

# JAK1/2抑制剂芦可替尼对中性粒细胞生存及免疫功能的影响

姜珊 孙露 张诗悦 王彤 许元富\*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 北京协和医学院, 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

**摘要** 芦可替尼是一种免疫抑制剂, 最早被用于治疗骨髓纤维化相关疾病, 近期, 又被临床上用于抑制急性移植物抗宿主病、新型冠状病毒肺炎中的细胞因子风暴的发生。该文将深入探究芦可替尼对中性粒细胞存活及炎症因子分泌等免疫学功能的影响。研究中设溶剂对照组、0.1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理组、1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理组和5  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理组。Percoll法分离的小鼠骨髓中性粒细胞, 经芦可替尼处理0 h、24 h、48 h、72 h后通过流式细胞术分析小鼠骨髓中性粒细胞纯度及凋亡情况; 经芦可替尼处理1 h后, 通过免疫荧光法检测中性粒细胞吞噬酵母聚糖颗粒的能力, TAXIScan-FL趋化仪检测中性粒细胞趋向fMLP的迁移能力, 涂布平板法检测中性粒细胞杀伤大肠杆菌的能力; 经芦可替尼处理24 h后, ELISA、qPCR法检测经LPS(1  $\mu\text{g/mL}$ )预处理和活化的中性粒细胞产生细胞因子的能力。结果表明, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理中性粒细胞24 h后, 中性粒细胞的早期凋亡加速( $P<0.05$ ), 吞噬指数增强( $P<0.05$ ), 趋化能力和杀菌能力与对照组相比没有显著性差异。中性粒细胞经LPS(1  $\mu\text{g/mL}$ )刺激1 h后, 比较芦可替尼(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ )处理组与对照组的中性粒细胞中炎症因子的表达情况, 结果表明TNF- $\alpha$ 、IL-6表达水平显著升高( $P<0.05$ )。该文阐明了芦可替尼一方面可以加速中性粒细胞的早期凋亡, 另一方面又能促进中性粒细胞中TNF- $\alpha$ 和IL-6等炎症因子的释放。该研究揭示了JAK1/2抑制剂芦可替尼不能抑制中性粒细胞中主要炎症因子的产生, 并为今后芦可替尼治疗患者后的预后分析提供了理论和实验依据, 同时也丰富了临床治疗细胞因子风暴的靶点和策略。

**关键词** 中性粒细胞; 芦可替尼; 凋亡; 炎症因子

## Effects of JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib on the Survival and Immune Function of Neutrophils

JIANG Shan, SUN Lu, ZHANG Shiyue, WANG Tong, XU Yuanfu\*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

**Abstract** Ruxolitinib is an immunosuppressant, which has been used to treat myelofibrosis-related diseases. Recently, it has been clinically used to inhibit the occurrence of cytokine storm in acute GVHD (graft-versus-host

收稿日期: 2022-01-03 接受日期: 2022-01-24

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-12M-1-017)、国家自然科学基金(批准号: 81970107)和天津市“131”创新团队基金(2021)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: January 3, 2022 Accepted: January 24, 2022

This work was supported by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2021-12M-1-017), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107), and Tianjin 131 Training Foundation for the innovative talents (2021)

\*Corresponding author. Tel: +86-13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

disease) and COVID-19. This article aimed to investigate the effects of Ruxolitinib on immunological functions such as neutrophil survival and inflammatory factor secretion. In this study, vehicle control group, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib-treatment group, 1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib-treatment group and 5  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib-treatment group were set up. Mouse bone marrow neutrophils isolated by Percoll method were analyzed for bone marrow neutrophil purity and apoptosis by flow cytometry after treatment with Ruxolitinib for 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h. After treatment with Ruxolitinib for 1 h, neutrophils were detected by immunofluorescence for the ability to phagocytose zymosan bioparticles, TAXIScan-FL chemokine for the migration ability of neutrophils towards fMLP, and coating plate method for the ability of neutrophils to kill *E. coli*. After treatment with Ruxolitinib for 24 h, the ability of neutrophils pretreated and activated by LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) to produce cytokines was detected by ELISA and qPCR. The results showed that treatment with 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , and 5  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib for 24 h could accelerate the early apoptosis of neutrophils ( $P < 0.05$ ), and enhance the phagocytic index ( $P < 0.05$ ). There was no significant differences in chemotaxis ability and bactericidal ability compared with the control group. The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly increased in neutrophils treated with Ruxolitinib (0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ ) after 1 h stimulation with 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS ( $P < 0.05$ ). This article mainly demonstrated that Ruxolitinib could accelerate the early apoptosis of neutrophils, and promote the release of inflammatory factors such as TNF- $\alpha$  and IL-6 in neutrophils. This study revealed that the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib could not inhibit the production of major inflammatory factors in neutrophils, and provided theoretical and experimental basis for the prognostic analysis of patients treated with Ruxolitinib in the future, and also enriched the therapeutic targets and strategies for the clinical treatment of cytokine storm.

**Keywords** neutrophil; Ruxolitinib; apoptosis; inflammatory factors

细胞因子风暴指机体感染病原体后,巨噬细胞、NK细胞、中性粒细胞和T细胞等免疫细胞被激活并分泌过量的IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CD18和INF $\gamma$ 等细胞因子,进而导致组织损伤、器官衰竭甚至机体死亡。目前已在临床上使用的针对细胞因子风暴的药物主要包括环孢素A、阿那白滞素、JAK抑制剂等<sup>[1]</sup>。JAK抑制剂芦可替尼是近年来备受关注的一类广谱细胞因子抑制剂,其可以通过抑制JAK-STAT通路同时抑制多种免疫细胞产生的多种细胞因子,影响细胞凋亡、分化、细胞周期等多种生理和病理过程<sup>[2]</sup>。因此,JAK抑制剂芦可替尼对机体中不同免疫细胞的功能和寿命会产生什么影响,从而对细胞因子风暴有怎样的疗效或不良反应,已经成为该领域的研究热点之一。

第一代JAK抑制剂芦可替尼是JAK1和JAK2的选择性抑制剂,主要用于治疗骨髓纤维化(myelofibrosis, MF)、真性红细胞增多症、急性移植物抗宿主病、细胞因子风暴等疾病。应用芦可替尼治疗的患者脾脏体积显著减小、症状减轻且死亡率降低<sup>[3-4]</sup>。芦可替尼的作用机制是通过抑制JAK激酶活性,防止STAT激活和核易位,从而减少细胞因子的产生<sup>[5]</sup>。现已有研究证明芦可替尼抑制多种免疫细胞,包括巨噬细胞

