

脂多糖诱导的低密度中性粒细胞表型特征及功能改变

孙燃 刘云峰 金航飞 温笑 高晞 王逸凡 孙炳伟

南京医科大学附属苏州医院(苏州市立医院)中性粒细胞工程技术研究中心,苏州 215002

通信作者:孙炳伟,Email:sunbinwe@hotmail.com

【摘要】 目的 体外脂多糖(LPS)刺激中性粒细胞模拟脓毒症环境,观察诱导低密度中性粒细胞(LDN)的生成情况,并分析其生成机制、表型及功能特征。方法 ①脓毒症患者 LDN 比例分析:采用病例对照研究方法,选择 2022 年 6 月至 2024 年 1 月苏州市立医院重症监护病房(ICU)收治的 45 例脓毒症患者作为研究对象;同期招募 32 例年龄、性别匹配的健康志愿者作为对照组。采集两组研究对象的外周静脉血,分析 LDN 在外周血单个核细胞(PBMC)层及所有中性粒细胞中的比例;采用流式细胞仪检测 LDN 中成熟中性粒细胞标志物 CD10 表达,分析未成熟 LDN 比例。②LPS 诱导 LDN 生成及其机制分析:提取健康志愿者外周血中性粒细胞,以不同浓度 LPS(10、100、1 000 $\mu\text{g/L}$)刺激 4 h,采用 Percoll 密度梯度离心法分离高密度中性粒细胞(HDN)和 LDN,计算 LDN 生成比例;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中的中性粒细胞胞外诱捕网(NET)水平。将健康志愿者外周血中性粒细胞分为 HDN 对照组、LDN 对照组、LPS 刺激 HDN 组、LPS 刺激 LDN 组;LPS 刺激组加入 LPS 1 000 $\mu\text{g/L}$ 刺激 4 h,对照组加入等体积培养基。透射电镜下观察细胞形态学改变。再取健康志愿者外周血中性粒细胞分为对照组(等体积培养基)、LPS 组(LPS 1 000 $\mu\text{g/L}$ 刺激 4 h)和佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA)组(PMA 100 nmol/L 刺激 4 h)。扫描电镜下观察 NET 形成情况。另取健康志愿者外周血中性粒细胞分为 LPS 组(LPS 1 000 $\mu\text{g/L}$ 刺激 4 h)和 NET 释放抑制剂 GSK484 预处理组(LPS 刺激前给予 GSK484 50 nmol/L 预处理 30 min)。采用流式细胞仪检测 LDN 生成情况;采用 ELISA 检测细胞上清液中 NET 水平。③中性粒细胞表型及功能分析:将健康志愿者外周血中性粒细胞分为 HDN 对照组、LDN 对照组、LPS 刺激 HDN 组、LPS 刺激 LDN 组,各组处理方法同上。采用流式细胞仪检测细胞表面粒细胞成熟标志物(CD66b、CD15、CD16)、趋化因子受体(CXCR2、CXCR4)及细胞活化标志物(CD11b、CD62L)表达;采用琼脂糖趋化模型检测细胞趋化功能,分析趋化距离(CD)、趋化细胞比例(CCR)和趋化指数(CI)。结果 ①脓毒症患者 LDN 比例分析结果:脓毒症患者 PBMC 层中性粒细胞比例(0.362 ± 0.125)、LDN 占有所有中性粒细胞比例(0.439 ± 0.162)及 CD10⁺ LDN 比例(0.222 ± 0.093)均高于健康对照者(分别为 0.040 ± 0.013 、 0.014 ± 0.004 、 0.005 ± 0.002 ,均 $P < 0.05$)。②LPS 诱导 LDN 生成及其机制分析结果:透射电镜下显示,LPS 刺激后 HDN 和 LDN 表面凸起及胞内空泡均增多,以 LPS 刺激 LDN 组增多更明显。LPS 刺激后,LDN 比例及细胞上清液中 NET 水平均呈浓度依赖性升高(均 $P < 0.05$);扫描电镜下观察到 LPS 刺激可诱导中性粒细胞形成 NET,但诱导程度弱于 PMA 刺激;GSK484 干预可抑制 LPS 诱导的 LDN 生成和 NET 释放,与 LPS 组比较,差异均有统计学意义[LDN 数量($\times 10^5$): 3.75 ± 0.52 比 7.07 ± 1.14 ,NET(A 值): 0.96 ± 0.14 比 1.36 ± 0.27 ,均 $P < 0.05$]。③中性粒细胞表型及功能分析结果:细胞表型分析显示,与对照组相比,LPS 刺激后,无论是 HDN 还是 LDN,其表面 CD66b、CD11b 表达均呈升高趋势,CD16、CXCR2、CD62L 表达均呈下降趋势。与 LPS 刺激 HDN 组相比,LPS 刺激 LDN 组表面 CD66b 表达升高[平均荧光强度(MFI): $16\,424 \pm 2\,074$ 比 $9\,470 \pm 1\,201$, $P < 0.05$],CD16 表达下降(MFI: $3\,647 \pm 1\,458$ 比 $7\,815 \pm 1\,143$, $P < 0.05$),CD15 表达无明显变化;在趋化因子受体方面,与 LPS 刺激 HDN 组相比,LPS 刺激 LDN 组 CXCR2 表达下降,CXCR4 表达升高;在细胞活化标志物方面,与 LPS 刺激 HDN 组相比,LPS 刺激 LDN 组 CD11b 表达升高(MFI: $11\,684 \pm 2\,131$ 比 $7\,782 \pm 373$, $P < 0.05$),CD62L 表达下降[(59.75 ± 7.42)% 比 (82.18 ± 14.06)%, $P < 0.05$]。趋化功能分析显示,LPS 刺激后 HDN 和 LDN 的 CD、CCR、CI 均下降,且 LPS 刺激 LDN 组较 LPS 刺激 HDN 组下降更为显著[CD(μm): 886.5 ± 342.7 比 $1\,633.0 \pm 295.0$,CCR:(0.69 ± 0.25)% 比 (2.44 ± 1.40)%,CI:(9.63 ± 8.94)% 比 (34.62 ± 8.31)%,均 $P < 0.05$]。结论 LPS 通过 NET 形成依赖性途径诱导 LDN 生成。LDN 亚群呈现 CD66b、CXCR4、CD11b 高表达及 CD16、CXCR2、CD62L 低表达的独特表型,并伴有趋化功能障碍。

