

中性粒细胞碱性磷酸酶对中性粒细胞功能影响的体外研究

李海宁 李伟 杨晋 张春艳 吴惠毅

【摘要】 目的 探讨中性粒细胞碱性磷酸酶(neutrophils alkaline phosphatase, NAP)对中性粒细胞迁移、活性氧(ROS)生成以及凋亡的影响。方法 通过慢病毒感染人早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 获得 NAP 高表达细胞株,采用 RT-PCR 和 Western blot 技术分别检测感染后细胞 NAP 的基因转录及蛋白表达水平。HL-60 细胞经 1.5% DMSO 体外诱导分化为类中性粒细胞后进行相关实验;分别利用 Transwell 迁移实验和流式细胞术检测高表达 NAP 中性粒细胞的迁移及 ROS 生成能力;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 法检测高表达 NAP 中性粒细胞中凋亡相关蛋白 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达情况。结果 经慢病毒感染的 HL-60 细胞通过嘌呤霉素筛选后 80% 以上细胞可见绿色荧光,且 NAP 在基因及蛋白水平表达均明显升高。HL-60 细胞经 1.5% DMSO 体外诱导分化 5 d 后,细胞体积变小、表面出现许多突起,核质比例降低,核仁消失,核染色质由密集趋向疏松,细胞核扭曲折叠呈杆状或分叶,CD11b⁺ 细胞百分比明显升高。Transwell 迁移实验结果显示,高表达 NAP 的中性粒细胞迁移细胞数多于阴性对照组[(15.30±3.65)×10³ 对 (8.00±0.78)×10³, P<0.001]。流式细胞术检测结果表明,高表达 NAP 的中性粒细胞胞内 ROS 的平均荧光强度高于阴性对照组(355.70±20.10 对 103.22±4.71, P<0.001);与阴性对照组比较,高表达 NAP 中性粒细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Bax、active-caspase-3 以及 active-caspase-9 的表达水平明显上调。结论 NAP 具有促进类中性粒细胞迁移及 ROS 生成、加速细胞凋亡的生物学作用。

【关键词】 HL-60 细胞; 碱性磷酸酶; 细胞迁移分析; 活性氧; 细胞凋亡

Effects of neutrophils alkaline phosphatase on functions of neutrophils in vitro Li Haining, Li Wei, Yang Jin, Zhang Chunyan, Wu Huiyi. Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Lianyungang 222000, China

Corresponding author: Wu Huiyi, Email: 18961326009@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of neutrophils alkaline phosphatase (NAP) on the migration, reactive oxygen species (ROS) generation and apoptosis of neutrophil-like differentiated HL-60 cells. **Methods** NAP was overexpressed in HL-60 cells via transfecting coding sequence of NAP by lentivirus. The effectivity of NAP overexpression was confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. HL-60 cells were differentiated into neutrophil-like cells by exposure to 1.5% DMSO. The migration and ROS generation of neutrophil-like cells with NAP overexpression were detected by transwell migration test and flow cytometry, respectively. Cell apoptosis were detected by flow cytometry. The expression of apoptosis-related protein Bax, caspase-3 and caspase-9 in neutrophil-like cells were observed by Western blotting after NAP overexpression. **Results** Over 80% HL-60 cells presented green fluorescence after GFP-NAP infection by lentivirus and screening by puromycin. In addition, the levels of both gene and protein of NAP were up-regulated in these cells. After 5-day culture with 1.5% DMSO, the bulk of induced cell was smaller and the surface appeared many bumps and irregular shape. The ratio of nuclear and cytoplasmic decreased and nucleolus disappeared. The nuclear chromatin changed from dense to loose and the nuclear morphology appeared to be rod and segmented. The percentage of CD11b⁺ cell increased from 26.25% to 98.55%. The transwell migration test showed that the number of migrated cells was higher in neutrophil-like cells with NAP overexpression compared with the

negative control $[(15.30 \pm 3.65) \times 10^3 \text{ vs } (8.00 \pm 0.78) \times 10^3]$ ($P < 0.001$). Results of flow cytometry suggested that the mean fluorescence intensity (MFI) of intracellular ROS was significantly higher in neutrophil-like cells with NAP overexpression compared with the negative control ($355.70 \pm 20.10 \text{ vs } 103.22 \pm 4.71$) ($P < 0.001$). In addition, Western blotting showed that the expressions of apoptosis-related protein Bax, active-caspase-3 and active-caspase-9 were all up-regulated in neutrophil-like cells with NAP overexpression compared with the negative control. **Conclusion** NAP could promote the migration and ROS generation of neutrophil-like cells and accelerate the cell apoptosis.