细胞<sup>[6]</sup>、NK细胞<sup>[7]</sup>、T细胞<sup>[8]</sup>、DC细胞<sup>[9]</sup>等的活性和功能,从而抑制多种细胞因子的产生。然而,我们在前期研究中发现,在炎症小鼠体内发生细胞因子风暴的过程中,芦可替尼会导致小鼠血清中TNF- $\alpha$ 表达水平升高。除上述芦可替尼作用的免疫细胞外,中性粒细胞也是机体在炎症反应中产生炎性细胞因子的主要免疫细胞之一<sup>[10]</sup>,芦可替尼对中性粒细胞中细胞因子的产生及其他功能有怎样的影响?在现有研究中,尚未有报道阐明。基于以上研究背景及我们的前期发现,本研究探讨了芦可替尼对中性粒细胞寿命及生物学功能的影响,为今后临床上制定和完善抑制细胞因子风暴发生发展的治疗方案提供理论和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8周龄的C57BL6-Ly5.2/CD45.2雌性小鼠饲养于中国医学科学院血液学研究所无特定病原体(SPF)动物房,标准动物饲料喂养,自由进食饮水。小鼠均购于北京华阜康实验动物技术有限公司。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(IHCAMS-DWLL-CIFMS2021004-1)。

## 1.2 中性粒细胞分离及实验分组

芦可替尼(美国辉瑞制药有限公司)使用75%葡萄糖和25% PEG300(Selleckchem公司, S6704)溶解,分别稀释至0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 。芦可替尼溶剂(75%葡萄糖和25% PEG300)作为对照组,其中芦可替尼浓度为0  $\mu\text{mol/L}$ 。取小鼠髌骨、股骨、胫骨,用1 mL注射器冲出骨髓细胞,过滤并重悬。经76%、62%、52%三种浓度的Percoll(GE公司)梯度离心30 min后,吸取76%与62% Percoll中的中性粒细胞层,用HBSS-EDTA-BSA(无 $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ 盐,0.5% BSA, 15 mmol/L EDTA)溶液洗涤1次,再使用Histopaque-1119(Sigma公司)溶液梯度离心30 min,去除红细胞,收集中性粒细胞,洗涤后用含1%双抗和10% FBS的Gibco RPMI-1640培养基重悬。中性粒细胞功能实验分为4组:中性粒细胞+芦可替尼溶剂组(Veh组)、中性粒细胞+0.1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼组(Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组)、中性粒细胞与1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼共培养组(Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组)、中性粒细胞与5  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼共培养组(Ruxo 5  $\mu\text{mol/L}$ 组)。将四组设置在同一块细胞培养板中,加入芦可替尼溶剂、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼、1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼、5  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼后,加入中性粒细胞悬液,浓度为 $5 \times 10^5$ 细胞/mL,放入细胞培养箱中培养。

## 1.3 中性粒细胞凋亡及形态检测

中性粒细胞经不同浓度芦可替尼(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ )或溶剂(溶剂作对照)处理后,在体外培养0 h、24 h、48 h、72 h。在四个时间点用APC-CD11b和APCcy7-Ly6G抗体(Biolegend公司)标记中性粒细胞,同时用FITC-Annexin V和PI抗体(Thermo Fisher Scientific公司)标记凋亡细胞。流式细胞仪检测Percoll法提取的中性粒细胞纯度及各个时间点的凋亡比例,瑞氏染色观察中性粒细胞形态。

## 1.4 中性粒细胞趋化实验

收集Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组和Veh组中性粒细胞,用10% FBS的RPMI-1640培养基重悬。将4 mL 10% FBS的RPMI-1640培养基加入提前组装好的260  $\mu\text{m}$ 宽 $\times$ 4  $\mu\text{m}$ 厚蚀刻硅片系统,放入TAXIScan小室中。Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组和Veh组分别取1  $\mu\text{L}$ 中性粒细胞悬液(浓度为 $1 \times 10^7$ 细胞/mL)加入硅片下孔,1  $\mu\text{L}$  fMLP刺激

剂(浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ )加入硅片上孔,每30 s连续捕捉中性粒细胞向fMLP的迁移情况,拍摄20 min。Tracing Tool™(Gradient-Tech)软件分析中性粒细胞迁移速度、方向性和伪足形成能力。

## 1.5 中性粒细胞吞噬实验

Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组和Veh组分别取 $2 \times 10^5$ 个中性粒细胞,离心后用含10% FBS的PBS重悬,标记CD11b-APC抗体(Biolegend公司)。将血清预调理的酵母聚糖颗粒(每组 $1 \times 10^6$ 个)与中性粒细胞以5:1的比例混合,重悬于转盘式共聚焦显微镜专用细胞培养皿(NEST Scientific公司)中,孵育30 min后使用转盘式激光共聚焦显微镜拍摄中性粒细胞吞噬酵母聚糖颗粒图片,统计中性粒细胞的吞噬细胞百分比(有吞噬功能的中性粒细胞数量/中性粒细胞总数)和吞噬指数(酵母聚糖颗粒被吞噬的总数/有吞噬功能的中性粒细胞数量),每组统计至少100个中性粒细胞。

## 1.6 中性粒细胞杀伤大肠杆菌实验

Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组和Veh组分别取 $1 \times 10^5$ 个中性粒细胞,将血清预调理的大肠杆菌(ATCC 19138)与各组中性粒细胞以5:1的比例混合,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养1 h,离心后取上清,将上清稀释1 000倍和10 000倍,再分别取100  $\mu\text{L}$ 涂布于LB平板上,37  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜,计算每个平板上细菌菌落数量(colony forming units, CFUs)。

## 1.7 细胞因子检测

使用1  $\mu\text{g/mL}$  LPS或生理盐水(Veh组)刺激新鲜分离的中性粒细胞,1 h后分别加入溶剂对照(LPS+Veh组)、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼(LPS+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组)、1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼(LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组)。LEGEND MAX™ Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit(430907)检测细胞上清中TNF- $\alpha$ 含量,按ELISA Kit说明书操作。以试剂盒中标准品浓度为横坐标,以 $D$ 值为纵坐标,绘制标准曲线。根据样本 $D$ 值可在标准曲线上计算其浓度。

