

论著·基础研究

钩端螺旋体 56606v 对小鼠中性粒细胞凋亡的影响

杜琳, 何平

上海交通大学医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025

[摘要] **目的**·探究钩端螺旋体 56606v 对小鼠中性粒细胞凋亡的影响及相关作用机制。**方法**·用钩端螺旋体 56606v 在感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 分别为 100、300、500 时感染小鼠中性粒细胞 0.5、6、12、24 h; 以未被感染的中性粒细胞为对照。将含有 4 $\mu\text{mol/L}$ 星形孢菌素 (Staurosporine, STS) 的等量细胞培养基处理的细胞作为凋亡阳性对照。采用流式细胞术检测细胞的凋亡情况; 采用 Western blotting 技术检测钩端螺旋体 56606v 感染小鼠中性粒细胞后 caspase-3 的切割情况和核因子 κB (NF- κB) 通路的激活情况, 并验证 NF- κB 抑制剂 BAY 11-7082 对 NF- κB 通路的抑制作用; 通过添加 NF- κB 抑制剂 BAY 11-7082, 进一步检测 NF- κB 通路在钩端螺旋体 56606v 导致的中性粒细胞凋亡抑制中是否发挥作用; 将巨噬细胞与钩端螺旋体 56606v 感染或未感染的中性粒细胞共孵育, 通过流式细胞术检测巨噬细胞对中性粒细胞的吞噬情况。**结果**·流式细胞术检测结果显示, 钩端螺旋体感染组与未感染对照组相比, 小鼠中性粒细胞凋亡率降低; 随 MOI 的增大, 钩端螺旋体对中性粒细胞的凋亡抑制作用增强; 不同 MOI 条件下, 2 组凋亡率的差异均有统计学意义 (均 $P=0.000$)。MOI=100 的钩端螺旋体感染中性粒细胞 0.5、6 和 12 h 时, 其凋亡率均较相应的未感染对照组降低 (均 $P<0.05$); 而使用促凋亡剂 STS 处理后, 则增强了小鼠中性粒细胞的凋亡程度。Western blotting 结果显示 caspase-3 的切割在钩端螺旋体 56606v 感染后明显减少, NF- κB 磷酸化水平在感染后显著上升, 添加 NF- κB 抑制剂 BAY 11-7082 能够显著抑制感染后和未感染条件下 NF- κB 通路的激活。在钩端螺旋体 56606v 感染或未感染条件下, 添加 NF- κB 抑制剂 BAY 11-7082 均显著提高了小鼠中性粒细胞凋亡率 (均 $P=0.000$)。钩端螺旋体 56606v 感染的中性粒细胞与未感染对照组相比, 被巨噬细胞吞噬的比例显著降低 ($P=0.027$)。**结论**·钩端螺旋体 56606v 通过激活 NF- κB 通路, 抑制小鼠中性粒细胞的凋亡, 进一步降低巨噬细胞对中性粒细胞的胞葬作用。

[关键词] 钩端螺旋体; 中性粒细胞; 细胞凋亡; 核因子 κB

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.11.001 **[中图分类号]** R37 **[文献标志码]** A

Effect of *Leptospira interrogans* 56606v on apoptosis of murine neutrophil

DU Lin, HE Ping

Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of *Leptospira interrogans* 56606v on apoptosis of murine neutrophils and related mechanisms. **Methods**·Murine neutrophils were infected with *Leptospira interrogans* 56606v at indicated multiplicity of infection (MOI was 100, 300 and 500 respectively) and time points (0.5, 6, 12 and 24 h), with uninfected neutrophils as control. Cells treated with an equal amount of cell culture medium containing 4 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine (STS) were used as positive control for apoptosis. The apoptosis was analyzed by using flow cytometry. The cleavage of caspase-3 and activation of nuclear factor- κB (NF- κB) pathway were detected in murine neutrophils infected with *Leptospira interrogans* 56606v by Western blotting, and the inhibitory effect of NF- κB inhibitor BAY 11-7082 on NF- κB pathway was also verified by Western blotting. The role of NF- κB pathway in the inhibition of neutrophil apoptosis induced by *Leptospira interrogans* 56606v was further explored by adding NF- κB inhibitor BAY 11-7082. Macrophages were co-incubated with *Leptospira*-infected or-uninfected carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeled neutrophils, and flow cytometry was used to detect the phagocytosis of neutrophils by macrophages to reflect the effect of the neutrophil apoptosis inhibition induced by *Leptospira interrogans* 56606v infection on efferocytosis. **Results**·The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of neutrophils in *Leptospira* infection group was decreased compared with the uninfected control group. The inhibition of *Leptospira interrogans* 56606v on neutrophil apoptosis was enhanced with the increase of MOI. Compared with the uninfected control group, the difference was statistically significant under different MOIs ($P=0.000$). The apoptosis rate was lower than that of the corresponding uninfected control group when *Leptospira interrogans* 56606v with MOI=100 infected neutrophils for 0.5, 6 and 12 h ($P<0.05$), and the apoptosis of neutrophils was enhanced after treatment with STS. The cleavage of caspase-3 was significantly reduced after infection with *Leptospira interrogans* 56606v and the