【Key words】 HL-60 cells; Alkaline phosphatase; Cell migration assays; Reactive oxygen species; Apoptosis

当机体受到感染时,微生物及宿主本身产生的炎症介质可刺激中性粒细胞向炎症部位发生定向迁移,在穿过血管内皮细胞到达炎症局部后,通过吞噬、去颗粒释放溶菌蛋白、产生超氧化物以及形成中性粒细胞胞外诱捕网等作用发挥强大的杀菌功能^[1]。出现中性粒细胞数量异常或功能缺陷时,机体抵抗病原微生物的能力随之下降^[2]。中性粒细胞碱性磷酸酶(neutrophils alkaline phosphatase, NAP)是成熟中性粒细胞的标志酶之一^[3]。NAP主要表达于中性粒细胞的胞膜(占20%)和分泌囊泡(占80%)的膜内侧^[4-5]。研究表明,碱性磷酸酶同工酶家族可催化几乎所有磷酸单酯的水解反应,其在机体内的生物学作用尚不清楚^[6]。NAP属于组织非特异型碱性磷酸酶,可能与中性粒细胞功能以及机体炎症的消退密切相关^[7]。

人早幼粒白血病细胞株HL-60经二甲基亚砜(DMSO)或全反式维甲酸诱导处理可分化为生物学功能与中性粒细胞相似的分化HL-60(dHL-60)细胞,可作为中性粒细胞体外研究的细胞模型^[8-10]。HL-60细胞及dHL-60细胞均低表达NAP^[5]。在本研究中,我们采用慢病毒感染的方式实现NAP高表达,并观察高表达NAP对中性粒细胞迁移、活性氧(ROS)生成以及凋亡等功能的影响。

材料与方 法

一、材料与仪器

HL-60细胞株由上海血液学研究所馈赠;胎牛血清(FBS)、IMDM培养液购自美国Gibco公司;携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的碱性磷酸酶慢病毒与慢病毒阴性对照由上海吉凯基因化学技术有限公司构建;逆转录试剂盒购自瑞士Roche公司;RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;FITC-CD11b抗体购自美国Beckman Coulter公司;ALPL抗体购自美国R&D公司; β -actin抗体购自美国Bioworld公司;pro-caspase-9、active-caspase-9、pro-caspase-3、

active-caspase-3和Bax抗体均购自美国Abcam公司;HRP标志的兔抗小鼠二抗购自美国Santa Cruz公司;双氢罗丹明123(DHR123)和佛波酯(PMA)购自美国Sigma公司;Transwell小室(孔径5 μm)购自美国Coming Costar公司;Muse™早期凋亡检测试剂盒为美国Millipore公司产品。FACSCanto II流式细胞仪购自美国BD公司;Muse™智能触控细胞分析仪购自美国Millipore公司;荧光倒置显微镜为日本OLYMPUS公司产品;PCR仪购自美国Applied Biosystems公司;PowerPac Basic电泳仪购自美国Bio-Rad公司;FluorChem Q凝胶成像系统购自美国Protein Simple公司。

二、细胞培养与诱导分化

1. 细胞培养与诱导分化:将HL-60细胞悬浮于含20%FBS的IMDM培养液内,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。采用终浓度分别为1.5%、2.0%、2.5%和3.0%的DMSO体外诱导培养HL-60细胞,5 d后用流式细胞术检测dHL-60细胞活力及细胞表面CD11b的表达以选择HL-60细胞诱导分化的最佳DMSO浓度,瑞氏染色观察细胞诱导后形态的变化。

2. 流式细胞术检测dHL-60细胞表面标志CD11b的表达:收集诱导分化的细胞,加入PBS洗涤,500 $\times g$ 离心5 min,弃上清,配制 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞悬液;取50 μl 细胞悬液加入10 μl FITC标志的CD11b抗体,并设同型对照管,室温反应30 min;加入PBS,500 $\times g$ 离心洗涤5 min,弃上清,重悬后上流式细胞仪检测。