## 1.8 qPCR检测

使用Picopure RNA分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific, KIT0204)从小鼠骨髓中性粒细胞中分离RNA。采用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad, 1708891)合成cDNA,采用SYBR Green定量qPCR试剂盒(Bio-Rad, 1708880)进行定量qPCR。qPCR检测*IL-6*和*TNF- $\alpha$* 的表达水平,*IL-6*的上游引物为:5'-TAC CAC TTC ACA AGT CGG AGG C-3';*IL-6*的下游引

物为: 5'-CTG CAA GTG CAT CAT CGT TGT TC-3'; *TNF- $\alpha$* 的上游引物为: 5'-GGT GCC TAT GTC TCA GCC TCT T-3'; *TNF- $\alpha$* 的下游引物为: 5'-GCC ATA GAA CTG ATG AGA GGG AG-3'; *IL-1 $\alpha$* 的上游引物为: 5'-ACG GCT GAG TTT CAG TGA GAC C-3'; *IL-1 $\alpha$* 的下游引物为: 5'-CAC TCT GGT AGG TGT AAG GTG C-3'; *IL-1 $\beta$* 的上游引物为: 5'-TGG ACC TTC CAG GAT GAG GAC A-3'; *IL-1 $\beta$* 的下游引物为: 5'-GTT CAT CTC GGA GCC TGT AGT G-3'。

## 1.9 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 8 版本进行统计学分析, 用未配对 Student *t* 检验进行统计学差异分析,  $P < 0.05$  为有统计学差异 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

## 2 结果

### 2.1 芦可替尼加快中性粒细胞的自发凋亡

Percoll法分离的小鼠骨髓中性粒细胞经瑞士吉姆萨染色和流式细胞术检测, 结果显示新鲜分离的中性粒细胞纯度为95%, 存活率为95%(图1A), 瑞氏吉姆萨染色显示其胞质呈淡红色, 胞质内有弥散分布的紫色颗粒, 胞核为深紫色(图1B)。用不同浓度(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ )的芦可替尼处理新鲜分离的中性粒细胞, 每孔  $2 \times 10^5$  个中性粒细胞, 实验对照组为芦可替尼溶剂处理的中性粒细胞。在共培养的第0 h、24 h、48 h、72 h 时分别收集不同组别的中性粒细胞, 经 Annexin V-FITC 和 PI 抗体染色后, 流式分析中性粒细胞凋亡情况(图1C)。流式结果显示(图1D), 中性粒细胞与不同浓度(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ )的芦可替尼共培养24 h后, 存活率(57.7%、55.7%、54.8%)均低于实验对照组(61.5%), 具有显著性差异( $P < 0.05$ ), 早期凋亡率(14.7%、15.1%、17.1%)均高于实验对照组(12.33%), 具有显著性差异( $P < 0.05$ )。而在48 h和72 h后, 5  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理的中性粒细胞存活率(22.4%、15.5%)降低, 与实验对照组(27.4%、18.5%)相比, 具有显著性差异( $P < 0.05$ )。以上结果说明: 芦可替尼处理24 h会促进中性粒细胞进入早期凋亡( $P < 0.05$ ), 降低中性粒细胞的存活率; 芦可替尼处理48 h后, 只有较高浓度的芦可替尼(5  $\mu\text{mol/L}$ )会显著降低中性粒细胞的存活率( $P < 0.05$ )。

### 2.2 芦可替尼不影响中性粒细胞的趋化功能

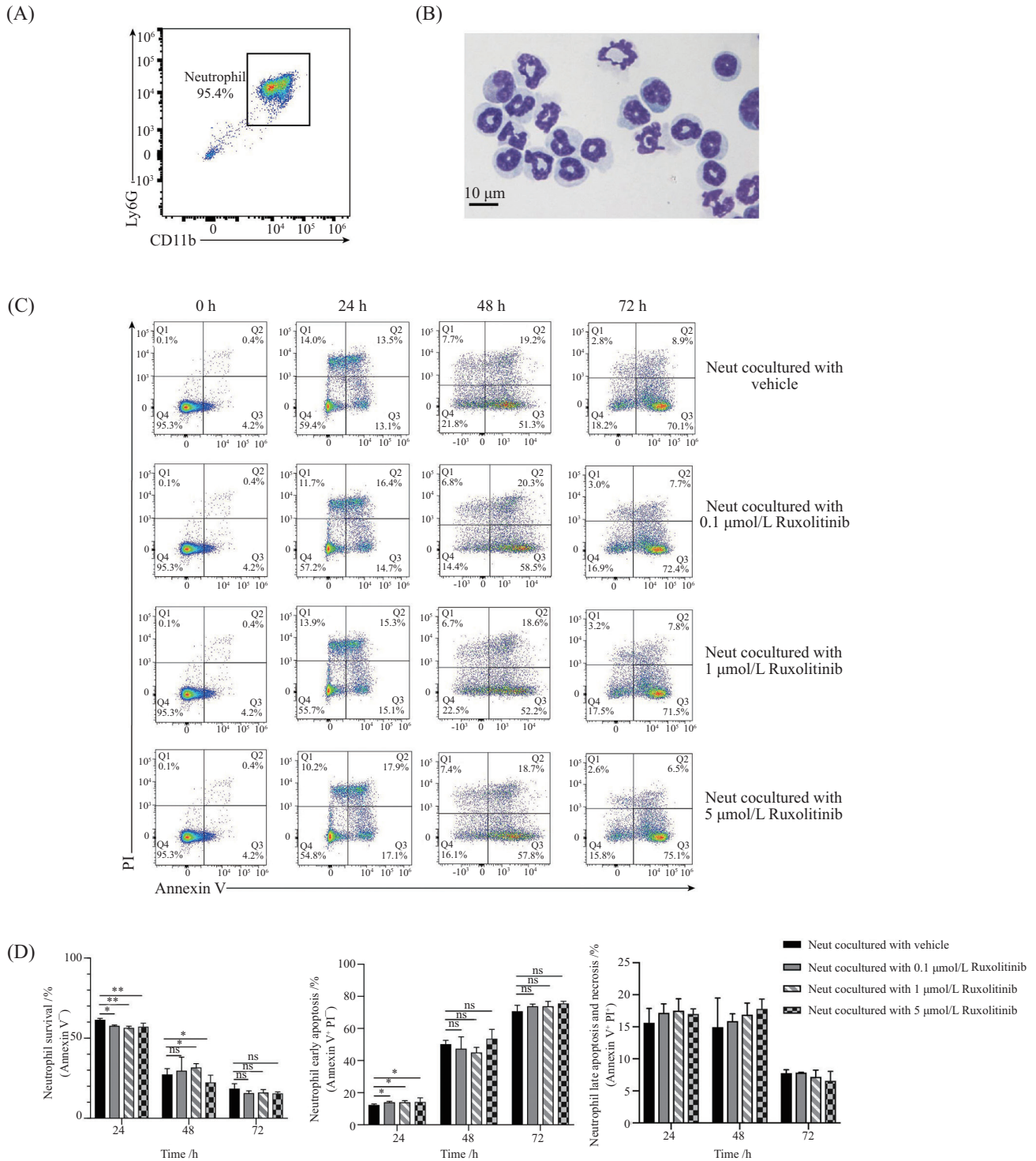
在机体受到病原体入侵后, 中性粒细胞上的 F-actin 聚集形成肌动蛋白, 促进其伸出多伪足<sup>[11]</sup>, 中性粒细胞通过在内皮细胞腔面滚动、黏附、跨内皮迁移、募集这个过程从外周血到达炎症部位<sup>[12]</sup>。