[基金项目] 国家自然科学基金 (8197080238)。

[作者简介] 杜琳 (1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: 15104561425@163.com。

[通信作者] 何平, 电子信箱: hpatsh@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (8197080238)。

[Corresponding Author] HE Ping, E-mail: hpatsh@sjtu.edu.cn。

phosphorylation of NF- κ B was significantly increased after infection demonstrated by Western blotting. The activation of NF- κ B pathway in both post-infection and non-infection conditions was significantly inhibited by BAY 11-7082. The apoptosis rate of murine neutrophils infected with or without *Leptospira interrogans* 56606v was significantly increased by BAY 11-7082 ($P=0.000$). The neutrophils infected with *Leptospira interrogans* 56606v were significantly less phagocytosed by macrophages than those uninfected ($P=0.027$). **Conclusion** *Leptospira interrogans* 56606v inhibits the apoptosis of murine neutrophils by activating the NF- κ B pathway, which further reduces efferocytosis of macrophages on neutrophils.

[Key words] *Leptospira interrogans*; neutrophil; apoptosis; nuclear factor- κ B

钩端螺旋体病是一种由致病性钩端螺旋体(钩体)感染导致的,在世界范围内传播但易被忽视的人兽共患传染病。人类在感染钩体后会表现出一系列不同的临床症状,从轻度的流感样症状到黄疸、肺出血,甚至是多器官衰竭和死亡均可发生^[1]。通常在资源较匮乏的地区,钩端螺旋体病的发病率和死亡率较高^[2]。目前,钩体的致病机制仍不明确。固有免疫是宿主抵御钩体感染的第一道防线,在早期识别和清除钩体过程中起着至关重要的作用。在固有免疫系统中,巨噬细胞发挥了重要的抗钩体感染的作用,而对于中性粒细胞的研究则较少。但有研究^[3]发现中性粒细胞也能够识别钩体,如在特异性抗体调理的情况下,其能够识别或杀死钩体。另外,有研究^[4]证明,钩体感染小鼠会诱发中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps)的形成,其在钩体的防御过程中具有重要作用。中性粒细胞是一种能够发生自发凋亡的细胞,其所释放的细胞毒物质既可杀伤病原体,也会造成自身组织损伤^[5]。中性粒细胞自发凋亡,随后被巨噬细胞清除,可降低其对周围组织的毒性作用^[6]。中性粒细胞的寿命也可以被促炎细胞因子,如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素-8、白细胞介素-1 β 或细菌产物(如脂多糖)等延长^[7-9]。此外,一些细菌病原体也能抑制中性粒细胞凋亡,如利什曼原虫(*Leishmania major*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)等^[10-12]。但钩体感染后对中性粒细胞程序性死亡的调控作用仍不明确。在以往研究中,我们已利用钩体56606v株建立了小鼠急性自限性钩端螺旋体病感染模型,能够较好地再现钩体感染症状,包括黄疸以及皮下和肺部出血等^[13]。钩体56606v株是一个较好的适用于钩体研究的实验菌株,代表了秋季血清群秋季血清型,为强毒株,最初分离自中国浙江省1例钩端螺旋体病患者。本研究对钩体56606v感染的小鼠中性粒细胞凋亡情况以及相关通路进行检测,旨在探究钩体感染对于中性粒细胞凋亡的影响及其潜在机制,以期为研究中性粒细胞在钩体感

染中的作用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及菌株 健康6~8周龄C57BL/6N雌性小鼠,SPF级,购自上海灵畅生物科技有限公司。动物生产许可证号SCXK(沪)2018-0003,使用许可证号SYXK(沪)2018-0027。动物饲养在上海交通大学医学院屏障动物房内,单笼常规饲料喂养,照明模拟自然光照,12 h昼夜更替。钩体56606v为本实验室保存菌株。