三、建立稳定高表达NAP的HL-60细胞株

1. 慢病毒感染:选择对数生长期HL-60细胞,以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种于6孔细胞培养板中,细胞悬液体积为900 μl 。实验组加入100 μl GFP-ALPL慢病毒(滴度为 $1 \times 10^8 \text{ TU/ml}$),对照组加入100 μl 阴性对照病毒(滴度为 $1 \times 10^8 \text{ TU/ml}$),充分混匀后继续培养8~12 h后观察细胞状态并更换新鲜培养液。感染

3~4 d 后,在荧光倒置显微镜下观察细胞内 GFP 表达情况,初步判断各处理组细胞的感染情况。

2. 细胞筛选:制备含有最佳筛选浓度嘌呤霉素(由杀灭曲线确定)的筛选培养液,病毒感染 3~4 d 后加入,每 2~3 d 替换新鲜配制的筛选培养液。每日观察活细胞比例,检测 GFP 表达水平及所占比例,筛选时间为 10 d。以 Ficoll 淋巴细胞分离液去除死细胞:以离心管中加入 3 ml Ficoll 分离液,将细胞悬液加于分离液液面上,600 ×g 离心 20 min;收集中间白膜层细胞,加入 PBS,500×g 离心 5 min,洗涤 3 次;完全培养液重悬细胞,获得稳定感染细胞株,37 °C、5% CO₂ 继续培养。荧光倒置显微镜下观察、判断 HL-60 细胞感染效率。

3. RT-PCR 检测 HL-60 细胞感染慢病毒后 NAP 基因表达:取筛选后感染效率>90%的 HL-60 细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA 并测定浓度。按照 cDNA 反转录试剂盒说明书对总 RNA 进行逆转录。根据 mRNA 浓度计算加样体积,补 DEPC 水至 11 μl (共 20 μl),加入 2 μl 特异性引物 Oligo dT (40 ×),65 °C 10 min;加入逆转录缓冲液(5×)4 μl、dNTP 混合物 2 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、逆转录酶 0.5 μl,上机合成 cDNA。以 cDNA 为模板,25 μl 体系中加入下列组分:Taq 酶 12.5 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,DEPC 水 8.5 μl 和 cDNA 2 μl。NAP 上游引物:5'-CGCAGGATTGGAACATCAGT-3',下游引物:5'-TGTCTCTTGCCTTGGTCTC-3',扩增片段长度 219 bp;β-actin 上游引物:5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATG-3',下游引物:5'-GGATGTC-CACGTCACACTTC-3',扩增片段长度 207 bp。反应条件:94 °C 预变性 10 min,然后 56 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,45 个循环后 4 °C 终止反应。PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪分析。

4. Western blot 法检测慢病毒感染后 HL-60 细胞 NAP 的表达:收集嘌呤霉素筛选过的细胞,按比例加入细胞裂解液与蛋白酶抑制剂,振荡 1 min,冰上放置 10 min,重复 3 次,将裂解混合物 4 °C 下 4 000 ×g 离心 15 min,上清即为总蛋白,测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 100 V),350 mA、2 h 转移至聚偏氟乙稀(PVDF)膜上,室温封闭 1 h,分别加入小鼠抗人 ALP 抗体(1:300)和小鼠抗人 β-actin 抗体(1:5 000),4 °C 过夜孵育,TBST 洗涤缓冲液洗膜 3 次(每次 10 min),加 HRP 标志的兔抗小鼠 IgG(1:1 000)37 °C 孵育 2 h,TBST 洗涤缓冲液洗膜 3 次(每次 10 min)。

加入显色液,FluorChem Q 凝胶成像系统分析条带。

四、细胞功能检测

1. 实验分组:分别设立空白对照组(dHL-60 细胞)、阴性对照组(阴性对照病毒感染的 dHL-60 细胞)、NAP 高表达组(GFP-NAP 慢病毒感染的 dHL-60 细胞)。

2. Transwell 迁移实验检测 dHL-60 细胞迁移能力:在 Transwell 下室趋化因子甲酰基甲硫氨酰基亮氨酸基苯丙氨酸(f-MLP)的作用下,dHL-60 细胞由上室向下室迁移。三组 HL-60 细胞经 1.5% DMSO 诱导成熟为 dHL-60 后,每组分别设立加 f-MLP 实验组与未加 f-MLP 对照组。用无血清 IMDM 培养液稀释 f-MLP 至终浓度 100 nmol/L,Transwell 小室下层加入 600 μl 含 f-MLP 的培养液。将 dHL-60 细胞接种于 Transwell 小室上层(每孔 1×10⁵ 细胞),37 °C、5% CO₂ 条件下培养。12 h 后收集各处理组下室细胞并计数,每孔计数 3 次。实验平行进行 3 次。迁移细胞数=实验组细胞数-对照组细胞数。