我们在体外模拟中性粒细胞趋化的过程, 新鲜分离的小鼠骨髓中性粒细胞经溶剂对照、0.1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼、1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理, 每孔  $1 \times 10^6$  个细胞。1 h后收集细胞, 通过使用 TAXIScan-FL 趋化检测仪检测各组中性粒细胞经趋化剂 fMLP 刺激后的趋化功能(图2A), 对连续拍摄的中性粒细胞趋化轨迹进行分析(图2B), 结果显示: 在 fMLP 刺激下, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼组(运动速度 12.65  $\mu\text{m/min}$ , 方向性 0.85)和 1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼组(运动速度 13.00  $\mu\text{m/min}$ , 方向性 0.86)的中性粒细胞具有和对照组(运动速度 12.63  $\mu\text{m/min}$ , 方向性 0.85)相同的运动速度(图2C)和方向性(图2D), 且表现出正常的多伪足运动形态(图2E)。结果表明, 中性粒细胞经芦可替尼处理后仍具有正常的趋化能力, 芦可替尼未对中性粒细胞的趋化功能产生影响。

### 2.3 芦可替尼增强中性粒细胞吞噬功能

在病原体侵入时, 中性粒细胞迁移到感染部位, 通过细胞表面吞噬相关受体, 如: TLR4、CD11b/CD18、Fc $\gamma$ RI 等识别病原体成分, 利用伪足包裹整个病原体, 从而吞噬病原体<sup>[13-14]</sup>。

我们将新鲜分离的小鼠骨髓中性粒细胞经溶剂对照、0.1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼、1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理, 每孔  $1 \times 10^6$  个细胞。1 h后收集细胞, 将各组中性粒细胞和调理后的酵母聚糖颗粒以 1:5 比例(中性粒细胞每孔  $1 \times 10^6$  个, 酵母聚糖颗粒每孔  $5 \times 10^6$  个)共孵育 30 min, 来模拟中性细胞吞噬过程(图3A)。我们研究发现, 中性粒细胞经 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理 1 h 后, 具有吞噬能力的中性粒细胞百分比(83.2%、89.5%)与 Veh 组(85.8%)相比没有显著性差异(图3B), 但 Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$  组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$  组中性粒细胞吞噬指数(平均每个中性粒细胞吞没 1.8、1.9 个酵母颗粒)明显高于 Veh 组(平均每个中性粒细胞吞没 1.3 个酵母颗粒), 具有显著性差异( $P < 0.05$ )(图3C)。除此之外, 我们在体外将中性粒细胞与血清调理作用的大肠杆菌共孵育, 进行中性粒细胞杀伤大肠杆菌功能实验(图3D)。结果显示: Veh 组、Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$  组和 Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$  组的中性粒细胞吞噬大肠杆菌后, 培养上清中剩余的细菌量分别为  $7.2 \times 10^5$  个、 $6.9 \times 10^5$  个、