1.1.2 试剂及仪器 巯基乙酸盐,购自BD Difco公司;高糖培养基DMEM和胎牛血清(FBS),购自GIBCO公司;PBS、BCA蛋白质定量检测试剂盒和蛋白酶抑制剂,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;anti-caspase-3抗体、anti-p-p65抗体、anti-p-I κ B抗体、anti-p65抗体、anti-I κ B抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体,购自Cell Signaling Technology公司;anti-GAPDH抗体,购自Sigma公司;RIPA裂解液,购自碧云天公司;化学发光试剂盒,购自雅酶公司;FITC Annexin V细胞凋亡检测试剂盒,购自BD Biosciences公司;羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFSE),购自Invitrogen公司;电转仪和蛋白印迹转膜槽,购自BIO-RAD公司;二氧化碳培养箱,购自Thermo Fisher公司;流式细胞检测仪CytoFlex,购自BeckMan公司。

1.2 小鼠腹腔中性粒细胞和巨噬细胞的获取

C57BL/6小鼠腹腔注射1 mL 5%巯基乙酸盐肉汤,12 h和5 d后分别获取腹腔中性粒细胞和巨噬细胞^[12]。用冷PBS灌洗小鼠腹腔2次,收集腹膜渗出细胞。注射巯基乙酸盐肉汤12 h后取出的细胞在37℃、5% CO₂细胞培养箱内静置1 h,去除贴壁细

胞, 悬浮细胞即为小鼠腹腔中性粒细胞。注射巯基乙醇盐肉汤 5 d 后取出的细胞铺于细胞板, 过夜培养后去除悬浮细胞, 剩余贴壁细胞即为巨噬细胞。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

将小鼠中性粒细胞以 1×10^6 /孔接种于 24 孔细胞培养板中。分别将钩体 56606v 按照指定的感染复数 (MOI=100、300、500) 感染细胞; 感染 2 h 后换为含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的高糖 DMEM 细胞培养基 (含 10% FBS), 继续培养指定时间 (4、10、22 h)。未感染的对照组细胞加入等量细胞培养基, 其他处理与感染组相同。将含有 4 $\mu\text{mol/L}$ 星形孢菌素 (*Staurosporine*, STS) 的等量细胞培养基处理的细胞作为凋亡阳性对照 (STS 组)。

在添加 NF- κ B 抑制剂的实验中, 将小鼠中性粒细胞用 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 (10 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育 30 min 后, 用钩体 (MOI=100) 感染小鼠中性粒细胞; 感染 2 h 后换为含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的高糖 DMEM 细胞培养基 (含 10% FBS), 继续培养 10 h。未感染的对照组加入等量细胞培养基, 其他处理与感染组相同。

细胞到达指定处理时间后, 收集细胞, 按照凋亡检测试剂盒说明书操作。用冷 PBS 清洗细胞 2 次, 将 1×10^6 个细胞重悬于 1 mL 1 \times 结合缓冲液; 将 100 μL 细胞悬液转移至新的离心管中, 加入 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL PI, 轻轻涡旋并于室温避光孵育 15 min; 每管加入 400 μL 1 \times 结合缓冲液, 1 h 内采用流式细胞仪进行分析。

1.4 Western blotting 检测 caspase-3、NF- κ B 通路的表达

在 caspase-3 切割的检测实验中, 将小鼠中性粒细胞以 5×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板中, 钩体 56606v 以 MOI=100 感染细胞 2 h 后弃掉细胞培养液, 并用 PBS 清洗细胞 1 次; 再加入含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的高糖 DMEM 细胞培养基 (含 10% FBS), 继续培养 2 h。同样, 另设未感染的对照组和 STS 组。

在 NF- κ B 通路激活检测实验中, 将小鼠中性粒细胞以 5×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板中, 添加或不添加 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 (10 $\mu\text{g/mL}$) 预孵育 30 min 后, 用钩体 (MOI=100) 感染小鼠中性粒细胞 2 h, 以 p65 和 I κ B 抗体检测, 以确定 NF- κ B 通路的激活情况。将未用 BAY 11-7082 处理和未被钩体感染的

细胞作为对照。

细胞处理指定时间后, 去除细胞培养液, 用加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液处理细胞获得蛋白样品。利用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒检测蛋白样品浓度。将蛋白样本进行蛋白质凝胶电泳并完成转膜和封闭, 用对应的一抗稀释液孵育膜过夜, TBST 缓冲液清洗后, 置于对应的二抗稀释液中室温孵育 1 h, 利用化学发光仪显影成像。

1.5 体外胞葬作用检测

未感染或用钩体 (MOI=100) 感染小鼠中性粒细胞 6 h, 用 CFSE 对中性粒细胞进行标记; 将接种在 12 孔板上的巨噬细胞与 CFSE 标记的未感染和感染的中性粒细胞以 1:5 共孵育 2 h; 将细胞刮下并用 F4/80 抗体染色巨噬细胞, 流式细胞术检测 F4/80⁺CFSE⁺巨噬细胞 (吞噬了中性粒细胞的巨噬细胞) 的百分比。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