3. 流式细胞术检测 dHL-60 细胞内 ROS 水平:dHL-60 细胞加入终浓度为 1 μmol/L 线粒体荧光探针 DHR123,37 °C 孵育 15 min。随后加入终浓度为 1 μmol/L 的 PMA,充分混匀后 37 °C 孵育 30 min。用流式细胞术检测各处理组细胞产生的 ROS 水平,用 Cell Quest 软件计算平均荧光强度(MFI)。每组实验重复 3 次。

4. 流式细胞术检测 dHL-60 细胞凋亡:各组 dHL-60 细胞更换不含 DMSO 的完全培养液继续培养 24 h 后,收集各处理组细胞,加入 PBS 洗涤,500×g 离心 5 min,弃上清,配成(1~5)×10⁵/ml 细胞悬液;取 100 μl 凋亡检测试剂和 100 μl 细胞悬液置检测管中混合,涡旋 3~5 s 后室温避光孵育 20 min,上 Muse™ 智能触控细胞分析仪检测。每组实验重复 3 次。

5. Western blot 法检测 dHL-60 细胞凋亡相关蛋白表达:各组 dHL-60 细胞更换无 DMSO 的完全培养液继续培养 24 h。收集各处理组细胞,按比例加入细胞裂解液、蛋白酶抑制剂提取蛋白,测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE,转膜后室温封闭 1 h,分别加入 Bax (1:2 000)、pro-caspase-9 (1:200)、active-caspase-9 (1:100)、pro-caspase-3 (1:1 000)、active-caspase-3 (1:500) 和 β-actin 抗体 (1:5 000),4 °C 过夜孵育;TBST 洗膜 3 次(每次 10 min),加 HRP 标志的二抗后 37 °C 孵育 2 h,TBST 洗涤缓冲液洗膜 3 次(每

次 10 min)。加入显色液,FluorChem Q 凝胶成像系统分析条带。实验平行进行3次。

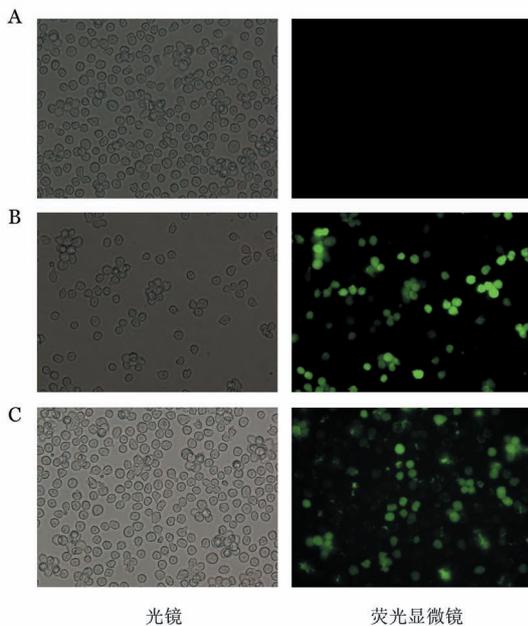
五、统计学处理

应用 SPSS16.0 软件进行数据处理。计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 *q* 检验;计数资料采用行×列表卡方检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(检验水准 $\alpha = 0.05$)。

结 果

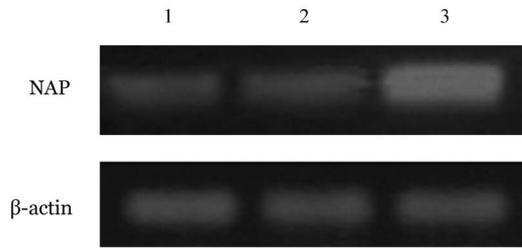
1. 稳定高表达 NAP 细胞株的建立与鉴定: HL-60 细胞经慢病毒感染 72~96 h 并以嘌呤霉素(300 ng/ml)筛选后,荧光倒置显微镜下观察到 NAP 高表达组及阴性对照组 80% 以上细胞均有 GFP 表达(图 1)。RT-PCR 结果显示,与阴性对照组相比, NAP 高表达组 HL-60 细胞的 NAP 基因转录水平上调(0.95 ± 0.12 对 1.25 ± 0.09 , $P = 0.030$);阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义(0.95 ± 0.12 对 0.98 ± 0.08 , $P = 0.740$)(图 2)。Western blot 结果表明, NAP 高表达组 HL-60 细胞的 NAP 蛋白表达量高于阴性对照组(1.17 ± 0.19 对 0.53 ± 0.21 , $P = 0.030$),阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义(0.53 ± 0.21 对 0.77 ± 0.18 , $P = 0.400$)(图 3)。