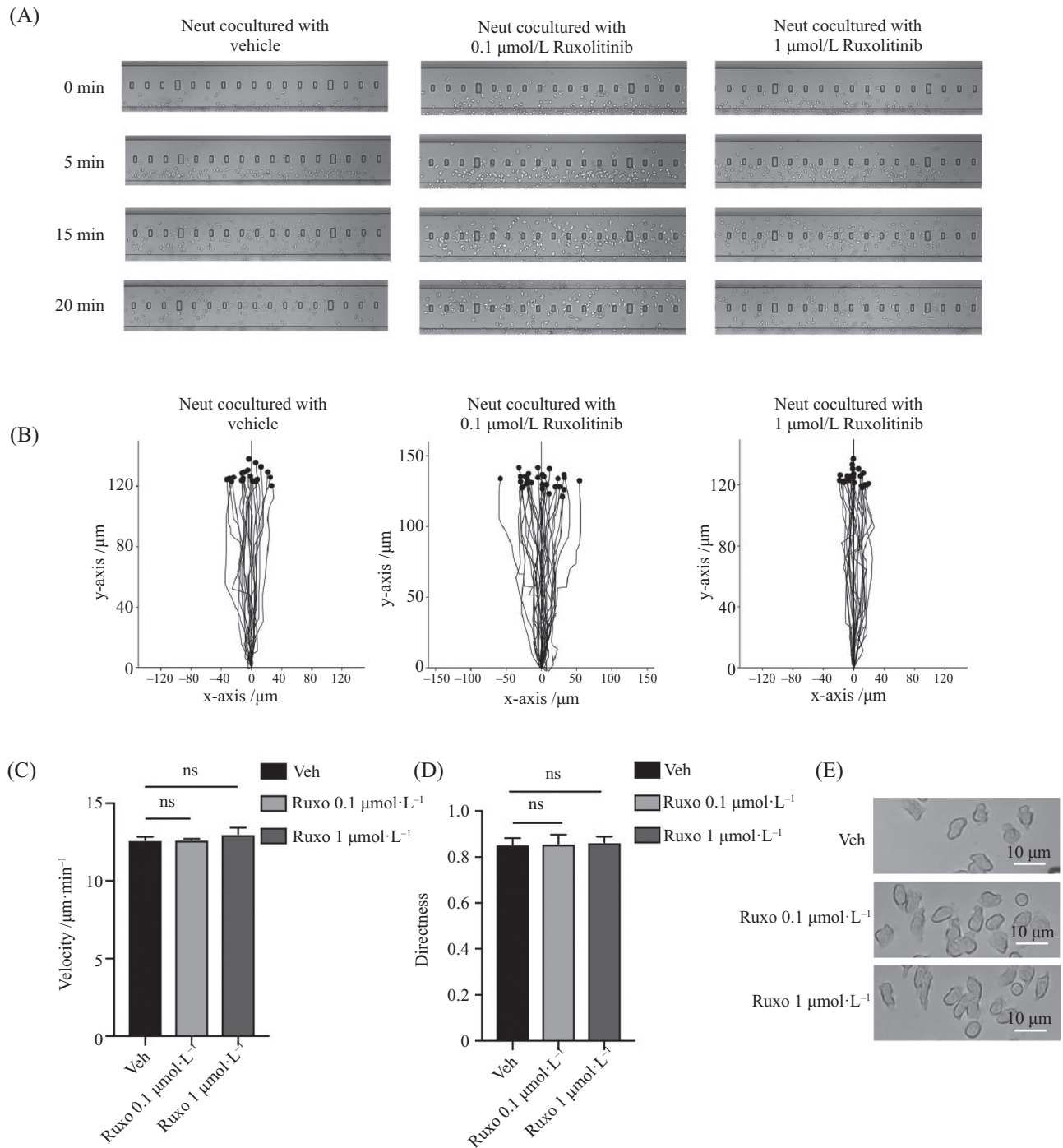


A: 中性粒细胞纯度; B: 中性粒细胞在光学显微镜下瑞氏染色形态; C: 经Veh、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理 1 h 后的中性粒细胞凋亡流式图; D: 经Veh、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  芦可替尼处理 1 h 后的中性粒细胞存活率、早期凋亡率及晚期凋亡/坏死率。ns, 无统计学差异; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: purity of neutrophils; B: Wright staining morphology of neutrophils under light microscope; C: flow cytometry of neutrophil apoptosis after treatment with Veh, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib for 1 h; D: neutrophil survival rate, early apoptosis rate and late apoptosis/necrosis rate after treatment with Veh, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  Ruxolitinib for 1 h. ns, no statistical difference; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图1 芦可替尼对中性粒细胞自发凋亡的影响

Fig.1 Effect of Ruxolitinib on neutrophil apoptosis



A: Veh组、Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组的中性粒细胞趋向fMLP的过程; B: 中性粒细胞趋化轨迹分析; C: 中性粒细胞趋化速度分析; D: 中性粒细胞趋化方向性分析; E: 中性粒细胞多伪足的形成。ns, 无统计学差异。

A: the trending process of neutrophils in the Veh group, Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group, and Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$  group toward fMLP; B: neutrophil chemotaxis trajectory analysis; C: neutrophil chemotaxis velocity analysis; D: neutrophils analysis of the directionality of cell chemotaxis; E: the formation of pseudopodia in neutrophils. ns, no statistical difference.

图2 芦可替尼对中性粒细胞趋化运动的影响

Fig.2 Effect of Ruxolitinib on neutrophil chemotaxis

$6.4 \times 10^5$ 个, 没有显著性差异(图3E)。说明芦可替尼对中性粒细胞杀伤细菌功能没有显著影响。以上结果表明: 芦可替尼会促进中性粒细胞的吞噬作用, 而

对其杀伤细菌功能没有较大影响。

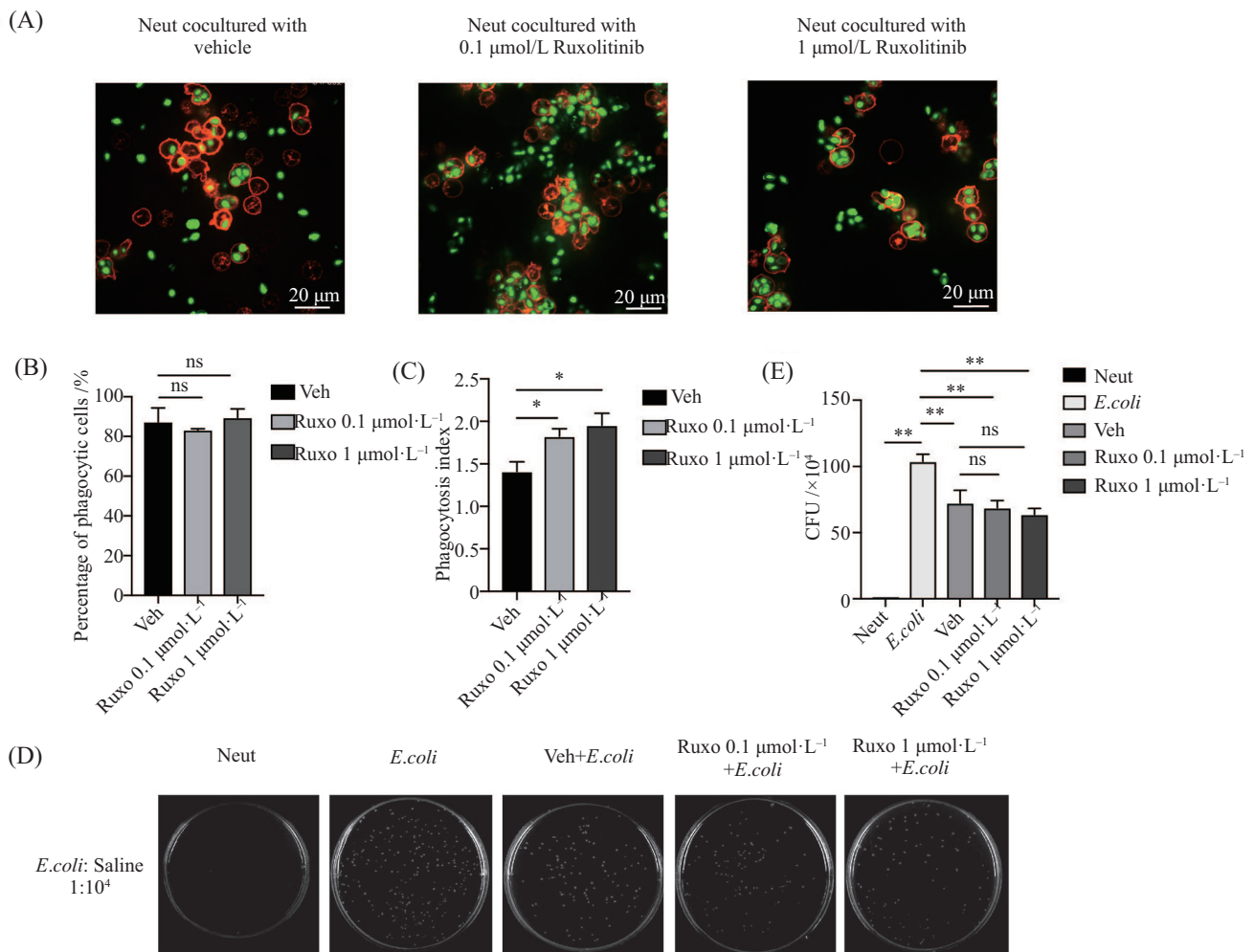
#### 2.4 芦可替尼促进中性粒细胞产生炎症因子

中性粒细胞是炎症反应和细胞因子风暴中重

要的免疫细胞, 在炎症疾病中会分泌炎症因子, 抵御病原体并调节天然免疫和适应性免疫。而当其过度活跃或受到异常刺激时, 它们可能会导致组织损伤并加剧疾病反应<sup>[15]</sup>。我们利用芦可替尼处理LPS预刺激的中性粒细胞, 探索芦可替尼对炎症条件下中性粒细胞分泌细胞因子能力的影响。