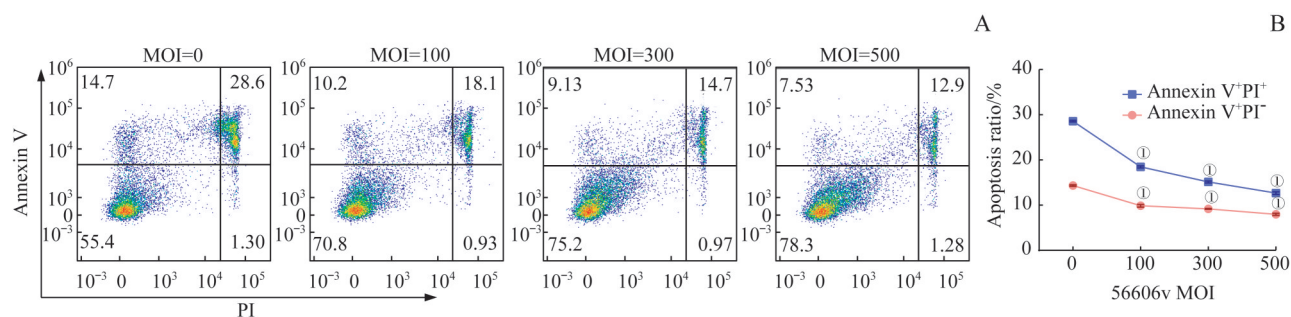
2 结果

2.1 小鼠中性粒细胞凋亡情况

流式细胞术检测小鼠中性粒细胞凋亡情况, 结果显示: 未感染的对照组在 6 h 时有 $14.4\% \pm 0.2\%$ 的细胞发生早期凋亡, $28.6\% \pm 0.2\%$ 的细胞发生晚期凋亡; 而钩体感染后 (MOI=100), 仅有 $9.8\% \pm 0.3\%$ 的细胞发生早期凋亡, $18.5\% \pm 0.2\%$ 的细胞发生晚期凋亡; 并且随 MOI 的增大, 钩体对中性粒细胞的凋亡抑制作用增强 (图 1)。MOI=100 的钩体感染中性粒细胞 0.5、6 和 12 h 时, 其凋亡率均较相应的未感染对照组降低 (均 $P < 0.05$); 而使用促凋亡剂 STS 处理后, 则增强了小鼠中性粒细胞的凋亡程度 (图 2)。