2. dHL-60 细胞的形态与表面标志 CD11b 的表达: HL-60 细胞经 1.5% DMSO 诱导 5 d 后的 dHL-60



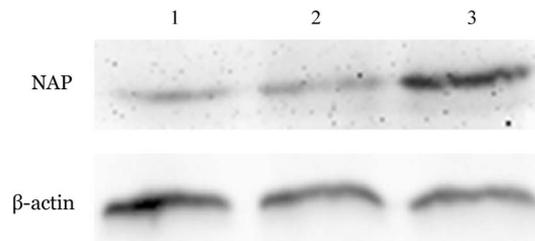
A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)高表达组

图1 HL-60细胞慢病毒感染72~96h后绿色荧光蛋白表达($\times 200$)



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: NAP 高表达组

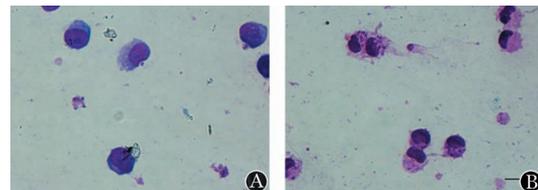
图2 RT-PCR法检测HL-60细胞经慢病毒感染72~96h后中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)基因转录水平



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: NAP 高表达组

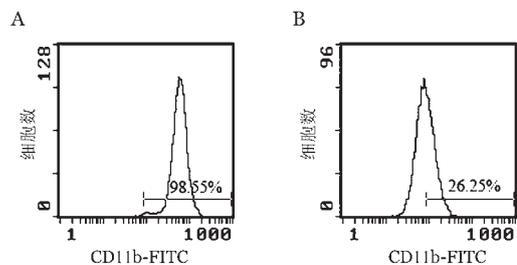
图3 Western blot法检测HL-60细胞经慢病毒感染72~96h后中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)蛋白表达

细胞体积变小,表面出现许多突起,核质比例降低,核仁消失,核染色质由密集趋向疏松,核形态扭曲折叠呈杆状或分叶(图4)。流式细胞术检测 dHL-60 细胞 CD11b 表达高于 HL-60 细胞 [98.55 ± 1.52 % 对 (26.25 ± 1.34) %, $P = 0.001$](图 5)。



A: HL-60 细胞; B: dHL-60 细胞

图4 HL-60细胞经1.5%DMSO诱导成熟后的细胞形态变化(瑞氏染色, $\times 400$)



A: DMSO 诱导组; B: 对照组

图5 流式细胞术检测HL-60细胞经1.5%DMSO诱导后表面CD11b表达

3. NAP 对 dHL-60 细胞迁移能力的影响:

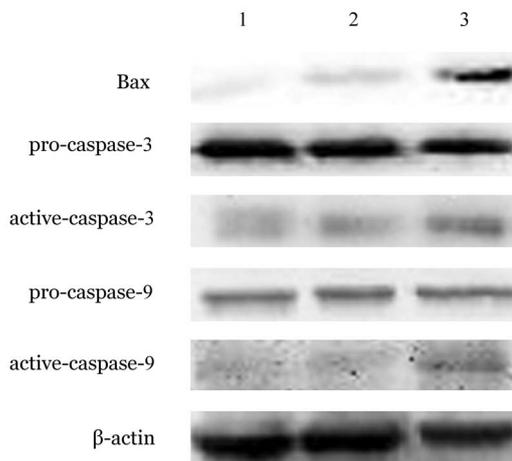
Transwell 迁移实验结果显示,NAP高表达组迁移的细胞多于阴性对照组 $[(15.30\pm 3.65)\times 10^3$ 对 $(8.00\pm 0.78)\times 10^3, P=0.001]$ 。而阴性对照组与空白对照组迁移细胞数差异无统计学意义 $[(8.00\pm 0.78)\times 10^3$ 对 $(8.33\pm 0.79)\times 10^3, P=0.665]$ 。

