

体外长期维持中性粒细胞活性的条件培养体系的建立

王彤^{1,2} 范玉龙^{1,2} 邵雅^{1,2} 赵红菲^{1,2} 刘欢^{1,2} 张诗悦^{1,2} 赵梓含^{1,2} 成天然^{1,2} 许元富^{1,2*}

(¹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), 血液与健康全国重点实验室, 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; ²天津医学健康研究院, 天津 301600)

摘要 中性粒细胞输注是一种临床辅助抗感染治疗方案, 而用于输注的中性粒细胞的体外活性维持是影响该方案实施的有效性的关键点, 目前也是相关研究的难点。因此, 该文探索间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)培养上清与一些药物分子联合使用来延缓中性粒细胞的体外衰老和维持机体免疫功能, 以期克服上述难题。通过分别采用不同培养条件(包括多种MSC培养上清、酸碱度调节培养基、影响中性粒细胞存活的多种药物分子及其组方等条件培养基)进行中性粒细胞的体外培养, 并分别检测中性粒细胞的体外寿命及生物学功能。实验结果显示, 相较于对照组(RPMI-1640培养基), MSC培养3天的培养上清可以更好地延长中性粒细胞的体外寿命, 同时也可以维持中性粒细胞的ROS释放和吞噬等杀菌功能, 两组之间具有显著性差异($P < 0.01$); 通过进一步实验筛选和验证, 与单纯使用MSC培养3天的培养上清相比, 使用优化后的中性粒细胞条件培养基(MSC培养上清, pH为6.0, 1 $\mu\text{mol/L}$ nicotine、10 ng/mL G-CSF、0.6 mmol/L NAC、10 $\mu\text{mol/L}$ DFP)显著延长了中性粒细胞的体外寿命($P < 0.01$)。总之, 该研究发现间充质干细胞培养上清和多种药物分子组合可以更好地维持中性粒细胞的体外活性, 这将为中性粒细胞的体外保存和输注研究提供较好的实验基础和理论依据。

关键词 中性粒细胞; 间充质干细胞; 培养上清; 小分子药物; 凋亡

Establishment of a Conditioned Culture System to Maintain the Activity of Neutrophils *In Vitro* for a Long Time

WANG Tong^{1,2}, FAN Yulong^{1,2}, SHAO Ya^{1,2}, ZHAO Hongfei^{1,2}, LIU Huan^{1,2}, ZHANG Shiyue^{1,2},
ZHAO Zihan^{1,2}, CHENG Tianran^{1,2}, XU Yuanfu^{1,2*}

(¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Key Laboratory of Blood and Health, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China)

Abstract Neutrophil transfusion is a clinical adjunctive anti-infective therapy, and the maintenance of *in vitro* activity of neutrophils used for transfusion is a key point affecting the effectiveness of this therapy, which is currently a challenging aspect of related research. Therefore, this study explored the combined use of MSC-conditioned medium and some drug molecules to delay neutrophil *in vitro* senescence and maintain immune function, to overcome the above difficulties. Neutrophils were cultured *in vitro* using various conditions (including multiple supernatants of MSC culture, pH regulation of culture medium, various drug molecules and their formulas affecting

收稿日期: 2024-04-12

接受日期: 2024-05-31

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-12M-1-017)和国家自然科学基金(批准号: 81970107)资助的课题

*通信作者。Tel: 13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: April 12, 2024

Accepted: May 31, 2024

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

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

the survival of neutrophils). The *in vitro* lifespan and biological functions of neutrophils were measured. The experimental results showed that compared with the control group (RPMI-1640 medium), the conditioned medium cultured for three days with MSCs could better prolong the *in vitro* lifespan of neutrophils while maintaining neutrophil functions such as ROS release and phagocytosis, with significant differences between the two groups ($P < 0.01$). Further experimental screening and verification revealed that compared with the use of conditioned medium cultured for three days with MSCs alone, the optimized neutrophil conditioning medium (MSC-conditioned medium, pH6.0, 1 $\mu\text{mol/L}$ nicotine, 10 ng/mL G-CSF, 0.6 mmol/L NAC, 10 $\mu\text{mol/L}$ DFP) significantly prolonged the *in vitro* lifespan of neutrophils ($P < 0.01$). In conclusion, this study found that the combination of mesenchymal stem cell-conditioned medium and multiple drug molecules could better maintain the *in vitro* activity of neutrophils, providing a good experimental basis and theoretical basis for the *in vitro* preservation and transfusion research of neutrophils.