2.2 小鼠中性粒细胞 caspase-3 的表达变化

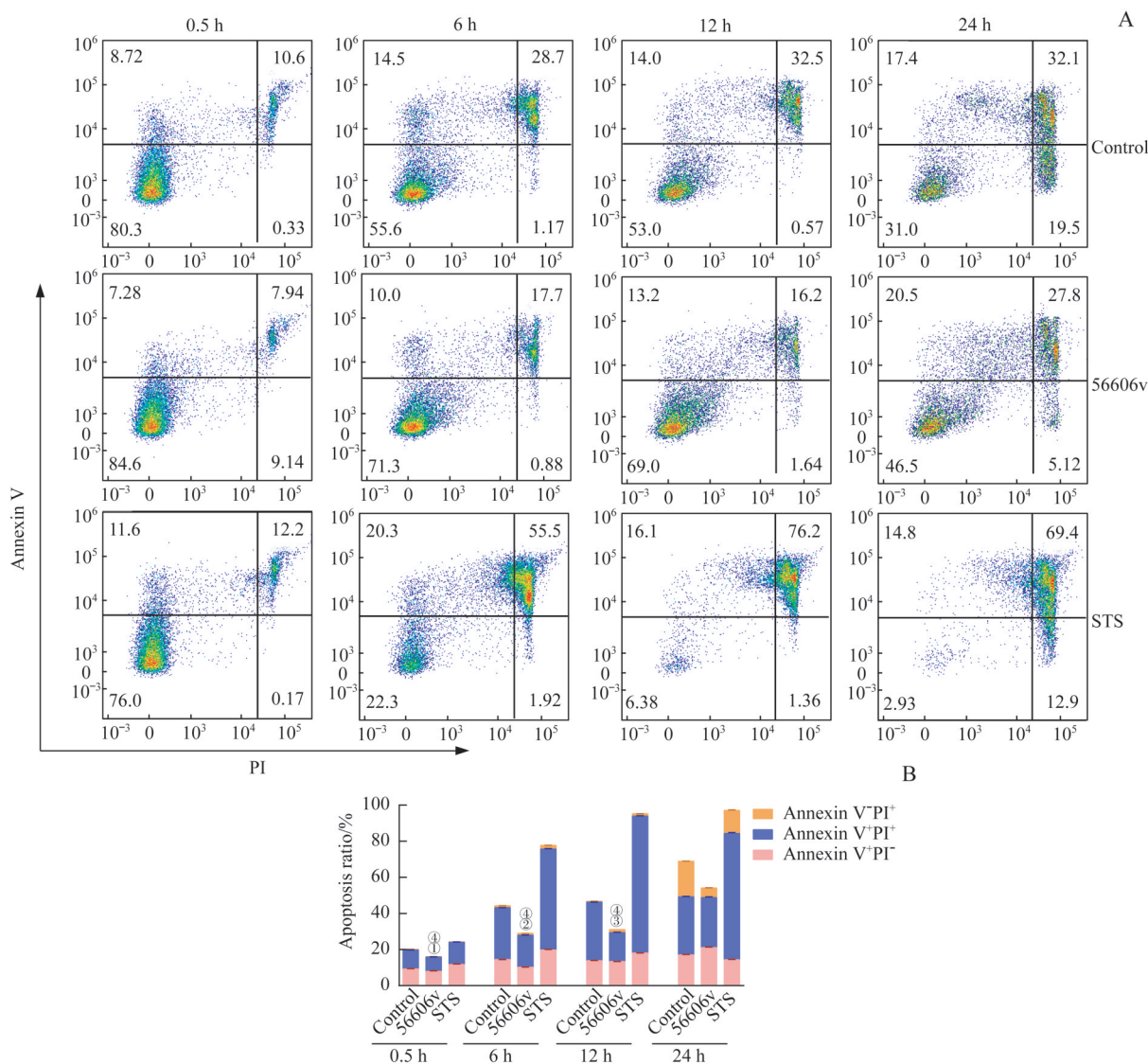
Western blotting 检测结果显示: 在未感染的对照组中, 4 h 后可以检测到明显的切割后的 caspase-3 表达; 而当钩体感染小鼠中性粒细胞 4 h 时, 切割后的 caspase-3 表达水平较未感染对照组明显降低; 用 STS 处理的中性粒细胞, 切割后的 caspase-3 的表达水平则高于未感染对照组 (图 3)。



Note: A. The representative results of neutrophil apoptosis detected by flow cytometry. B. The statistical results of neutrophil apoptosis. ① $P=0.000$, compared with the control (MOI=0) group.

图1 流式细胞术检测感染不同浓度钩体6 h后的小鼠中性粒细胞凋亡情况

Fig 1 Detection of apoptosis of murine neutrophils infected with different concentrations of *Leptospira* at 6 h post infection by flow cytometry



Note: A. The representative results of neutrophil apoptosis at indicated time points detected by flow cytometry. B. The statistical results of neutrophil apoptosis. ① $P=0.031$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.048$, compared with the control group (Annexin⁻PI⁺) at the same time; ④ $P=0.000$, compared with the control group (Annexin⁺PI⁺) at the same time.

图2 流式细胞术检测感染钩体(MOI=100)不同时间的小鼠中性粒细胞凋亡情况

Fig 2 Detection of apoptosis of murine neutrophils infected with *Leptospira* (MOI=100) for different periods by flow cytometry