4. NAP对dHL-60细胞ROS生成能力的影响: NAP高表达组细胞内ROS的平均荧光强度(MFI)高于阴性对照组 $(355.70\pm 20.10$ 对 $103.22\pm 4.71, P=0.001)$,阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义 $(103.22\pm 4.71$ 对 $98.67\pm 6.12, P=0.871)$ 。

5. NAP对dHL-60细胞凋亡的影响: dHL-60细胞继续培养24h后,流式细胞术检测显示,NAP高表达组dHL-60细胞凋亡率高于阴性对照组 $[(45.05\pm 0.75)\%$ 对 $(34.10\pm 0.89)\%, P<0.001]$,阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义 $[(32.35\pm 1.05)\%$ 对 $(34.10\pm 0.89)\%, P=0.090]$ (图6)。Western blot检测结果表明,阴性对照组及NAP高表达组pro-caspase-3、pro-caspase-9蛋白表达差异无统计学意义(P 值分别为0.420、0.580),NAP高表达组dHL-60细胞active-caspase-3、active-caspase-9以及Bax凋亡相关蛋白的表达均高于阴性对照组 $[0.89\pm 0.10$ 对 $0.58\pm 0.06, P=0.010; 0.98\pm 0.02$ 对 $0.43\pm 0.08, P<0.001; 0.95\pm 0.15$ 对 $0.34\pm 0.11, P=0.005]$,空白对照组与阴性对照组dHL-60细胞active-caspase-3、active-caspase-9以及Bax凋亡相关蛋白表达差异均无统计学意义(P 值分别为0.120、0.250、0.480)(图7)。

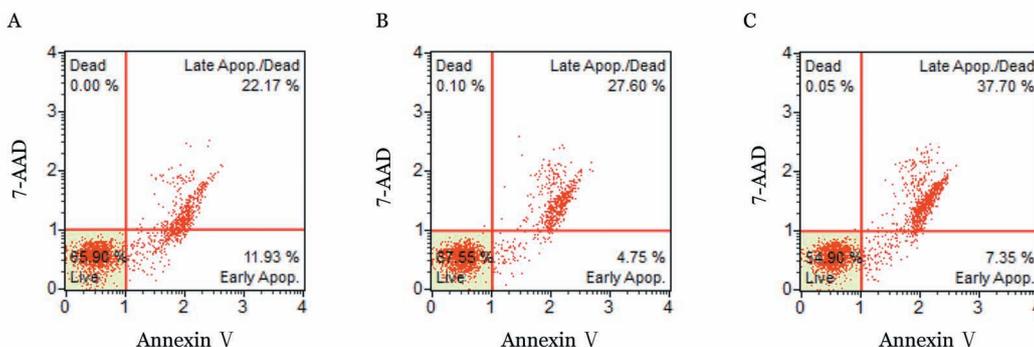
讨 论

碱性磷酸酶能够将核酸、蛋白和生物碱等底物去磷酸化,最终生成磷酸根离子和自由羟基^[11]。根据编码基因的不同,碱性磷酸酶至少可以分为肠



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:NAP高表达组
图7 中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)对分化HL-60(dHL-60)细胞凋亡相关蛋白表达的影响

型、胎盘型、生殖细胞型(胎盘样型)和组织非特异型(肝/骨/肾型)。NAP属于组织非特异型。脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)是革兰阴性菌细胞壁的成分,可刺激宿主细胞产生白细胞介素和肿瘤坏死因子,从而诱发严重的炎症反应。碱性磷酸酶可使LPS发生去磷酸化,减轻其引起的炎症反应^[12-13],提示碱性磷酸酶与炎症消退密切相关。Bender等^[14]和Peters等^[15]分别对LPS诱导建立的小鼠脓毒症模型进行研究,注射人重组非特异型碱性磷酸酶的小鼠体温升高症状以及脓毒症的严重程度得到明显改善且生存率明显提高,其原因为碱性磷酸酶可使革兰阴性菌胞壁的LPS发生去磷酸化,降低其毒性,从而减轻机体炎症反应。张欢欢等^[16]选取84例细菌感染以及39例病毒感染患者进行研究,细菌感染组患者外周血NAP的表达水平显著高于病毒感染组和健康对照组,且病毒感染组NAP明显低于健



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:NAP高表达组
图6 流式细胞术检测中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)对分化HL-60(dHL-60)细胞凋亡的影响