【关键词】 脂多糖;脓毒症;低密度中性粒细胞;表型;趋化

基金项目:国家自然科学基金(U21A20370)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250801-00417

Phenotypic characteristics and functional alterations of lipopolysaccharide-induced low-density neutrophil

Sun Ran, Liu Yunfeng, Jin Hangfei, Wen Xiao, Gao Xi, Wang Yifan, Sun Bingwei

Research Center for Neutrophil Engineering Technology, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University (Suzhou Municipal Hospital), Suzhou 215002, China

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

【Abstract】 Objective To observe the generation of low-density neutrophil (LDN) induced by lipopolysaccharide (LPS) stimulation *in vitro* to simulate a septic environment, and to analyze their generation mechanism, phenotype, and functional characteristics. **Methods** 1) Analysis of LDN proportion in septic patients: A case-control study was conducted. Peripheral blood samples were collected from 45 septic patients admitted to the intensive care unit (ICU) of Suzhou Municipal Hospital from June 2022 to January 2024, and from 32 age- and sex-matched healthy volunteers as the control group. The proportion of LDN in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) layer and among total neutrophils was analyzed. The expression of CD10, a marker of mature neutrophils, was detected by flow cytometry to analyze the proportion of immature LDN. 2) LPS-induced LDN generation and mechanism analysis: Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy volunteers. They were stimulated with different concentrations of LPS (10, 100, 1 000 $\mu\text{g/L}$) for 4 hours. High-density neutrophil (HDN) and LDN were separated by Percoll density gradient centrifugation, and the proportion of LDN was calculated. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in the culture supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Neutrophils from healthy volunteers were divided into HDN control, LDN control, LPS-stimulated HDN, and LPS-stimulated LDN groups. The LPS-stimulated groups were treated with LPS (1 000 $\mu\text{g/L}$) for 4 hours, while the control groups received an equal volume of culture medium. Morphological changes were observed under transmission electron microscope. Additionally, neutrophils from healthy volunteers were divided into control group (an equal volume of culture medium), LPS group (stimulated with 1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS for 4 hours), and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) group (stimulated with 100 nmol/L PMA for 4 hours). NET formation was observed under scanning electron microscope. In another experiment, neutrophils from healthy volunteers were divided into LPS group (stimulated with 1 000 $\mu\text{g/L}$ LPS for 4 hours) and GSK484 pretreatment group (pretreated with 50 nmol/L GSK484, a NET release inhibitor, for 30 minutes before LPS stimulation). LDN generation was detected by flow cytometry, and NET levels in the supernatant were detected by ELISA. 3) Phenotypic and functional analysis of neutrophils: Neutrophils from healthy volunteers were divided into the same four groups as described above (HDN control, LDN control, LPS-stimulated HDN, LPS-stimulated LDN groups). The expression of granulocyte maturation markers (CD66b, CD15, CD16), chemokine receptors (CXCR2, CXCR4), and cell activation markers (CD11b, CD62L) was detected by flow cytometry. Chemotactic function was assessed using an agarose chemotaxis model, and the chemotactic distance (CD), chemotactic cell ratio (CCR), and chemotactic index (CI) were analyzed. **Results** 1) Analysis results of LDN proportion in septic patients: The proportion of neutrophils in the PBMC layer (0.362 ± 0.125), the proportion of LDN among total neutrophils (0.439 ± 0.162), and the proportion of CD10⁺ LDN (0.222 ± 0.093) in septic patients were higher than those in healthy controls (0.040 ± 0.013 , 0.014 ± 0.004 , and 0.005 ± 0.002 , respectively, all $P < 0.05$). 2) LPS-induced LDN generation and mechanism analysis results: Transmission electron microscope showed increased surface protrusions and intracellular vacuoles in both HDN and LDN after LPS stimulation, particularly in the LPS-stimulated LDN group. After LPS stimulation, both the proportion of LDN and NET levels in the supernatant increased in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). Scanning electron microscope revealed that LPS stimulation induced NET formation in neutrophils, but to a lesser extent than PMA stimulation. GSK484 intervention inhibited LPS-induced LDN generation and NET release, with statistically significant differences compared with the LPS group [LDN count ($\times 10^5$): 3.75 ± 0.52 vs. 7.07 ± 1.14 , NET (A value): 0.96 ± 0.14 vs. 1.36 ± 0.27 , both $P < 0.05$]. 3) Results of phenotypic and functional analysis of neutrophils: Cell phenotype analysis revealed that compared with the control groups, after LPS stimulation, both HDN and LDN showed increased expression of CD66b and CD11b, and decreased expression of CD16, CXCR2, and CD62L. Compared with the LPS-stimulated HDN group, the LPS-stimulated LDN group exhibited higher expression of CD66b [mean fluorescence intensity (MFI): $16\,424 \pm 2\,074$ vs. $9\,470 \pm 1\,201$, $P < 0.05$] and lower expression of CD16 (MFI: $3\,647 \pm 1\,458$ vs. $7\,815 \pm 1\,143$, $P < 0.05$), while CD15 expression showed no significant change. Regarding cell chemokine receptors, compared with the LPS-stimulated HDN group, the LPS-stimulated LDN group showed decreased CXCR2 expression and increased CXCR4 expression. Regarding activation markers, compared with the LPS-stimulated HDN group, the LPS-stimulated LDN group showed increased CD11b expression (MFI: $11\,684 \pm 2\,131$ vs. $7\,782 \pm 373$, $P < 0.05$) and decreased CD62L expression [(59.75 ± 7.42)% vs. (82.18 ± 14.06)%, $P < 0.05$]. Chemotaxis assays showed that after LPS stimulation, CD, CCR, and CI of HDN and LDN were all decreased, with more pronounced decreases in the LPS-stimulated LDN group than in the LPS-stimulated HDN group [CD (μm): 886.5 ± 342.7 vs. $1\,633.0 \pm 295.0$, CCR: (0.69 ± 0.25)% vs. (2.44 ± 1.40)%, CI: (9.63 ± 8.94)% vs. (34.62 ± 8.31)%, all $P < 0.05$]. **Conclusions** LPS induces LDN generation through a NET formation-dependent pathway. This LDN subpopulation displays a unique phenotype characterized by high expression of CD66b, CXCR4, CD11b and low expression of CD16, CXCR2, CD62L, accompanied by chemotactic dysfunction.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Sepsis; Low-density neutrophil; Phenotype; Chemotaxis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U21A20370)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250801-00417