2.3 小鼠中性粒细胞NF- κ B通路激活情况

Western blotting 检测结果显示, 在感染钩体的中

性粒细胞中, 磷酸化p65和I κ B的水平高于未感染细胞。此外, BAY 11-7082 预处理在未感染和钩体感染

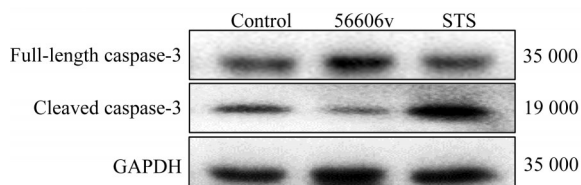


图3 感染钩体的小鼠中性粒细胞 caspase-3 的激活情况

Fig 3 Activation of caspase-3 in murine neutrophils infected with *Leptospira*

的情况下均能够显著抑制 p65 和 I κ B 的磷酸化水平 (图4)。

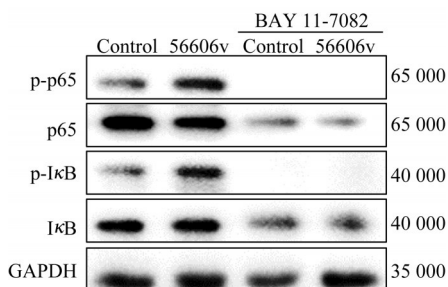


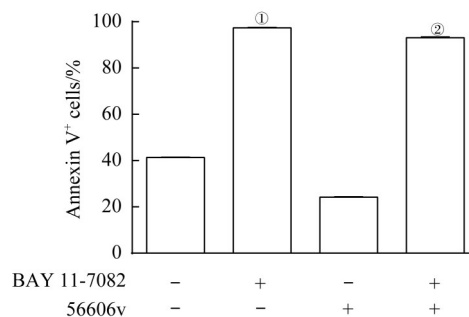
图4 钩体感染对小鼠中性粒细胞 NF- κ B 通路的激活情况

Fig 4 Activation of NF- κ B in murine neutrophils by *Leptospira* infection

2.4 抑制 NF- κ B 通路对小鼠中性粒细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, 在钩体感染或未感染条件下, 用 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 处理均提高了

中性粒细胞的凋亡率 (Annexin V⁺), 差异均有统计学意义 (均 $P=0.000$)。详见图5。



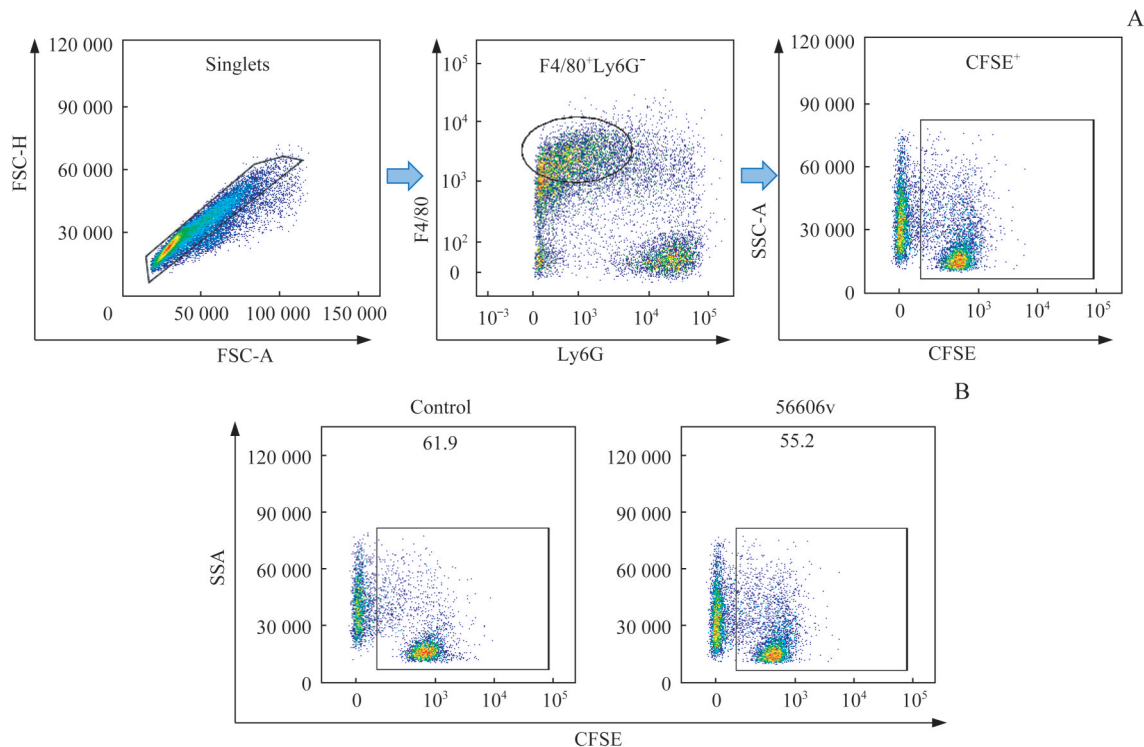
Note: ① $P=0.000$, compared with untreated cells; ② $P=0.000$, compared with 56606v-treated cells without BAY 11-7082.

图5 抑制 NF- κ B 通路对小鼠中性粒细胞凋亡的影响

Fig 5 Effect of inhibition of NF- κ B pathway on apoptosis of murine neutrophils

2.5 巨噬细胞对感染钩体的中性粒细胞的胞葬作用

利用流式细胞术比较巨噬细胞对 CFSE 标记的钩体感染或未感染的中性粒细胞的吞噬情况 (图6)。检测结果显示, 巨噬细胞与 CFSE 标记的中性粒细胞孵育 2 h 后, 未感染对照组中有 $60.2\% \pm 0.9\%$ 的 F4/80⁺CFSE⁺ 细胞, 而钩体 56606v 感染组有 $56.3\% \pm 0.7\%$ 的 F4/80⁺CFSE⁺ 细胞, 组间差异有统计学意义 ($P=0.027$)。



Note: A. Gating strategy for assessing phagocytosis of neutrophils by macrophages by flow cytometry. B. *Leptospira* (MOI=100)-infected or-uninfected CFSE-labeled neutrophils were incubated with macrophages and then processed for flow cytometry after staining with anti-F4/80.