康对照组。Bednarska等^[17]发现NAP活性与其黏附功能呈正相关,可作为体外衡量中性粒细胞黏附功能的指标。当中性粒细胞受到f-MLP等炎症介质刺激时,可动员分泌囊泡与质膜融合,随后将囊泡内的NAP转移到细胞膜表面^[18-19]。上述研究结果都提示NAP在中性粒细胞参与的炎症发生发展过程中可能发挥重要作用,其水平升高可能与机体免疫功能增强有关。

由于外周血来源的中性粒细胞存活时间短,难以对其进行体外实验。我们采用慢病毒感染的方式构建稳定高表达NAP的细胞株,再以DMSO诱导分化获得成熟的类中性粒细胞(dHL-60细胞),借此检测并评价NAP表达升高后中性粒细胞的迁移、ROS生成以及凋亡抗炎相关生物学功能的改变。

机体发生炎症时,中性粒细胞在炎症因子形成的趋化梯度环境作用下,从外周循环迁移到炎症局部而发挥功能。我们通过Transwell迁移实验发现,NAP表达升高后中性粒细胞的迁移能力增强,可以更快更多地到达炎症部位,从而发挥抗炎作用。

中性粒细胞内富含的NADPH氧化酶可催化氧分子接受电子而转变为ROS,以杀灭微生物及其他外来异物,该过程中的耗氧量显著增加,此现象称为呼吸爆发^[20]。DHR-123是一种ROS捕获剂,其本身无荧光或只有很弱的荧光,但被氧化后能发出较强的荧光。DHR123可自由进出细胞膜,进入细胞后可被ROS氧化为可发出荧光的RHO,经过一定时间的积累,可通过流式细胞术检出相应的荧光。HL-60细胞诱导获得的类中性粒细胞dHL-60在PMA的作用下活化,启动NADPH氧化酶系统,最终产生ROS。本研究中,NAP高表达组细胞ROS的生成量高于阴性对照组($P<0.001$),而空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义,表明NAP表达水平升高可增强中性粒细胞产生ROS的能力,从而有利于机体杀灭病原微生物。

凋亡是调节外周循环中性粒细胞数目和功能的关键,对于维持体内中性粒细胞的稳态和炎症的消退都有重要的意义。机体每天可产生 $(1\sim 2)\times 10^{11}$ 个中性粒细胞,寿命为 $12\sim 18\text{ h}$ ^[21],而到达炎症部位的中性粒细胞寿命明显延长,因此中性粒细胞的凋亡对于炎症的及时消退至关重要。中性粒细胞凋亡方式分为:①由Fas配体、TNF α 配体、TRAIL配体

与细胞表面死亡受体结合而启动的凋亡方式;②线粒体相关的凋亡方式;③吞噬诱导的细胞死亡方式(PCID):在炎症部位杀死病原微生物的同时加速中性粒细胞的死亡^[22]。凋亡途径启动后,活化的pro-caspase-3被剪切下p17和p12两个亚基,继而产生有活性的active-caspase-3而发挥其促凋亡作用。细胞出现凋亡延迟不利于炎症的消退,从而会对机体脏器产生负面影响。本研究中,高表达NAP的类中性粒细胞Bax、active-caspase-3以及active-caspase-9的表达量明显高于阴性对照组,说明NAP表达升高的类中性粒细胞凋亡水平更高,有利于炎症状态下中性粒细胞的更新和炎症的快速消退。

本研究从NAP调节类中性粒细胞生物学功能的角度,揭示了炎症状态下NAP升高的意义。但是,本研究在体外通过慢病毒感染HL-60细胞的方式使NAP表达增加,体内中性粒细胞受到炎症刺激时NAP的升高状况及其对中性粒细胞生物学功能的影响有待于利用动物模型展开相关体内研究进行验证。

