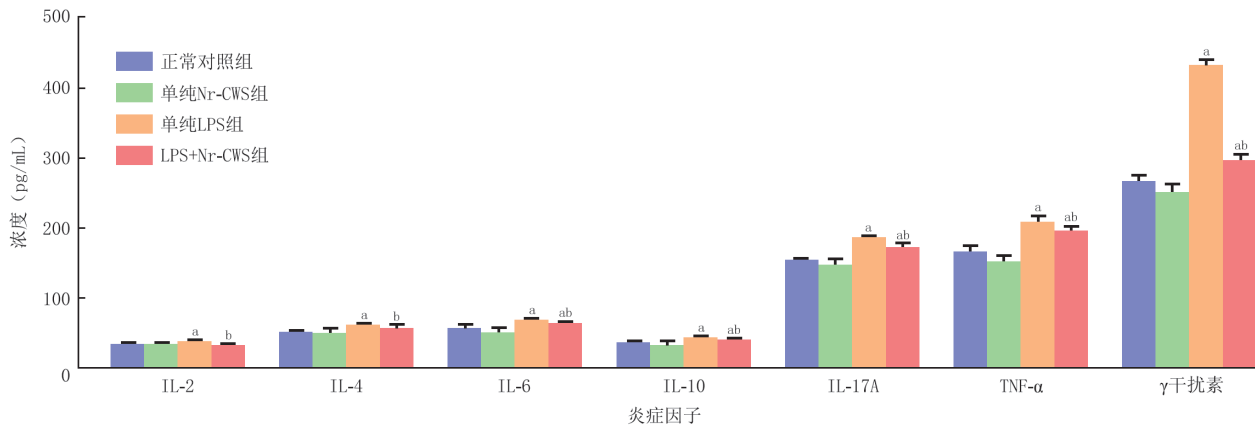
本研究通过分离纯化外周血中性粒细胞, 对不同干预下的 4 组细胞, 采用改良后的琼脂糖趋化模型检测趋化功能, 采用流式细胞术检测细胞吞噬功能、活性氧水平、颗粒蛋白 (CD35、CD66b、CD63) 表达、7 种炎症因子分泌水平。结果显示, 在正常状态下, Nr-CWS 能够提高中性粒细胞的吞噬能力; 而在感染状态下, 中性粒细胞的生物学功能发生了一



注: Nr-CWS 为红色诺卡菌细胞壁骨架, LPS 为内毒素/脂多糖; 图 4B、4D、4F 中横坐标的 1、2、3、4 分别表示正常对照组、单纯 Nr-CWS 组、单纯 LPS 组、LPS+Nr-CWS 组; CD35、CD66b、CD63 蛋白表达水平 Nr-CWS 处理因素主效应, F 值分别为 24.23、24.81、15.51, P 值分别为 0.001、0.001、0.004; LPS 处理因素主效应, F 值分别为 24.23、641.60、374.70, P 值均 <0.001 ; 两者交互作用, F 值分别为 23.47、33.69、7.70, P 值分别为 0.001、 <0.001 、0.024; 与正常对照组比较, $^aP<0.05$; 与单纯 LPS 组比较, $^bP<0.05$

图 4 4 组中性粒细胞培养 1 h 颗粒蛋白表达。4A、4C、4E. 分别为 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达流式直方图; 4B、4D、4F. 分别为 CD35、CD66b、CD63 蛋白表达条图 (样本数为 15, $\bar{x} \pm s$)

系列的变化, 趋化功能明显下降, 无法靶向感染部位发挥作用; 吞噬功能降低; 颗粒蛋白表达增加, 并产生大量的活性氧和炎症因子。尽管中性粒细胞脱颗粒增加释放的抗菌蛋白和活性氧均能对消除感染起到一定的作用^[19], 但是高浓度的抗菌蛋白, 如髓过氧化物酶、肝素结合蛋白、基质金属蛋白酶-9 等, 也能损伤内皮细胞的完整性^[20-22]; 且在较高的活性氧水平下, 呼吸氧爆发会导致线粒体的破坏, 最终对细胞本身及周围组织造成损伤^[23]。各种细胞因子水平的升高为炎症因子风暴的产生奠定了基础, 是免疫过度的表现, 极易对机体造成伤



注: Nr-CWS 为红色诺卡菌细胞壁骨架, LPS 为内毒素/脂多糖, IL 为白细胞介素, TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ; IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素浓度 Nr-CWS 处理因素主效应, F 值分别为 23.80、5.47、18.81、8.80、16.32、17.65、324.20, P 值分别为 0.001、0.048、0.003、0.018、0.004、0.003、 <0.001 ; LPS 处理因素主效应, F 值分别为 4.98、33.43、114.10、59.91、126.40、17.65、613.90, P 值分别为 0.039、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001 、 <0.001 ; 两者交互作用, F 值分别为 27.41、0.55、0.10、0.60、2.22、139.60、191.50, P 值分别为 <0.001 、0.481、0.767、0.804、0.175、0.712、 <0.001 ; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与单纯 LPS 组比较, ^b $P<0.05$