图6 巨噬细胞对中性粒细胞的胞葬作用检测

Fig 6 Efferocytosis of neutrophils by macrophages

3 讨论

中性粒细胞是最初被招募到损伤或感染部位的免疫细胞^[14]。中性粒细胞摄入病原体会引发活性氧物质以及细胞毒性物质的产生,从而有效杀死摄入的病原体;但过度的中性粒细胞活化可能会导致严重的组织损伤和炎症性疾病。自发凋亡的中性粒细胞则能够被巨噬细胞摄取,限制炎症介质和有毒颗粒成分释放,维持免疫系统稳态^[15];但在某些病原体感染过程中,其也会抑制中性粒细胞的吞噬作用,从而促进其自身的感染。在本研究中,我们发现了钩体感染可通过激活NF- κ B通路对中性粒细胞凋亡产生抑制作用,并且该抑制作用阻碍巨噬细胞对其的吞噬作用。

中性粒细胞凋亡对于急性炎症的消退和维持白细胞稳态至关重要。研究表明,细菌和细菌衍生产物可影响中性粒细胞凋亡或细胞“命运”^[9]。在一些感染中,中性粒细胞吞噬病原体后会加速自身的凋亡,最终促进感染的消退。然而,一些病原体则进化出了相应的致病机制,抑制中性粒细胞凋亡以促进其致病。例如,肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)能够延缓中性粒细胞的凋亡,从而促进病原体在中性粒细胞内的繁殖^[16];肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)感染能够减少中性粒细胞的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻并导致程序性坏死的发生,从而减少对中性粒细胞的胞葬作用,而抑制程序性坏死的发生则可显著改善肺炎克雷伯菌的感染结果^[12]。吞噬细胞对凋亡细胞进行处理和降解的过程称为胞葬作用(efferocytosis)^[17]。而凋亡细胞表面暴露的PS可作为“吃我”信号被巨噬细胞识别^[18-19]。巨噬细胞能够通过胞葬作用清除凋亡的中性粒细胞,凋亡细胞的快速清除能够防止促炎介质从死细胞中释放,并通过吞噬作用控制病原体感染^[20-21]。在本研究中,我们发现钩体感染显著抑制了caspase-3的激活,流式细胞术检测结果也显示钩体感染抑制了中性粒细胞PS外翻。相应地,我们也发现了巨噬细胞对感染钩体的中性粒细胞的胞葬作用显著降低。以往的研究^[22]表明,中性粒细胞能识别钩体,但未调理情况下对钩体的杀伤能力较差。因此,我们推测钩体感染所导致的中性粒细胞凋亡抑制可能会阻碍巨噬细胞对其的清除,并加重钩体感染后的炎症。这一推测与我们以往研究发现的钩端螺旋体病具有较重的炎症表型是相一致的^[13]。

中性粒细胞的命运受多种因素调控。已有文献阐明了病原体具有调控中性粒细胞凋亡的多种机制。例如,刚地弓形虫通过调控增殖细胞核抗原阻断caspase的激活,从而延长中性粒细胞的“寿命”^[11];利什曼原虫通过激活ERK1/2并调节多种凋亡通路抑制中性粒细胞凋亡^[10];嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)通过p38信号通路延缓中性粒细胞凋亡^[23]。本研究发现钩体感染中性粒细胞能够激活NF- κ B通路,而以往已有研究证明了NF- κ B活化可抑制中性粒细胞凋亡^[24]。NF- κ B作为一种抑制凋亡的转录因子,可以上调凋亡抑制蛋白Bcl-2表达;而Bcl-2直接或间接抑制caspase-3的活化,还可能抑制caspase-3的合成。故有研究提出caspase-3的表达与NF- κ B呈负相关^[25]。同时,也有研究^[26]报道,NF- κ B抑制caspase-9和caspase-3的活化。本研究使用NF- κ B抑制剂BAY 11-7082证明了钩体感染可以通过激活NF- κ B抑制中性粒细胞凋亡,同时钩体感染也抑制了caspase-3的激活。但对于钩体感染抑制中性粒细胞凋亡是否存在其他机制,仍有待进一步探索。

越来越多的研究发现,病原体不断进化出了多种调控宿主细胞“命运”的机制。本研究证明了钩体能够调控小鼠中性粒细胞的凋亡,并且其可能与钩体的感染结局存在重要关联,这对于进一步理解钩体的致病机制及其与宿主的互作机制具有重要意义。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学动物伦理审查委员会批准(审批号A-2018-021)。所有实验过程均遵照《上海交通大学医学院实验动物相关规章制度》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by The Animal Ethics Review Committee of Shanghai Jiao Tong University (Approval Letter No. A-2018-021), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Rules and Regulations for Experimental Animals of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*.