参考文献

- [1] Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view[J]. Immunol Rev, 2007, 219:88-102. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
- [2] Dinuer MC. Disorders of neutrophil function: an overview[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1124:501-515. doi: 10.1007/978-1-62703-845-4_30.
- [3] Garattini E, Gianni M. Leukocyte alkaline phosphatase a specific marker for the post-mitotic neutrophilic granulocyte: regulation in acute promyelocytic leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 1996, 23(5-6):493-503. doi:10.3109/10428199609054858.
- [4] Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte [J]. Blood, 1997, 89(10):3503-3521.
- [5] Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview [J]. Indian J Clin Biochem, 2014, 29(3):269-278. doi: 10.1007/s12291-013-0408-y.
- [6] Gianni M, Terao M, Zanotta S, et al. Retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor synergistically induce leukocyte alkaline phosphatase in acute promyelocytic leukemia cells [J]. Blood, 1994, 83(7):1909-1921.
- [7] 李海宁, 李伟, 吴惠毅. 中性粒细胞碱性磷酸酶研究进展[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(07): 524-526.
- [8] Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture[J]. Nature, 1977, 270(5635):347-349.
- [9] Gupta D, Shah HP, Malu K, et al. Differentiation and character-

- ization of myeloid cells [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 1-34. doi: 10.1002/0471142735.im22f05s104.
- [10] Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75(5):2458-2462.
- [11] Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1053:27-51. doi: 10.1007/978-1-62703-562-0_3.
- [12] Lei W, Ni H, Herington J, et al. Alkaline phosphatase protects lipopolysaccharide-induced early pregnancy defects in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4):e0123243. doi: 10.1371/journal.pone.0123243.
- [13] Beumer C, Wulferink M, Raaben W, et al. Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS) - mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307 (2):737-744. doi: 10.1124/jpet.103.056606.
- [14] Bender B, Baranyi M, Kerekes A, et al. Recombinant human tissue non-specific alkaline phosphatase successfully counteracts lipopolysaccharide induced sepsis in mice [J]. *Physiol Res*, 2015, 64(5):731-738.
- [15] Peters E, van Elsas A, Heemskerk S, et al. Alkaline phosphatase as a treatment of sepsis-associated acute kidney injury [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344(1):2-7. doi: 10.1124/jpet.112.198226.
- [16] 张欢欢, 张春艳, 杨晋, 等. 流式细胞术检测中性粒细胞膜 NAP 方法的建立 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37 (8):623-627. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.08.015.
- [17] Bednarska K, Klink M, Sulowska Z. Application of intracellular alkaline phosphatase activity measurement in detection of neutrophil adherence in vitro [J]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006(4):19307. doi: 10.1155/MI/2006/19307.
- [18] Borregaard N, Christensen L, Bejerrum OW, et al. Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase [J]. *J Clin Invest*, 1990, 85 (2): 408- 416. doi: 10.1172/JCI114453.
- [19] Fernández- Segura E, García JM, Campos A. Dynamic reorganization of the alkaline phosphatase- containing compartment during chemotactic peptide stimulation of human neutrophils imaged by backscattered electrons [J]. *Histochem Cell Biol*, 1995, 104(2):175-181.
- [20] Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(4): 657-670. doi: 10.1189/jlb.1012544.
- [21] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(5):617-653.
- [22] Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection [J]. *Immunol Res*, 2009, 43 (1-3):25-61. doi: 10.1007/s12026-008-8049-6.

(收稿日期:2015-11-11)

(本文编辑:徐茂强)

中华医学会血液学分会第九届委员会委员名单

主任委员 黄晓军

前任主任委员 沈志祥

候任主任委员 王建祥

副主任委员 吴德沛 邵宗鸿 胡 豫 马 军

常务委员(按姓氏笔画为序) 于 力 马 军 方美云 王建祥 王健民 任汉云 刘 霆

刘启发 孙自敏 吴德沛 宋永平 张连生 杨林花 沈志祥 邵宗鸿 金 洁

侯 明 胡 豫 赵永强 梁英民 黄晓军

委员兼秘书长 刘开彦

委 员(按姓氏笔画为序) 于 力 马 军 方美云 牛 挺 王 欣 王 椿 王 琳

王季石 王建祥 王健民 王景文 付 蓉 冯建明 白 海 白晓川 任汉云

江 明 刘 林 刘 霆 刘开彦 刘启发 刘卓刚 孙自敏 孙爱宁 吴广胜

吴德沛 宋永平 张 梅 张 曦 张广森 张连生 李 娟 李 艳 李 薇

李军民 李建勇 李晓林 杨林花 沈志祥 肖 扬 肖志坚 邱录贵 邵宗鸿

陈 虎 陈国安 周 晋 周郁鸿 周剑峰 周道斌 金 洁 罗建民 侯 明

侯 健 胡 豫 胡灯明 胡建达 赵永强 赵维莅 徐开林 梁英民 黄 河

黄 跃 黄晓军 韩艳秋 赖永榕