我们的实验结果表明, LPS处理新鲜的中性粒细胞1 h后, 与溶剂对照组相比其可以显著促进中性粒细胞分泌炎症细胞因子( $P<0.01$ ), 其中经1  $\mu\text{g/mL}$ 的LPS处理后的中性粒细胞与其他浓度LPS处理后的中性粒细胞相比, 其可分泌更多的炎症细胞因子( $P<0.05$ )

(图4A)。1  $\mu\text{g/mL}$  LPS预刺激性粒细胞1 h后, 分别加入0.1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼、1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼, 对照组加入芦可替尼溶剂, 在24 h后拍摄光镜照片(100 $\times$ ), 收集培养上清检测细胞因子, 收集细胞提取RNA。结果显示: 光学显微镜(100 $\times$ )下观察到芦可替尼组和对照组的中性粒细胞均变暗, 没有显著差异(图4B)。对细胞的培养上清中细胞因子进行检测, 发现0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组和1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组的上清液中TNF- $\alpha$ 表达水平(1 177.67 pg/mL、2 999.69 pg/mL)明显高于实验对照组(811.015 pg/mL)(图4C), 具有显著性差异( $P<0.05$ )。针对细胞因子风暴中重要的促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、

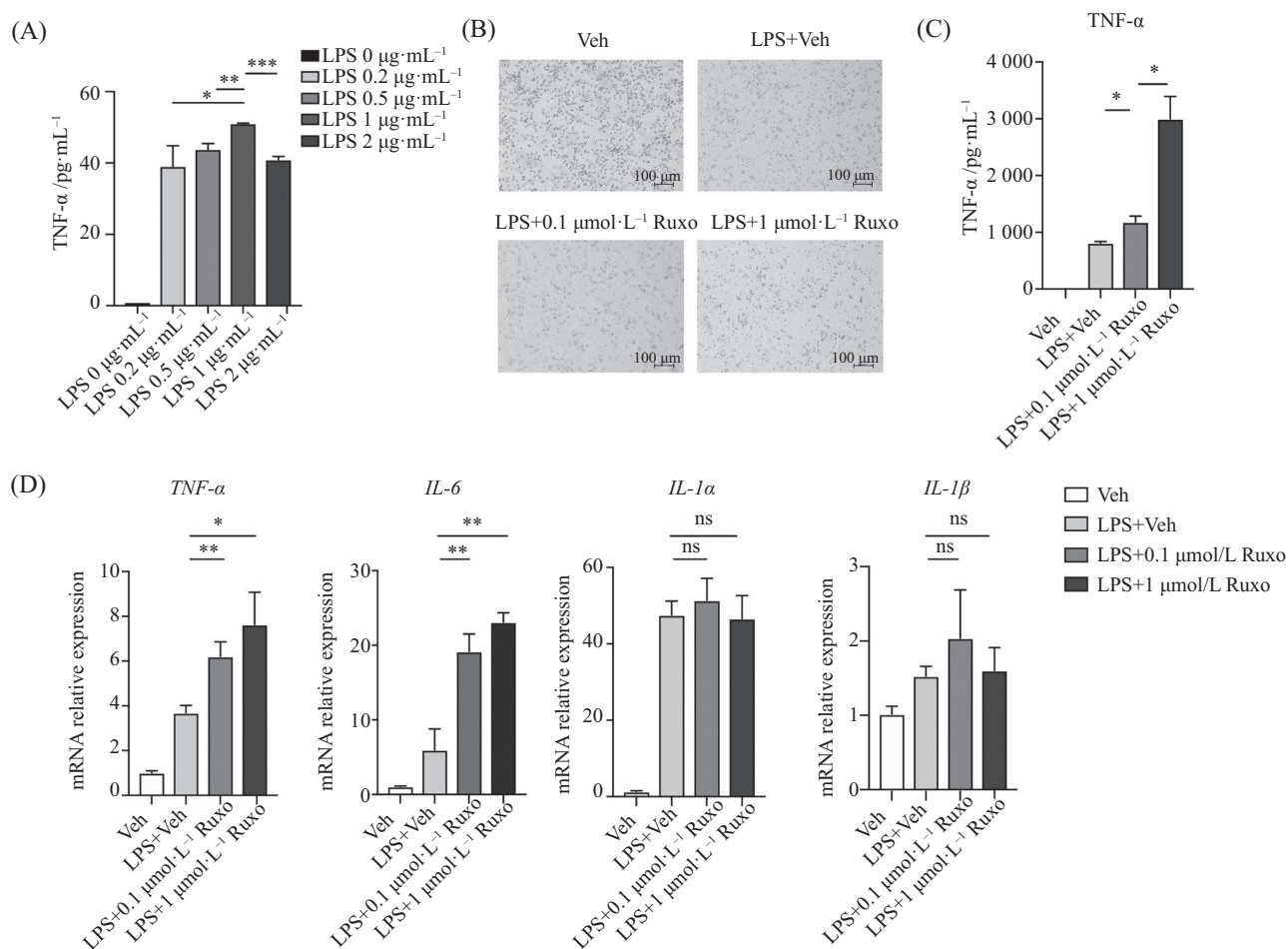


A: Veh组、Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组中性粒细胞吞噬酵母聚糖颗粒荧光图片; B: 发生吞噬的中性粒细胞占比; C: 中性粒细胞吞噬指数; D: Veh组、Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组、Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$ 组中性粒细胞杀伤细菌后细胞裂解液中的细菌生长情况; E: 细胞裂解产物涂布培养后CFUs数量统计。ns, 无统计学差异; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