作者贡献/Authors' Contributions

杜琳、何平参与了实验设计以及论文的写作和修改;杜琳负责实验操作与数据分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by DU Lin and HE Ping. The manuscript was

drafted and revised by DU Lin and HE Ping. The experiments were performed by DU Lin. The results were analyzed by DU Lin. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2022-07-08
• Accepted: 2022-10-18
• Published online: 2022-11-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] ADLER B. History of leptospirosis and *Leptospira*[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015, 387: 1-9.
- [2] RAJAPAKSE S. Leptospirosis: clinical aspects[J]. Clin Med (Lond), 2022, 22(1): 14-17.
- [3] FAINE S, SHAHAR A, ARONSON M. Phagocytosis and its significance in leptospiral infection[J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1964, 42: 579-588.
- [4] SCHARRIG E, CARESTIA A, FERRER M F, et al. Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(7): e0003927.
- [5] PAYNE C M, GLASSER L, TISCHLER M E, et al. Programmed cell death of the normal human neutrophil: an *in vitro* model of senescence[J]. Microsc Res Tech, 1994, 28(4): 327-344.
- [6] SAVILL J S, WYLLIE A H, HENSON J E, et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages[J]. J Clin Invest, 1989, 83(3): 865-875.
- [7] COX G, GAULDIE J, JORDANA M. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils *in vitro*[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, 7(5): 507-513.
- [8] KETTRITZ R, GAIDO M L, HALLER H, et al. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils[J]. Kidney Int, 1998, 53(1): 84-91.
- [9] COLOTTA F, RE F, POLENTARUTTI N, et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products[J]. Blood, 1992, 80(8): 2012-2020.
- [10] SARKAR A, AGA E, BUSSMEYER U, et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis[J]. Med Microbiol Immunol, 2013, 202(1): 25-35.
- [11] LIMA T S, MALLYA S, JANKEEL A, et al. *Toxoplasma gondii* extends the life span of infected human neutrophils by inducing cytosolic PCNA and blocking activation of apoptotic caspases[J]. mBio, 2021, 12(1): e02031-e02020.
- [12] JONDLE C N, GUPTA K, MISHRA B B, et al. *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(10): e1007338.
- [13] XIA B, SUN L, FAN X, et al. A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected with a strain of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(5): e36.
- [14] WANG J. Neutrophils in tissue injury and repair[J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(3): 531-539.
- [15] ALEMÁN M. Neutrophil apoptosis in the context of tuberculosis infection[J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(4): 359-363.
- [16] VAN ZANDBERGEN G, GIEFFERS J, KOTHE H, et al. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis[J]. J Immunol, 2004, 172(3): 1768-1776.
- [17] BOADA-ROMERO E, MARTINEZ J, HECKMANN B L, et al. The clearance of dead cells by efferocytosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(7): 398-414.
- [18] RAVICHANDRAN K S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums[J]. J Exp Med, 2010, 207(9): 1807-1817.
- [19] CULLEN S P, HENRY C M, KEARNEY C J, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells[J]. Mol Cell, 2013, 49(6): 1034-1048.
- [20] ARIEL A, SERHAN C N. New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation[J]. Front Immunol, 2012, 3: 4.
- [21] GREENLEE-WACKER M C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation[J]. Immunol Rev, 2016, 273(1): 357-370.
- [22] SANTECCHIA I, FERRER M F, VIEIRA M L, et al. Phagocyte escape of *Leptospira*: the role of TLRs and NLRs[J]. Front Immunol, 2020, 11: 571816.
- [23] CHOI K S, PARK J T, DUMLER J S. Anaplasma phagocytophilum delay of neutrophil apoptosis through the p38 mitogen-activated protein kinase signal pathway[J]. Infect Immun, 2005, 73(12): 8209-8218.
- [24] WALMSLEY S R, PRINT C, FARAHI N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity[J]. J Exp Med, 2005, 201(1): 105-115.
- [25] MALAGUARNERA L, PILASTRO M R, VICARI L, et al. Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in human acute myelogenous leukemic cells affecting NF- κ B activity[J]. Cancer Invest, 2005, 23(5): 404-412.
- [26] TANEJA R, PARODO J, JIA S H, et al. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity[J]. Crit Care Med, 2004, 32(7): 1460-1469.

[本文编辑] 吴洋