Keywords neutrophil; MSC; cultured supernatant; small molecule drugs; apoptosis

中性粒细胞来源于骨髓内的造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC), 粒细胞从干细胞池中的髓系前体细胞逐步分化发育为成熟分叶核中性粒细胞, 之后被释放进入血液循环中发挥功能^[1-2]。中性粒细胞在抵御细菌真菌感染的同时, 也会引起与自身免疫性和炎症性疾病相关的组织损伤, 因此精确和及时地调控中性粒细胞的炎症活动对机体的稳态维持是至关重要的。在稳态条件下, 健康成人每天可产生约 10^{11} 个成熟中性粒细胞^[3], 中性粒细胞的自发性凋亡及其短的半衰期实现了这一稳态调控^[2]。中性粒细胞是白细胞中寿命最短的, 这在正常机体内是必要的, 但在病理状态下, 如先天性或获得性的中性粒细胞减少和/或功能缺陷, 患者对细菌真菌的易感性增加, 而中性粒细胞输注通过增加患者体内中性粒细胞的数量, 增强机体抵抗微生物感染的能力, 无疑可以降低患者的感染风险^[4], 而中性粒细胞的体外寿命过短、活性迅速衰减成为阻碍粒细胞输注的关键难题。

我们在前期实验中采用了脐带间充质干细胞(以下简称间充质干细胞, mesenchymal stem cell, MSC)与中性粒细胞共培养的实验方法, 能够延长中性粒细胞的寿命并维持细胞活性^[5-6], 然而所采用的实验方法并不利于临床治疗工作的进行, 不具有向临床应用转化的潜能。因此, 我们改良了体外培养体系, 直接采用MSC培养上清来培养中性粒细胞, 随后的进一步研究中通过在MSC培养上清中添加多种抑制中性粒细胞死亡或促进中性粒细胞存活的小分子药物, 组成一种新的条件培养基, 以期能够在体外较好地维持中性粒细胞的活性, 促进临床中性粒细胞输注治疗方案的推广应用。

1 材料和方法

1.1 脐带来源的间充质干细胞和外周血

脐带来源的间充质干细胞购自北京诺为生物技术有限公司; 外周血购自天津市血液中心, 是枸橼酸三钠抗凝的富含血小板的白膜成分血。

1.2 主要试剂和仪器

间充质干细胞培养基(MSC NutriStem XF Basal Medium)购自美国Biological Industries公司; Ficoll淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技公司; 氟磷酸二异丙酯(diisopropyl fluorophosphate, DFP)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine, NAC)、尼古丁(nicotine)购自美国Sigma公司; 粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)购自协和发酵麒麟(中国)制药有限公司; AttuneNxT流式细胞仪、二氧化碳恒温培养箱均购自美国ThermoFisher Scientific公司; 共聚焦实时显微成像系统购自美国PerkinElmer公司。

1.3 人脐带间充质干细胞培养上清收集

脐带来源的间充质干细胞使用MSC专用无血清培养基培养, 经贴壁传代扩增后冻存于液氮备用, 实验过程中所使用的间充质干细胞均为5代以内。新鲜复苏的间充质干细胞经一次传代后接种于T75细胞培养瓶, 待融合度达到80%左右时, 弃掉原先的完全培养基, 使用MMC处理后, 重新加入一定量的MSC完全培养基, 置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱培养, 分别在1、2、3和4天时收集细胞上清, 经过3 000 r/min室温离心10 min后, 收集上清冻存于-20 °C冰箱备用。

1.4 人外周血中性粒细胞分离及纯度检测

Ficoll淋巴细胞分离液恢复至室温, 按1:1的比

例, 将白膜成分血缓慢匀速加入到Ficoll淋巴细胞分离液上层, 离心加速度设为3升3降, 2 000 r/min室温离心20 min, 缓慢吸取上层液体并弃掉, 重悬底层的中性粒细胞和红细胞沉淀, 在细胞悬液中加入等体积的常温羟乙基淀粉溶液, 轻柔混匀后室温静置30 min沉降红细胞。缓慢吸取上层溶液, 加入红细胞裂解液裂解剩余的红细胞, 1 500 r/min室温离心5 min后, 弃掉上清, 重悬加入PBS溶液清洗细胞, 得到的中性粒细胞重悬于含15%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 并计数备用。

取少量中性粒细胞经FITC-CD66b抗体和PE/Cy7-CD15抗体标记后, 通过流式细胞术检测CD66b和CD15双阳性细胞的比例即为中性粒细胞的纯度; 同时, 另取少量中性粒细胞($\sim 1 \times 10^5$ 个)甩片, 经无水乙醇室温固定1 min, 自然晾干后用瑞氏-吉姆萨染液染色并观察拍照。