A: fluorescence pictures of neutrophils phagocytosing zymosan particles in Veh group, Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group and Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$  group; B: percentage of phagocytic neutrophils; C: phagocytic index of neutrophils; D: bacterial growth of cell lysis after killing bacteria by neutrophils in Veh group, Ruxo 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group and Ruxo 1  $\mu\text{mol/L}$  group; E: the number of CFUs after coating culture of cell lysis products. ns, no statistical difference; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图3 芦可替尼对中性粒细胞吞噬、杀伤功能的影响

Fig.3 The effect of ruxolitinib on the phagocytosis and killing function of neutrophils



A: 不同浓度LPS对中性粒细胞产生TNF- $\alpha$ 浓度的影响; B: 芦可替尼处理24 h经LPS预刺激的中性粒细胞光学显微镜下形态; C: ELISA分析Veh组、LPS组、LPS+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组、LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组中性粒细胞中炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 表达水平; D: 转录水平分析Veh组、LPS组、LPS+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组、LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo组中性粒细胞中炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6表达情况。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

A: the effect of different concentrations of LPS on the concentration of TNF- $\alpha$  produced by neutrophils; B: the light microscopic morphology of neutrophils pre-stimulated by LPS treated with Ruxolitinib for 24 h; C: ELISA analysis of the expression level of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in neutrophils in the Veh group, LPS group, LPS+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo group, and LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo group; D: transcription level analysis of the expression of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in neutrophils in the Veh group, LPS group, LPS+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo group, and LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Ruxo group. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

图4 芦可替尼对活化的中性粒细胞产生细胞因子能力的影响

Fig.4 Effect of Ruxolitinib on the cytokine production ability of activated neutrophils

IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ，我们利用qPCR通过基因转录水平进行分析(图4D)。结果表明，与1  $\mu\text{mol/L}$ 芦可替尼共培养的中性粒细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6转录水平明显高于实验对照组( $P$ <0.05)，而IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 没有显著差异。结果表明：芦可替尼可以显著促进被LPS活化的中性粒细胞产生TNF- $\alpha$ 和IL-6炎症因子。

### 3 讨论

众所周知，中性粒细胞是细菌感染的主要反应细胞之一，它是先天免疫系统抵御外源病原体入侵的第一道防线。当存在病原体时，中性粒细胞通过

天然免疫细胞释放的组胺、半胱氨酰白三烯和细胞因子等介质的刺激发生活化，并经历栓系、滚动、黏附、爬行和移行募集到炎症部位<sup>[16]</sup>。中性粒细胞作为重要的免疫细胞，参与多种炎症反应，如细胞因子风暴、系统性炎症反应综合征、脓毒症等。

芦可替尼最早被用于治疗骨髓纤维化、真红细胞增多症<sup>[17]</sup>，近几年来，芦可替尼作为免疫抑制剂，也用于抑制急性移植抗宿主病<sup>[18]</sup>、新型冠状病毒肺炎中的细胞因子风暴<sup>[19]</sup>。它对多种免疫细胞的功能和数量都有影响，芦可替尼对于免疫细胞的影响具有两面性，它对多种免疫细胞的正向机制和负向机制



都会影响其对细胞因子风暴的抑制作用: (1) 通过阻断STAT5磷酸化, 导致NK细胞成熟受损、杀伤活性降低, 进而减少NK细胞的数量<sup>[20]</sup>; (2) 芦可替尼对树突状细胞也有生物学效应, 它会影响DC细胞分化、组织迁移和功能, 导致异基因或抗原特异性T细胞反应的诱导受损<sup>[21]</sup>; (3) 对于免疫抑制剂的重要靶向细胞——T细胞, 芦可替尼会不可逆地减少CD3<sup>+</sup>T细胞、Th1、Th17、Treg细胞数量, 且会降低T细胞分泌细胞因子水平<sup>[8,22-23]</sup>。我们近期研究发现, 芦可替尼对脓毒症也有一定的作用。脓毒症是由宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍, 可产生严重的细胞因子风暴, 进而导致组织损伤、器官衰竭甚至机体死亡<sup>[24]</sup>。近期的一些研究也提示中性粒细胞会产生大量促炎细胞因子, 释放蛋白酶和活性氧, 进而促进细胞因子风暴的产生。但芦可替尼对中性粒细胞的功能和寿命的影响尚不清楚。近几年的临床数据表明, 芦可替尼在治疗MF期间可能会增加患者的感染, 包括细菌感染、病毒感染和真菌感染几率, 其中细菌是最常见的病原体<sup>[25]</sup>。芦可替尼治疗引起的细菌感染是否与中性粒细胞的功能和机制的改变相关目前尚不清楚。探究芦可替尼对中性粒细胞功能和寿命的影响, 可以对芦可替尼抑制细胞因子风暴的过程有更加全面的认识。

基于以上研究背景, 我们将小鼠骨髓中性粒细胞与三个浓度梯度的芦可替尼共培养, 证明与芦可替尼共培养24 h可以促进中性粒细胞的早期凋亡。由于中性粒细胞的寿命较短(外周循环中半衰期8~20 h), 在共培养48 h后, 中性粒细胞均已进入凋亡时期。但需要注意的是, 与5 μmol/L芦可替尼共培养的中性粒细胞存活率显著低于其他实验组和对照组, 说明5 μmol/L芦可替尼对中性粒细胞的促凋亡作用较强。为了减弱芦可替尼对中性粒细胞寿命的影响, 我们在后续体外实验中选择0.1 μmol/L和1 μmol/L的芦可替尼作为实验组。

机体感染病原体后, 中性粒细胞趋化迁移至炎症部位, 通过吞噬、脱颗粒、释放ROS等方式杀伤病原体<sup>[26]</sup>。通过中性粒细胞功能实验, 我们发现经芦可替尼处理可以显著增强中性粒细胞的吞噬能力, 说明0.1 μmol/L和1 μmol/L芦可替尼可以诱导刺激中性粒细胞的活化。除此之外, 经芦可替尼处理后的中性粒细胞具有正常的趋化能力和杀伤细菌的能力。

有研究表明, 中性粒细胞分泌过量炎症细胞因子会增强其吞噬、趋化功能等活化效应, 进而发生细胞因子级联反应<sup>[27]</sup>。为进一步探究芦可替尼是否通过诱导中性粒细胞分泌过量炎症细胞因子增强其活化效应, 我们通过LPS诱导刺激中性粒细胞活化, 发现中性粒细胞经芦可替尼处理会产生更多TNF-α等促炎因子。qPCR检测发现, 中性粒细胞经芦可替尼处理后, 其TNF-α、IL-6的mRNA水平显著升高。我们认为, 芦可替尼通过阻断JAK-STAT信号通路, 导致中性粒细胞中TNF-α和IL-6表达水平升高, 放大中性粒细胞的活化效应, 最终增强其吞噬功能。然而, 过量的炎症细胞因子也会加速中性粒细胞的自发凋亡。