图 5 4 组中性粒细胞培养 1 h 上清液中 7 种炎症因子浓度比较(样本数为 15, $\bar{x} \pm s$)

害^[24]。对感染状态下中性粒细胞采用 Nr-CWS 处理后, 中性粒细胞趋化功能显著恢复, 虽仍未达到正常水平, 但各项趋化功能指标均显著上升; 细胞的吞噬功能未发生变化, 表明 Nr-CWS 能提高正常状态下中性粒细胞的吞噬能力, 却无法逆转感染状态下中性粒细胞的吞噬功能减弱。吞噬功能是中性粒细胞发挥免疫防御功能和维持机体平衡的重要机制之一, 其膜表面广泛表达吞噬受体用以识别病原体, 随后受体、配体发生结合, 诱导细胞骨架重排, 将病原体内化形成吞噬小体, 对微生物进行清除^[25-26], 该结果结合上述趋化功能说明 Nr-CWS 可能通过增加中性粒细胞的骨架重排, 使胞膜变化更为灵敏, 细胞变形能力增强而易于发生吞噬行为, 但吞噬受体的表达才是吞噬作用得以发挥的决定因素^[27]。而感染状态下, 中性粒细胞膜表面吞噬受体表达减少, Nr-CWS 无法恢复受体的表达, 因此不能恢复细胞的吞噬功能。

感染状态下行 Nr-CWS 处理的中性粒细胞活性氧水平恢复正常, 颗粒蛋白表达均下降, 但仍高于正常状态, 表明中性粒细胞可在尽可能不破坏内皮细胞的前提下发挥杀菌功能。炎症因子方面, 感染状态下行 Nr-CWS 处理的中性粒细胞 IL-2、IL-4 表达水平均恢复正常, 而 IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素水平在 Nr-CWS 处理后虽然有所下降, 但仍高于正常水平。IL-2、IL-6、IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素属于促炎性细胞因子, 这些因子水平的下降表明 Nr-CWS 能够通过调控中性粒细胞对炎症进行控制, 该结果与另一针对 Nr-CWS 对 T

细胞作用的研究结果^[9]一致; IL-10 属于抑炎因子, 能够调节 B 细胞、细胞毒性 T 细胞和 Th、自然杀伤细胞、肥大细胞、粒细胞、树突状细胞、KC 和内皮细胞的生长和分化, 在体内免疫反应和免疫耐受中起着重要作用^[28-29], 该因子水平在 Nr-CWS 干预下依旧偏高。而同为抑炎因子的 IL-4 在 Nr-CWS 作用下恢复至正常水平。有研究显示, IL-10 在哺乳动物中所起的抗炎作用更为强大, 也更为核心, 作用机制更为复杂^[30], 尽管两者均表现为负调节炎症反应作用, 但 Nr-CWS 对不同因子的作用仍需进一步探讨, 对中性粒细胞炎症因子分泌的调控也表现为复杂的双向调控, 具体机制尚需进一步研究。

综上所述, 本研究创新性地阐述了 Nr-CWS 对中性粒细胞生物学功能的调节作用, 证实 Nr-CWS 能够提高正常状态下中性粒细胞的吞噬能力, 并改善感染状态下中性粒细胞的趋化功能, 降低感染状态下中性粒细胞的活性氧水平、颗粒蛋白表达以及炎症因子水平, 提出了 Nr-CWS 在先天免疫层面能够通过调控中性粒细胞生物学行为而发挥抗感染功能的新概念, 为 Nr-CWS 的临床应用提供了更广阔的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨云稀: 酝酿和设计研究, 实施研究, 采集、分析、解释数据, 撰写论文; 黄佳敏、刘璐、李林斌: 实施研究, 采集数据; 郑淳方、周于莹: 统计、分析数据; 孙炳伟: 酝酿和设计研究, 对文章内容作批判性审阅, 经费支持