近年来,脓毒症已成为重症监护病房(intensive care unit, ICU)中患者死亡的主要原因^[1]。尽管近年来在早期液体复苏、抗菌药物应用及器官支持治疗方面取得显著进展,但脓毒症患者远期生存率仍不

理想,尤其是合并免疫抑制状态的患者,病死率高达40%~60%^[2-3],提示脓毒症中免疫系统动态失衡是影响预后的关键因素^[4]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞壁的关键成分,在脓毒症发

病机制中居核心地位,常被用于诱导脓毒症模型。

中性粒细胞是机体抵御病原体入侵的第一道防线。在脓毒症等病理状态下,中性粒细胞功能和亚群分布发生改变。近年来,具有独特物理特性的中性粒细胞亚群——低密度中性粒细胞(low-density neutrophil, LDN)进入研究者视野^[5]。与常规正常密度中性粒细胞,也称高密度中性粒细胞(high-density neutrophil, HDN)不同,LDN 在密度梯度离心后分布于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)层,目前针对其表面标志物、功能特性及病理意义尚存争议。LDN 最初在系统性红斑狼疮患者中被发现,其低密度特性可能与细胞质内颗粒减少或细胞膜脂质成分改变有关^[6]。同时,LDN 在不同疾病背景下功能不同:在类风湿关节炎中,LDN 通过释放促炎介质加重关节炎^[7];在癌症或慢性感染中,LDN 通过精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、活性氧抑制 T 细胞增殖,促进免疫逃逸^[8-9]。

近年来,有研究者发现脓症患者体内也存在 LDN,提示其可能在严重感染病理过程中发挥重要作用^[10],但相关研究仍较局限。本研究旨在通过分析脓症患者与健康对照者外周血样本,并结合体外细胞实验,探讨脓毒症时 LDN 的形成机制、表型特点及免疫功能变化,深入理解 LDN 对脓毒症进展的警示意义,提高研究者对该中性粒细胞亚群的关注度,为脓毒症免疫状态评估和有效干预提供依据。

1 资料与方法

1.1 脓症患者 LDN 比例分析

1.1.1 研究对象:采用病例对照研究方法,选择 2022 年 6 月至 2024 年 1 月苏州市立医院 ICU 收治的 45 例年龄 >18 岁的脓症患者作为研究对象。脓毒症的诊断符合 Sepsis-3 标准。排除妊娠期、存在血液系统疾病或造血功能障碍、入组前 1 周内使用过粒细胞集落刺激因子等影响中性粒细胞数量或功能药物的患者。同期招募 32 例年龄、性别匹配的健康志愿者作为对照组,健康志愿者来自本院体检中心,无急慢性感染、炎症性疾病、血液系统疾病史。

1.1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经过苏州市立医院伦理委员会审查批准(审批号:K-2021-068-K01),所有操作获得受试者或家属知情同意。

1.1.3 外周血中性粒细胞分离与 LDN 比例分析:采集研究对象外周静脉血(脓症患者于入组后 24 h 内采集,健康志愿者于体检当日采集)4 mL。采用不连续 Percoll 密度梯度离心法分离细胞。将全血加至

由下至上分别为 81%、70%、55% 的 Percoll 梯度液上,室温下 $720 \times g$ 离心 30 min 后,收集 55%/70% 界面(富含 PBMC、LDN)、70%/81% 界面(富含 HDN)细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后计数。计算 PBMC 层中性粒细胞比例(即 LDN 占 PBMC 层细胞的比例)及 LDN 占有中性粒细胞(即 LDN+HDN)比例。基于 CD10 是成熟中性粒细胞的标志物,通过流式细胞仪检测 LDN 中 CD10⁻ 的比例,以判断未成熟中性粒细胞比例。

1.2 LPS 诱导 LDN 生成及其机制分析

1.2.1 磁珠阴性选择法提取健康志愿者中性粒细胞:采集健康志愿者外周静脉血,按照 EasySep™ 人中性粒细胞分离试剂盒说明书,采用磁珠阴性选择法分离中性粒细胞^[11]。全流程严格保持无菌操作,磁珠分选过程中避免振动干扰。最终细胞悬液需经锥虫蓝染色验证活性 >95%、流式细胞仪检测细胞纯度 >90%,方认为符合研究要求。

1.2.2 LPS 刺激及密度梯度离心法分离 LDN、HDN:将分离的健康志愿者中性粒细胞用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI 1640 培养基重悬并调整浓度为 1×10^6 /mL。将细胞分为对照组和 LPS 刺激组。对照组加入等体积培养基;LPS 刺激组加入终浓度为 1 000 μ g/L 的 LPS,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。培养结束后,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,再次进行不连续 Percoll 密度梯度离心(81%、70%、55%),操作步骤同 1.1.3。从 70%/81% 界面回收 HDN,从 55%/70% 界面回收 LDN,分别分为对照组和 LPS 刺激组,观察细胞形态学变化。另设 LPS 浓度分别为 10、100、1 000 μ g/L 的刺激组及对照组(加入等体积培养基),按照上述方法分离并计算 LDN 比例,同时检测细胞上清液中的中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)水平,观察 LPS 的剂量效应。

1.2.2.1 透射电镜下观察中性粒细胞形态:收集细胞,PBS 洗涤后,加入预冷的 2.5% 戊二醛固定,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 漂洗后,用 1% 锇酸固定 2 h;经梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋后,制备超薄切片。切片经醋酸铀酰和柠檬酸铅染色后,于透射电镜下观察中性粒细胞超微结构并拍照。

1.2.2.2 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 NET 水平:收集细胞培养上清液,1 000 $\times g$ 离心 20 min,除去杂质及细胞碎片,取上清液用于检测。按照试剂盒说明书,经包被、

加样、加酶标抗体、显色等步骤后,使用酶标仪测定各孔的吸光度值(A 值),代表 NET 水平。

1.2.3 扫描电镜下观察 NET 形态:将分离的健康志愿者中性粒细胞分为对照组(等体积培养基)、LPS 组(1 000 μg/L)和佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)组(100 nmol/L)。各组于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,将样品在 2.5% 戊二醛中固定过夜;PBS 洗涤后,1% 四氧化二铈中孵育;分级系列乙醇脱水后进行临界点干燥,并涂 2 nm 铂,最后涂 5 nm 碳层,在 SU8100 扫描电镜下观察 NET 的形态并拍照。