此外, 芦可替尼的COMFORT I试验、COMFORT-II试验和一些临床实践结果都表明经芦可替尼治疗的患者具有病毒易感性和细菌易感性<sup>[28-29]</sup>。一项回顾性研究表明, 使用芦可替尼(平均使用23.5个月)后, 20.67%的患者发生细菌感染<sup>[30]</sup>。而在过去的研究中, 对于芦可替尼导致的易感性都围绕在巨噬细胞、NK细胞、DC细胞, 我们的研究表明, 芦可替尼的易感性与中性粒细胞的死亡和功能改变相关, 过量的炎症因子在引起组织损伤的同时也会加速中性粒细胞死亡。芦可替尼COMFORT II试验的5年随访也证实, 经芦可替尼治疗后, 8.9%和6.3%的患者出现3级或4级中性粒细胞减少症或白细胞减少症<sup>[31]</sup>。

综上所述, 我们研究了芦可替尼对中性粒细胞寿命及免疫学功能的影响, 发现芦可替尼会在炎症环境下促进TNF-α、IL-6等炎症因子的表达, 加速中性粒细胞的死亡。这一发现完善了芦可替尼对中性粒细胞的作用研究及其意义分析, 同时也提示临床在使用芦可替尼后会出现免疫细胞减少相关的病毒或细菌感染, 以及TNF-α、IL-6等炎症因子升高的现象, 需采取相应治疗方案, 减少后续发生更严重的临床不良副反应。

## 参考文献 (References)

- [1] FAJGENBAUM D C, JUNE C H. Cytokine storm [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255-73.
- [2] VILLARINO A V, KANNO Y, O'SHEA J J. Mechanisms and consequences of JAK-STAT signaling in the immune system [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(4): 374-84.
- [3] MESA R A, GOTLIB J, GUPTA V, et al. Effect of ruxolitinib

- therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(10): 1285-92.
- [4] BOSE P, MASAROVA L, VERSTOVSEK S. Novel concepts of treatment for patients with myelofibrosis and related neoplasms [J]. *Cancers*, 2020, 12(10): 2891.
- [5] VERSTOVSEK S, MESA R A, GOTLIB J, et al. Efficacy, safety and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 2-year follow-up of COMFORT-I [J]. *Haematologica*, 2013, 98(12): 1865-71.
- [6] GOKER BAGCA B, BIRAY AVCI C. The potential of JAK/STAT pathway inhibition by ruxolitinib in the treatment of COVID-19 [J]. *Cytokine Growth F R*, 2020, 54: 51-62.
- [7] VIAN L, LE M T, GAZANIGA N, et al. JAK inhibition differentially affects NK cell and ILC1 homeostasis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2972.
- [8] PARAMPALLI YAJNANARAYANA S, STÜBIG T, CORNEZ I, et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function *in vitro* and in patients with myeloproliferative neoplasms [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(6): 824-33.
- [9] HEINE A, HELD S A, DAECKE S N, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2013, 122(7): 1192-202.
- [10] CHAN L, KARIMI N, MOROVATI S, et al. The roles of neutrophils in cytokine storms [J]. *Viruses*, 2021, doi: 10.3390/v13112318.
- [11] DAVTYAN T K, AVETISYAN S A, HAKOBYAN G S. Neutrophil F-actin dynamics in familial mediterranean fever: the unequal effect of colchicine on activated neutrophils [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2013, 12(2): 165-72.
- [12] MALECH H L, DELEO F R, QUINN M T. The role of neutrophils in the immune system: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2087: 3-10.
- [13] CHEN M L, WU S, TSAI T C, et al. Regulation of neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by antipsychotic drugs [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 550-7.
- [14] URBACZEK A C, TOLLER-KAWAHISA J E, FONSECA L M, et al. Influence of FcγRIIb polymorphism on its ability to cooperate with FcγRIIa and CR3 in mediating the oxidative burst of human neutrophils [J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(8): 785-90.
- [15] LIEW P X, KUBES P. The Neutrophil's role during health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223-48.
- [16] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-75.
- [17] QUINTÁS-CARDAMA A, KANTARJIAN H, CORTES J, et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(2): 127-40.
- [18] ZEISER R, POLVERELLI N, RAM R, et al. Ruxolitinib for glucocorticoid-refractory chronic graft-versus-host disease [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(3): 228-38.
- [19] COVID-19 remedies [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(6): 575-6.
- [20] CURRAN S A, SHYER J A, ST ANGELO E T, et al. Human dendritic cells mitigate NK-cell dysfunction mediated by nonselective JAK1/2 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(1): 52-60.
- [21] RUDOLPH J, HEINE A, QUAST T, et al. The JAK inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell migration via off-target inhibition of ROCK [J]. *Leukemia*, 2016, 30(10): 2119-23.
- [22] MASSA M, ROSTI V, CAMPANELLI R, et al. Rapid and long-lasting decrease of T-regulatory cells in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 449-51.
- [23] KEOHANE C, KORDASTI S, SEIDL T, et al. JAK inhibition induces silencing of T Helper cytokine secretion and a profound reduction in T regulatory cells [J]. *Br J Haematol*, 2015, 171(1): 60-73.
- [24] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *Jama*, 2016, 315(8): 801-10.
- [25] LUSSANA F, CATTANEO M, RAMBALDI A, et al. Ruxolitinib-associated infections: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(3): 339-47.
- [26] ROSALES C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(1): 377-96.
- [27] COXON A, TANG T, MAYADAS T N. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis *in vitro* and *in vivo*. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(7): 923-34.
- [28] VERSTOVSEK S, MESA R A, GOTLIB J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(9): 799-807.
- [29] HARRISON C, KILADJIAN J J, AL-ALI H K, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(9): 787-98.
- [30] POLVERELLI N, PALUMBO G A, BINOTTO G, et al. Epidemiology, outcome, and risk factors for infectious complications in myelofibrosis patients receiving ruxolitinib: A multicenter study on 446 patients [J]. *Hematol Oncol*, 2018, doi: 10.1002/hon.2509.
- [31] HARRISON C N, VANNUCCHI A M, KILADJIAN J J, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis [J]. *Leukemia*, 2016, 30(8): 1701-7.