参考文献

- [1] Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil

- chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(5): 433-450. DOI:10.1038/s41423-020-0412-0.
- [2] Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223-1248. DOI: 10.1152/physrev.00012.2018.
- [3] Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity[J]. *Open Biol*, 2012, 2(11): 120134. DOI:10.1098/rsob.120134.
- [4] Shao Y, Guo Z, Yang Y, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to myofibroblast differentiation and scar hyperplasia through the Toll-like receptor 9/nuclear factor Kappa-B/interleukin-6 pathway[J/OL]. *Burns Trauma*, 2022, 10: tkac044[2023-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36406661/>. DOI:10.1093/burnst/tkac044.
- [5] 孙炳伟, 黄佳敏. 中性粒细胞生理与病理生理作用再认识[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(2): 109-113. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211122-00391.
- [6] Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation[J]. *Crit Care*, 2016, 20: 73. DOI: 10.1186/s13054-016-1250-4.
- [7] Oberg HH, Wesch D, Kalyan S, et al. Regulatory interactions between neutrophils, tumor cells and T cells[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1690. DOI:10.3389/fimmu.2019.01690.
- [8] 闻丹丹, 李强, 沈才齐, 等. 外用红色诺卡氏菌细胞壁骨架提高脂肪间充质干细胞活性修复糖尿病创面[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(7): 1038-1044.
- [9] Chen W, Zhang Y, Zhao C, et al. *Nocardia rubra* cell wall skeleton up-regulates T cell subsets and inhibits PD-1/PD-L1 pathway to promote local immune status of patients with high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 612547. DOI:10.3389/fimmu.2020.612547.
- [10] Tao Y, Wang G, Zhai J, et al. Functional modulation of CD8⁺ T cell by approved novel immune enhancer: *Nocardia rubra* cell-wall skeletons (Nr-CWS) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106023. DOI:10.1016/j.intimp.2019.106023.
- [11] Wang Y, Hu Y, Ma B, et al. *Nocardia rubra* cell wall skeleton accelerates cutaneous wound healing by enhancing macrophage activation and angiogenesis[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(6): 2398-2409. DOI:10.1177/0300060518764210.
- [12] Wu J, He B, Miao M, et al. Enhancing natural killer cell-mediated cancer immunotherapy by the biological macromolecule *Nocardia rubra* cell-wall skeleton[J]. *Pathol Oncol Res*, 2022, 28: 1610555. DOI: 10.3389/pore.2022.1610555.
- [13] Yang Y, Liu L, Guo Z, et al. A novel computer vision-based assessment of neutrophil chemotaxis in patients with severe infection[J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(8): e1333. DOI:10.1002/cti2.1333.
- [14] Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, et al. Neutrophil diversity in health and disease[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(7): 565-583. DOI:10.1016/j.it.2019.04.012.
- [15] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-175. DOI:10.1038/nri3399.
- [16] Kvedaraitė E. Neutrophil-T cell crosstalk in inflammatory bowel disease[J]. *Immunology*, 2021, 164(4): 657-664. DOI: 10.1111/imm.13391.
- [17] Shaul ME, Zlotnik A, Tidhar E, et al. Tumor-associated neutrophils drive B-cell recruitment and their differentiation to plasma cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(7): 811-824. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-20-0839.
- [18] Kubes P. The enigmatic neutrophil: what we do not know[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(3): 399-406. DOI: 10.1007/s00441-018-2790-5.
- [19] Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 459-489. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
- [20] Liu L, Shao Y, Zhang Y, et al. Neutrophil-derived heparin binding protein triggers vascular leakage and synergizes with myeloperoxidase at the early stage of severe burns (with video) [J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab030[2023-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34646891/>. DOI:10.1093/burnst/tkab030.
- [21] Ugonotti J, Chatterjee S, Thaysen-Andersen M. Structural and functional diversity of neutrophil glycosylation in innate immunity and related disorders[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 79: 100882. DOI:10.1016/j.mam.2020.100882.
- [22] Reine TM, Lanzalaco F, Kristiansen O, et al. Matrix metalloproteinase-9 mediated shedding of syndecan-4 in glomerular endothelial cells[J]. *Microcirculation*, 2019: e12534. DOI:10.1111/micc.12534.
- [23] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-950. DOI:10.1152/physrev.00026.2013.
- [24] Gupta KK, Khan MA, Singh SK. Constitutive inflammatory cytokine storm: a major threat to human health[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2020, 40(1): 19-23. DOI: 10.1089/jir.2019.0085.
- [25] Lee HJ, Woo Y, Hahn TW, et al. Formation and maturation of the phagosome: a key mechanism in innate immunity against intracellular bacterial infection[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1298. DOI:10.3390/microorganisms8091298.
- [26] Roberts RE, Hallett MB. Neutrophil cell shape change: mechanism and signalling during cell spreading and phagocytosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1383. DOI:10.3390/ijms20061383.
- [27] Ullah I, Ritchie ND, Evans TJ. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Innate Immun*, 2017, 23(5): 413-423. DOI:10.1177/1753425917704299.
- [28] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 683-765. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- [29] Mollazadeh H, Cicero AFG, Blesso CN, et al. Immune modulation by curcumin: the role of interleukin-10[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1): 89-101. DOI: 10.1080/10408398.2017.1358139.
- [30] Bottiglione F, Dee CT, Lea R, et al. Zebrafish IL-4-like cytokines and IL-10 suppress inflammation but only IL-10 is essential for gill homeostasis[J]. *J Immunol*, 2020, 205(4): 994-1008. DOI:10.4049/jimmunol.2000372.

(收稿日期: 2023-02-23)