1.2.4 NET 释放抑制剂 GSK484 干预实验:另取分离的健康志愿者中性粒细胞,分为 LPS 组和 GSK484+LPS 组。LPS 组加入 LPS 1 000 μg/L 培养 4 h;GSK484+LPS 组先加入 50 nmol/L GSK484 预处理 30 min,然后加入 LPS 1 000 μg/L 继续培养 4 h。收集细胞,采用流式细胞仪检测 LDN 生成情况;同时收集细胞培养上清液,采用 ELISA 检测 NET 水平。

1.3 中性粒细胞表型及功能分析:分离健康志愿者中性粒细胞,采用密度梯度离心法收集 LDN、HDN,并分别分为对照组和 LPS 刺激组,处理方法同 1.2.1。检测中性粒细胞表型及趋化功能。

1.3.1 流式细胞仪检测中性粒细胞表型:细胞重悬在含有 1% FBS 的预冷 PBS 中,浓度为 2×10⁶/mL。使用抗体包括成熟粒细胞标志物(CD10、CD66b、CD15、CD16)、趋化因子受体(CXCR2、CXCR4)及细胞活化标志物[CD11b、L-选择素(CD62L)]。4 °C 下避光孵育 20 min 后, PBS 洗涤细胞 2 次,使用 FACS Canto II 细胞仪检测,并使用 FlowJo 软件对数据进行分析处理。

1.3.2 中性粒细胞趋化功能检测:构建基于琼脂糖基质的细胞趋化系统^[12]。将制备好的样本置于 37 °C 恒温、5% CO₂ 细胞培养箱中持续孵育 2 h,以 N-甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)作为趋化物。倒置荧光显微镜下观察并记录细胞迁移。为提升分析精度,使用计算机辅助分析系统,将趋化区域划分为 3 个检测区[Ⅰ区:趋化距离(chemotactic distance, CD) < 800 μm; Ⅱ区:800 μm ≤ CD ≤ 2 000 μm; Ⅲ区:CD > 2 000 μm]。通过建立多维评价体系,从空间分布、细胞数量、运动效能 3 个维度进行定量分析,具体指标包括 CD、趋化细胞比例(chemotactic cell ratio, CCR)和趋化指数(chemotactic index, CI)。

1.4 统计学方法:应用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。每项实验至少独立重复 3 次。计量资料均符合正态分布,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,若方差齐,以 LSD 为统计依据;若方差不齐,以 Dunnett *T*₃ 为统计依据。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 脓毒症患者 LDN 比例分析结果(表 1):脓毒症组患者外周血中性粒细胞在 PBMC 层的比例高于健康对照组,且 LDN 占有所有中性粒细胞的比例亦增加(均 *P* < 0.05)。通过标记 CD10 表达发现,大多数 HDN 为 CD10⁺;脓毒症组患者 LDN 中 CD10⁻ 比例较健康对照组增加(*P* < 0.05)。说明 LDN 可能是由成熟与未成熟中性粒细胞亚群混合组成。

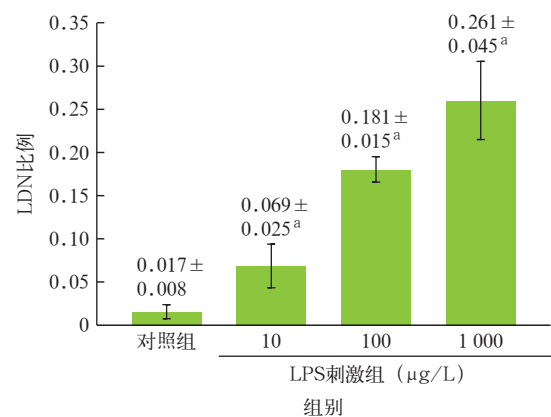
表 1 两组受试者外周血 LDN 比例比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	PBMC 层中性粒细胞比例	LDN 占有所有中性粒细胞比例	CD10 ⁻ LDN 比例
健康对照组	32	0.040 ± 0.013	0.014 ± 0.004	0.005 ± 0.002
脓毒症组	45	0.362 ± 0.125 ^a	0.439 ± 0.162 ^a	0.222 ± 0.093 ^a

注:LDN 为低密度中性粒细胞, PBMC 为外周血单个核细胞, CD10 为成熟中性粒细胞标志物;与健康对照组比较, ^a*P* < 0.05

2.2 LPS 诱导 LDN 生成及其机制分析结果

2.2.1 LPS 诱导 LDN 生成及形态重塑:LPS 剂量效应分析结果显示,随着 LPS 浓度增加,LDN 比例逐渐增加(图 1)。透射电镜下显示(图 2),HDN 对照组和 LDN 对照组细胞膜表面均相对光滑;而 LPS 刺激后,无论是 HDN 还是 LDN,细胞表面凸起均明显增加,胞内空泡数量均增多,以 LPS 刺激 LDN 组空泡数量增多更加明显,核分叶数量亦呈现增多趋势。



注:LDN 为低密度中性粒细胞, LPS 为脂多糖;与对照组比较, ^a*P* < 0.05

图 1 各组健康志愿者外周血中性粒细胞中 LDN 比例比较

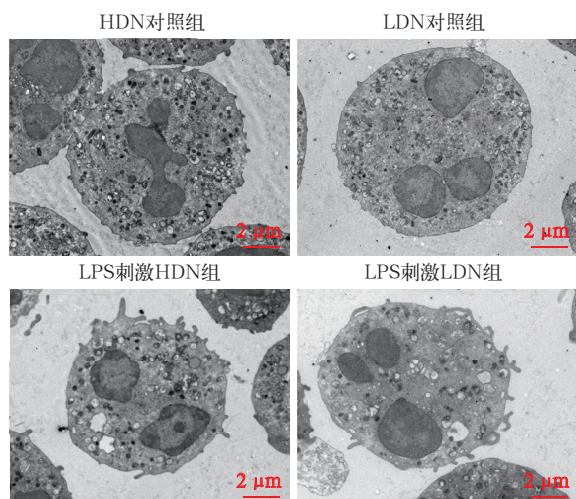


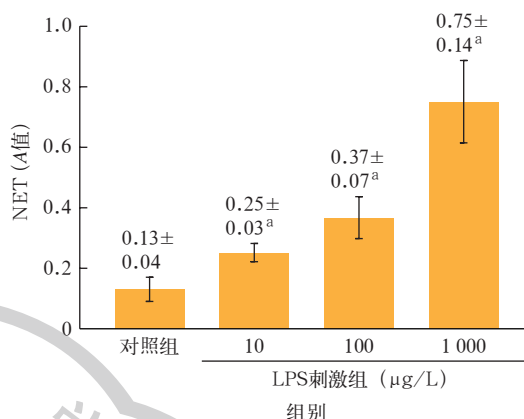
图 2 透射电镜下观察各组健康志愿者外周血中性粒细胞形态学改变 高密度中性粒细胞(HDN)对照组和低密度中性粒细胞(LDN)对照组细胞表面光滑,核分叶正常;脂多糖(LPS)刺激后,HDN和LDN表面均出现凸起,胞内空泡数量增多,以LPS刺激LDN组尤为显著 醋酸铀酰-柠檬酸铅染色 ×10 000

2.2.2 脓毒症状态下LDN形成与NET释放相关:LPS刺激后,细胞培养上清液中NET水平呈浓度依赖性升高(均 $P < 0.05$;图3)。扫描电镜下观察显示(图4),对照组中性粒细胞几乎不产生NET;PMA刺激可以促进NET形成,LPS同样可以诱导NET形成,但数量少于PMA刺激。为进一步明确LDN形成与NET释放的关系,使用NET释放抑制剂GSK484干预后发现,LPS刺激可以增加LDN生成及细胞培养上清液中NET水平;但在GSK484刺激后,LDN数量和上清液中NET水平均下降(表2)。

2.3 中性粒细胞表型及功能分析

2.3.1 LPS诱导LDN呈现独特的活化表型(图5~7):在粒细胞成熟标志物方面,与相应对照组比较,LPS刺激后,HDN和LDN表面CD66b表达均呈升高趋势,CD16表达均呈下降趋势,以LDN表面标志物表达变化更加显著(均 $P < 0.05$);而LPS刺激对CD15

表达无明显影响。说明从健康个体中分离的HDN和LDN表面CD66b、CD15、CD16表达基本一致,但供者之间存在差异。



注:NET为中性粒细胞胞外诱捕网,LPS为脂多糖;与对照组比较,^a $P < 0.05$

图 3 各组健康志愿者外周血中性粒细胞 NET 释放比较

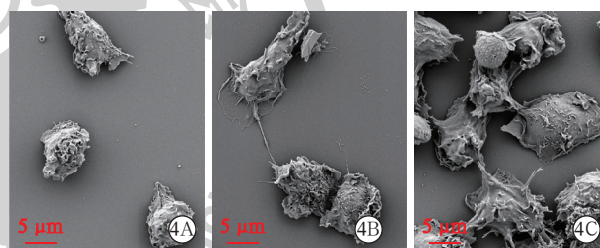
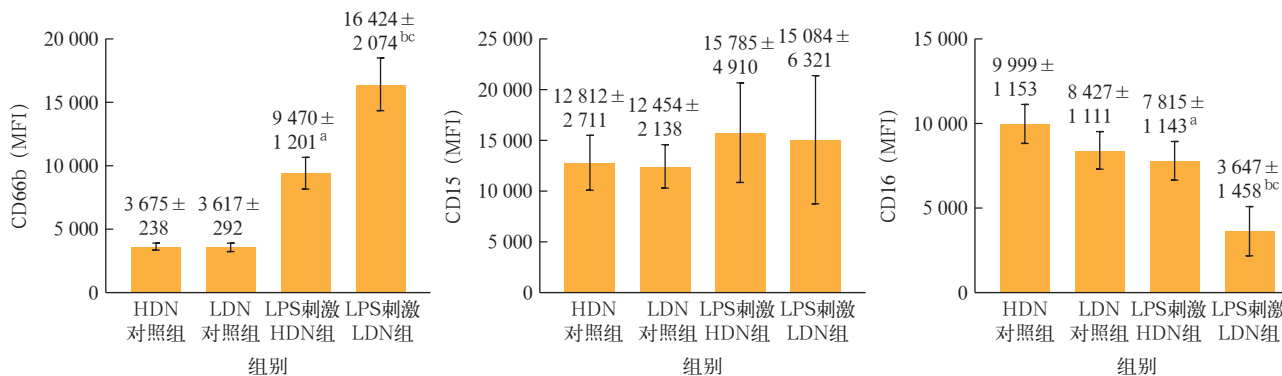


图 4 扫描电镜下观察各组健康志愿者外周血中性粒细胞胞外诱捕网(NET)形成情况 对照组(A)中性粒细胞表面光滑,无NET形成;脂多糖(LPS)组(B)可见少量NET形成;佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA)组(C)可见大量典型的网状NET结构,且数量多于LPS组 喷金镀膜 ×3 000

表 2 两组健康志愿者外周血 LDN 数量及中性粒细胞上清液中 NET 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LDN 数量 ($\times 10^5$)	NET (A 值)
LPS 组	6	7.07 ± 1.14	1.36 ± 0.27
GSK484+LPS 组	6	3.75 ± 0.52 ^a	0.96 ± 0.14 ^a

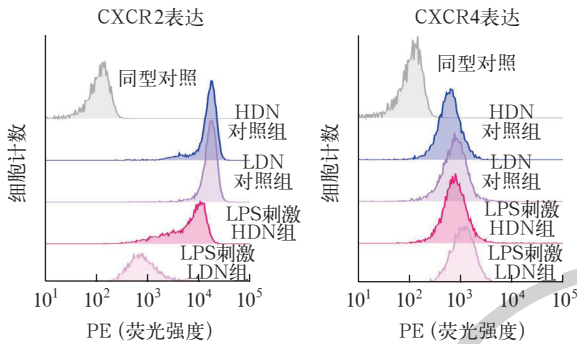
注:LDN为低密度中性粒细胞,NET为中性粒细胞胞外诱捕网,LPS为脂多糖,GSK484为NET释放抑制剂;与LPS组比较,^a $P < 0.05$



注:HDN为高密度中性粒细胞,LDN为低密度中性粒细胞,LPS为脂多糖,MFI为平均荧光强度;与HDN对照组比较,^a $P < 0.05$;与LDN对照组比较,^b $P < 0.05$;与LPS刺激HDN组比较,^c $P < 0.05$

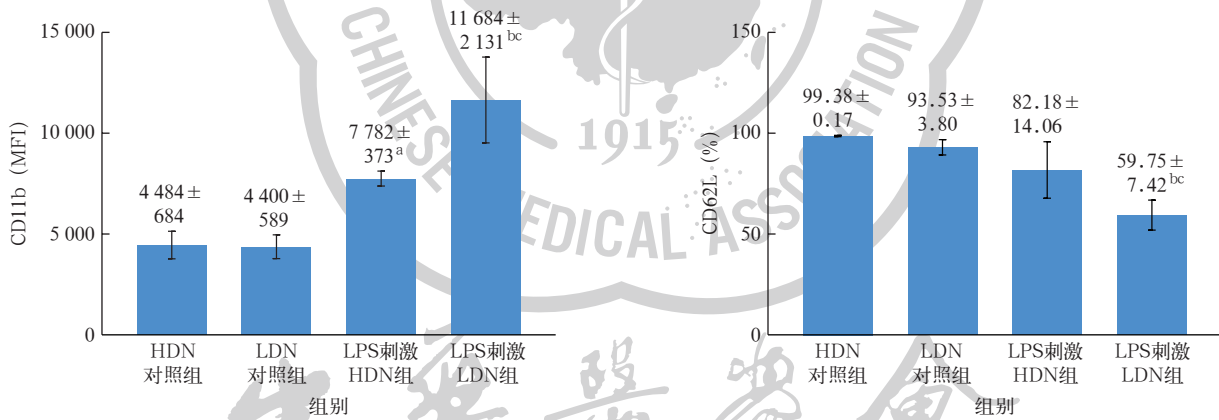
图 5 各组健康志愿者外周血不同类型中性粒细胞表面成熟粒细胞标志物 CD66b、CD15、CD16 表达比较

在趋化因子受体方面,与对照组相比,LPS 刺激后,HDN 和 LDN 表面 CXCR2 表达均呈下降趋势,以 LDN 表面 CXCR2 表达下降更加明显;而 LPS 刺激后 CXCR4 表达仅在 LDN 表面增加,且高于 HDN。



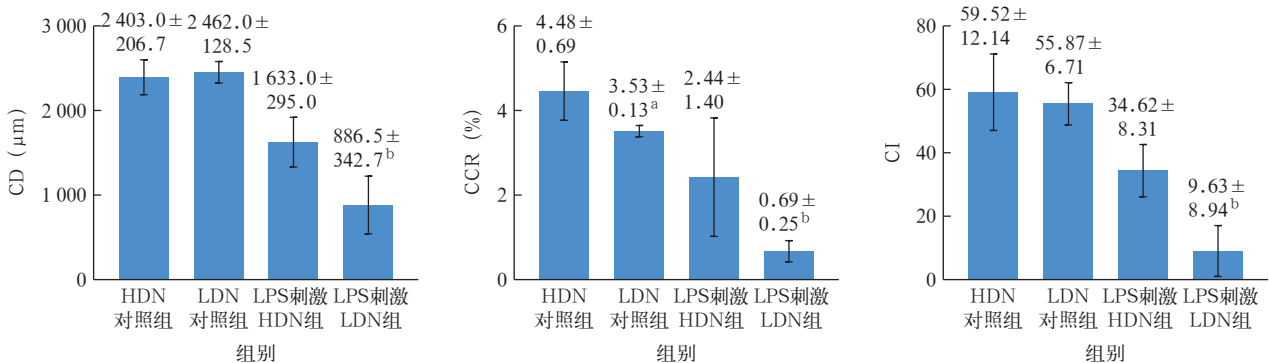
注: HDN 为高密度中性粒细胞, LDN 为低密度中性粒细胞, LPS 为脂多糖, PE 为藻红蛋白; 荧光强度反映表达量
图 6 各组健康志愿者外周血不同类型中性粒细胞表面趋化因子受体 CXCR2、CXCR4 表达比较

在细胞活化标志物方面,与对照组相比,LPS 刺激后,HDN、LDN 表面 CD11b 表达呈升高趋势,CD62L 表达呈下降趋势,以 LDN 表面标志物表达变化更加显著(均 $P < 0.05$)。



注: HDN 为高密度中性粒细胞, LDN 为低密度中性粒细胞, LPS 为脂多糖, MFI 为平均荧光强度; 与 HDN 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LDN 对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS 刺激 HDN 组比较, ^c $P < 0.05$

图 7 各组健康志愿者外周血不同类型中性粒细胞表面细胞活化标志物 CD11b、CD62L 表达比较



注: LDN 为低密度中性粒细胞, HDN 为高密度中性粒细胞, LPS 为脂多糖, CD 为趋化距离, CCR 为趋化细胞比例, CI 为趋化指数; 与 HDN 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 刺激 HDN 组比较, ^b $P < 0.05$

图 9 各组健康志愿者外周血不同类型中性粒细胞趋化功能指标比较

2.3.2 脓毒症状态下 LDN 趋化功能异常(图 8 ~ 9): HDN 对照组与 LDN 对照组细胞趋化功能无明显差异;但 LPS 刺激后,HDN 和 LDN 的 CD、CCR、CI 均下降,以 LDN 下降更加明显(均 $P < 0.05$)。表明体外脓毒症状态下产生的 LDN 存在趋化能力明显下降。

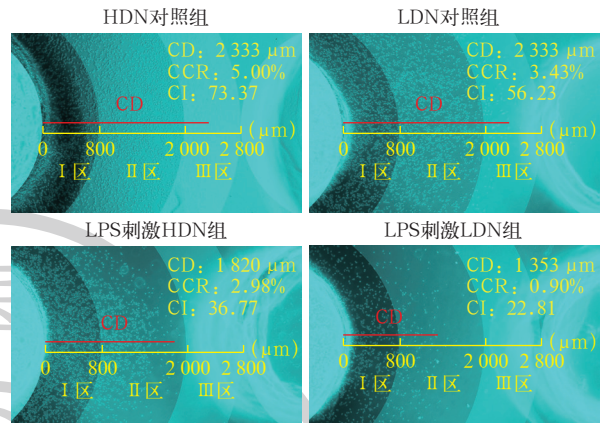


图 8 各组健康志愿者外周血不同类型中性粒细胞趋化改变 高密度中性粒细胞(HDN)对照组与低密度中性粒细胞(LDN)对照组细胞趋化能力无明显差异;脂多糖(LPS)刺激后,HDN 和 LDN 趋化能力均下降,其中 LDN 较 HDN 下降更加明显 CD 为趋化距离(I 区: $CD < 800 \mu\text{m}$; II 区: $800 \mu\text{m} \leq CD \leq 2 000 \mu\text{m}$; III 区: $CD > 2 000 \mu\text{m}$), CCR 为趋化细胞比例, CI 为趋化指数

3 讨论

LDN 已经在多种炎症性疾病中被描述,且显示出疾病特异性表型,但在脓毒症中情况的相关研究甚少。本研究表明,脓毒症患者外周血中存在大量的 LDN,细胞形态学和表型分析发现 LDN 是未成熟与成熟中性粒细胞的混合体。众所周知,在严重感染状态下,骨髓释放大量的功能异常的不成熟中性粒细胞,对混合细胞群进行功能检测并不能准确反映脓毒症状态下生成 LDN 的免疫特性。为了评估是否可以从 HDN 直接诱导为 LDN,本研究通过 LPS 刺激正常中性粒细胞模拟脓毒症环境,然后采用 Percoll 梯度离心分离发现,HDN 分离到 LDN 层,提示脓毒症时中性粒细胞受到炎症刺激可能是 LDN 比例增加的重要驱动力。

关于 LDN 来源,目前研究表明,在炎症状态下,体液激活因子作用于中性粒细胞,循环中产生 LDN;在肿瘤状态下,同样存在 HDN 向 LDN 转化的可塑性^[13]。Sagiv 等^[14]研究发现,荷瘤小鼠体内,在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的作用下,LDN 由成熟 HDN 转化而来。NET 的形成是中性粒细胞介导组织损伤的重要机制。NET 通过释放染色质骨架和颗粒蛋白组成的网状结构捕获病原体,但其过度释放可导致内皮损伤、微血栓形成和炎症级联放大^[15-16]。既往研究表明,NET 形成在脓毒症中发挥重要作用^[17]。本研究表明,LPS 刺激中性粒细胞后可促进 LDN 生成及 NET 释放;NET 释放抑制剂 GSK484 在体外可抑制 LDN 生成,说明 NET 的形成不仅是 LDN 的效应结果,也可能是其生成的必要条件。

目前关于脓毒症时 LDN 功能及表型的研究甚少。本研究显示,HDN 对照组中性粒细胞膜完整,细胞核形态表现为正常成熟、分叶的表型,而 LPS 刺激后细胞膜出现褶皱和凸起,与前期一项研究结果相似^[18]。LDN 胞内空泡数量增多,核分叶增加,染色质疏松表现,这可能是 LDN 亚群获得低密度特性的重要原因。除物理性质、浮力和核形态外,细胞表面标志物的表达和细胞功能对于评价 LDN 群体也至关重要。用于鉴别 LDN 的标志物在各项研究、疾病组之间存在差异,甚至经常出现相互矛盾的现象,目前尚无单一的特异性标志物可区分 LDN 与 HDN,同时很少有研究使用健康志愿者 LDN 作为对照组。Blanco-Camarillo 等^[19]为了确认 LDN 在健康人血液中的存在并探索其部分细胞功能,通过密度梯度离

心法分离中性粒细胞和单个核细胞,在单个核细胞层中 LDN 被发现具有正常成熟中性粒细胞形态,并显示出 CD10⁺、CD11b⁺、CD14^{low}、CD15^{high}、CD16b^{high}、CD62L⁺、CD66b⁺ 和 CXCR4⁺ 表型,这些数据证实了健康个体血液中存在少量成熟 LDN。人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染患者 LDN 表达 CD15、CD33、CD66b 水平升高,表达 CD62L、CD80、CD114、CXCR4 水平则降低^[20-21]。系统性红斑狼疮相关研究表明,LDN 表面 CD63、Arg-1、CD195、CD274 表达增加^[22]。本研究中通过标记从健康供体中性粒细胞 LPS 刺激前后分离的 LDN 和 HDN,试图确定 LDN 的关键标志物,从而应用于识别这些中性粒细胞,如后续检测临床样本时无需密度梯度离心。首先,本研究根据前期发表的研究结果^[18]测量了粒细胞成熟标志物的表达,发现与 HDN 相比,LPS 刺激后 LDN 表面 CD66b 表达增加,CD16 表达下降,CD15 无明显变化。在趋化因子受体方面,正常外周循环中性粒细胞的特点是高表达 CXCR2 和低表达 CXCR4,这有利于其浸润到炎症部位。本研究显示,与 LPS 刺激 HDN 组相比,LPS 刺激 LDN 组 CXCR2 表达下降,CXCR4 表达则升高,这可能与 LDN 亚群趋化功能下降相关,同时表明 LDN 可能处于细胞老化阶段。在细胞活化相关表型方面,本研究中发现 LPS 刺激 LDN 组 CD11b 表达升高,CD62L 表达下降。CD62L 又称白细胞内皮细胞黏附分子,PMA、细胞因子或趋化剂刺激中性粒细胞后,由于蛋白酶的酶解作用使 CD62L 迅速消失,而使血浆中有很高水平的可溶性 CD62L,CD62^{low} 是 PMN 衰老或免疫抑制相关表型^[23]。

关于 LDN 功能,目前已在多种疾病模型中被研究。既往有研究者发现,HDN 在乙醇诱导 NET 释放后变成 LDN^[14]。转录组学分析显示,HDN 与 LDN 具有相反的表型,与酒精性肝炎 HDN 相比,参与中性粒细胞免疫应答的大多数基因在酒精性肝炎 LDN 中显著减少;与活化的 HDN 相比,LDN 显示出功能缺陷的表型^[24]。研究显示,HDN 可提供抗肿瘤保护作用,LDN 则具有免疫抑制作用从而对肿瘤失去控制,因此 HDN 和 LDN 的比例决定了中性粒细胞在肿瘤抑制及发展中的贡献^[14]。同时,另一项肿瘤相关研究揭露了 LDN 的免疫抑制机制,即 LDN 表现出较低的凋亡、趋化性和细胞因子分泌^[9]。有文献报道,胃癌术后腹腔内 CD66b⁺ LDN 数量明显升高,这些 LDN 容易形成 NET,并选择性附着在癌细胞上,

这些 NET 可以协助腹部游离肿瘤细胞的聚集和生长^[25]。本研究表明,脓毒症时 LDN 存在免疫学功能缺陷,表现为趋化功能明显下降。中性粒细胞从外周血被招募后到达组织内的病原感染部位需经过迁移和趋化两个步骤。脓毒症时,在多种细菌毒素及细胞因子的刺激下,中性粒细胞趋化方向性受损,导致到达病原感染部位的中性粒细胞数量减少,重要器官中性粒细胞浸润增加,这是脓症患者免疫功能紊乱的重要原因之一。这意味着脓毒症时 LDN 向感染病灶迁移及杀菌能力下降,并可能在外周循环中停留更长时间。

综上所述,本研究揭示脓毒症时 LDN 数量明显增加,LPS 通过 NET 形成依赖性途径驱动 LDN 的生成,该细胞亚群表现为表面凸起及胞内空泡数量增多、细胞表型改变、趋化受体失调及趋化能力下降,突破了以往 LDN 单一密度分类的局限。因此,LDN 在脓症患者免疫失衡中可能发挥重要作用,或许可以作为脓毒症时机体免疫状态的有效评价指标及免疫治疗靶点。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孙燃: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 刘云峰: 酝酿和设计实验、实施研究、统计分析; 金航飞: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、行政、技术或材料支持; 温笑: 实施研究、采集数据、统计分析; 高晞、王逸凡: 实施研究、采集数据、行政、技术或材料支持、支持性贡献; 孙炳伟: 酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献

参考文献

[1] La Via L, Sangiorgio G, Stefani S, et al. The global burden of sepsis and septic shock[J]. *Epidemiologia (Basel)*, 2024, 5(3): 456–478. DOI: 10.3390/epidemiologia5030032.

[2] Torres LK, Pickkers P, van der Poll T. Sepsis-induced immunosuppression[J]. *Annu Rev Physiol*, 2022, 84: 157–181. DOI: 10.1146/annurev-physiol-061121-040214.

[3] 曾丽媛, 莫晓叶, 李小刚, 等. 脓毒症相关免疫抑制的研究进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2024, 31(3): 375–379. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.03.027.

[4] 陈赫赫, 石燕华, 应佳云, 等. 脂多糖诱导内皮细胞 O-GlcNAc 修饰参与炎症信号通路 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(2): 164–169. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220314-00242.

[5] Fu J, Tobin MC, Thomas LL. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014, 113(6): 635–640. e2. DOI: 10.1016/j.anai.2014.08.024.

[6] Hacharth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever[J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(11): 1334–1342. DOI: 10.1002/art.1780291105.

[7] Parackova Z, Zentsova I, Bloomfield M, et al. Expanded population of low-density neutrophils in juvenile idiopathic arthritis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1229520. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1229520.

[8] Kumagai Y, Ohzawa H, Miyato H, et al. Surgical stress increases circulating low-density neutrophils which may promote tumor

recurrence[J]. *J Surg Res*, 2020, 246: 52–61. DOI: 10.1016/j.jss.2019.08.022.

[9] Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(2): 311–317. DOI: 10.1189/jlb.0310162.

[10] Charoensappakit A, Sae-Khow K, Vutthikraivit N, et al. Immune suppressive activities of low-density neutrophils in sepsis and potential use as a novel biomarker of sepsis-induced immune suppression[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 9458. DOI: 10.1038/s41598-025-92417-7.

[11] Blanter M, Cambier S, De Bondt M, et al. Method matters: effect of purification technology on neutrophil phenotype and function[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 820058. DOI: 10.3389/fimmu.2022.820058.

[12] Yang YX, Liu L, Guo ZW, et al. Investigation and assessment of neutrophil dysfunction early after severe burn injury[J]. *Burns*, 2021, 47(8): 1851–1862. DOI: 10.1016/j.burns.2021.02.004.

[13] Saraiva DP, Correia BF, Salvador R, et al. Circulating low density neutrophils of breast cancer patients are associated with their worse prognosis due to the impairment of T cell responses[J]. *Oncotarget*, 2021, 12(24): 2388–2403. DOI: 10.18632/oncotarget.28135.

[14] Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(4): 562–573. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.12.039.

[15] Silva CMS, Wanderley CWS, Veras FP, et al. Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation[J]. *Blood*, 2021, 138(25): 2702–2713. DOI: 10.1182/blood.2021011525.

[16] Scozzi D, Liao FY, Krupnick AS, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 953195. DOI: 10.3389/fimmu.2022.953195.

[17] 陈雨薇, 陈微微, 陈影, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在脓毒症相关性凝血功能障碍中的作用研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34(2): 198–201. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210221-00264.

[18] Hardisty GR, Llanwarne F, Minns D, et al. High purity isolation of low density neutrophils casts doubt on their exceptionality in health and disease[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 625922. DOI: 10.3389/fimmu.2021.625922.

[19] Blanco-Camarillo C, Alemán OR, Rosales C. Low-density neutrophils in healthy individuals display a mature primed phenotype[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 672520. DOI: 10.3389/fimmu.2021.672520. Erratum in: *Front Immunol*, 2024, 15: 1477117. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1477117.

[20] Cloke T, Munder M, Bergin P, et al. Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72034. DOI: 10.1371/journal.pone.0072034.

[21] Marsile-Medun S, Souchard M, Abba Moussa D, et al. Fc receptors are key discriminatory markers of granulocytes subsets in people living with HIV-1[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1345422. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1345422.

[22] Rahman S, Sagar D, Hanna RN, et al. Low-density granulocytes activate T cells and demonstrate a non-suppressive role in systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(7): 957–966. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-214620.

[23] Stockfelt M, Christenson K, Andersson A, et al. Increased CD11b and decreased CD62L in blood and airway neutrophils from long-term smokers with and without COPD[J]. *J Innate Immun*, 2020, 12(6): 480–489. DOI: 10.1159/000509715. Erratum in: *J Innate Immun*, 2021, 13(2): 127. DOI: 10.1159/000514165.

[24] Cho Y, Bukong TN, Tornai D, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to liver damage and increase defective low-density neutrophils in alcohol-associated hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2023, 78(1): 28–44. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.08.029.

[25] Li YJ, Li HY, Wang H, et al. The proportion, origin and pro-inflammation roles of low density neutrophils in SFTS disease[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 109. DOI: 10.1186/s12879-019-3701-4.

(收稿日期: 2025-08-01)

(本文编辑: 孙茜)