1.5 间充质干细胞上清体外培养中性粒细胞

新鲜中性粒细胞均以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的浓度在体外培养, 分别采用MSC上清及添加不同小分子药物的MSC上清进行培养, 同时设置RPMI-1640培养基作为对照组, 每组设置3个复孔, 分别在0、1、2、3天时收集中性粒细胞, 经流式标抗检测细胞活性。

1.6 中性粒细胞活性检测

收集新鲜或经过培养的中性粒细胞, FITC-CD66b抗体和PE/Cy7-CD15抗体用于标记中性粒细胞, APC-Annexin V抗体和PI抗体用于标记细胞活性, 经流式细胞术检测中性粒细胞纯度和活性。同时采用锥虫蓝拒染实验于显微镜下观察中性粒细胞活性。

1.7 中性粒细胞体外功能检测

中性粒细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)释放能力及吞噬能力反映体外培养的中性粒细胞的功能状态。ROS释放使用鲁米诺化学发光法进行检测, 使用0.1% BSA-PBS溶液重悬中性粒细胞, 细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{L}$, 96孔白色平底酶标板每孔100 μL , 每组3个复孔。冰上避光, 在生理盐水中配制如下浓度的反应液: 1 000 U/mL辣根过氧化物酶、10 mmol/L鲁米诺、1 mol/L甲酰三肽(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)。涡旋混匀备用。使用酶标仪自动加样系统进行检测, 待测细胞孔每孔加入100 μL 反应液, 立即连续检测记录20 min, 统计分析数据。

吞噬能力采用酵母聚糖颗粒吞噬实验进行检测, 酵母聚糖颗粒偶联结合FITC荧光素, 经10%血浆调理后与中性粒细胞共孵育, 可被中性粒细胞识别并吞噬, 使用CD66b-APC抗体标记中性粒细胞, 在共聚焦实时显微成像系统下检测中性粒细胞的吞噬百分比和吞噬指数。

1.8 体外培养中性粒细胞条件筛选

培养上清筛选: 分别使用培养间充质干细胞1、2、3、4天的培养上清对中性粒细胞进行培养, 对中性粒细胞凋亡结果分析后得出最优培养上清。小分子药物浓度筛选: 使用MSC上清培养中性粒细胞, 同时在培养体系分别加入不同浓度的小分子药物, 包括尼古丁(nicotine)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)、氟磷酸二异丙酯(DFP), 设置浓度梯度, 培养后分析比较细胞存活结果, 得出小分子药物的最适浓度。培养体系pH筛选: 对MSC上清进行pH调节, MSC上清原始pH为7.2, 逐滴加入1 mol/L的HCl并使用精密pH试纸检测MSC培养上清pH值, 分别调节MSC上清pH至6.0、6.5、7.0, 用不同pH的MSC上清培养中性粒细胞, 分析结果得到最佳pH条件。最终, 配制最适浓度的小分子药物组合, 添加到最优MSC培养上清中, 并调整至最佳pH值, 形成体外延长中性粒细胞寿命的培养体系。

1.9 实验数据统计学分析

所有实验数据经汇总统计后, 使用GraphPad-Prism 8.0软件进行差异分析。组间比较均采用t检验进行差异性分析。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 人外周血中性粒细胞的分离及纯度活性检测

分离获得的人外周血中性粒细胞经瑞氏-吉姆萨染色, 用光学显微镜观察并拍照, 结果显示所分离获得的中性粒细胞纯度较高, 且细胞形态为典型成熟分叶核粒细胞(图1A)。同时, 中性粒细胞经FITC-CD66b抗体和PE/Cy7-CD15抗体标记染色后, 流式分析显示中性粒细胞占比95%(图1B), 细胞活性标记检测, 显示Annexin V和PI双阴性细胞占比为97.8%(图1B), 证明所采用的方法分离获得的中性粒细胞纯度和活性均良好。

2.2 MSC培养上清收集及中性粒细胞培养

分别收集MSC培养1、2、3、4天的上清, 使用

不用培养时长的MSC上清进行体外中性粒细胞的培养,同时使用RPMI-1640培养基作为对照组,通过流式细胞术分析细胞的存活率,比较结果后发现,在每个检测时间点,3天的MSC培养上清能够更好地维持中性粒细胞的体外活性(图1C)。

2.3 MSC-3d培养上清延缓中性粒细胞的凋亡

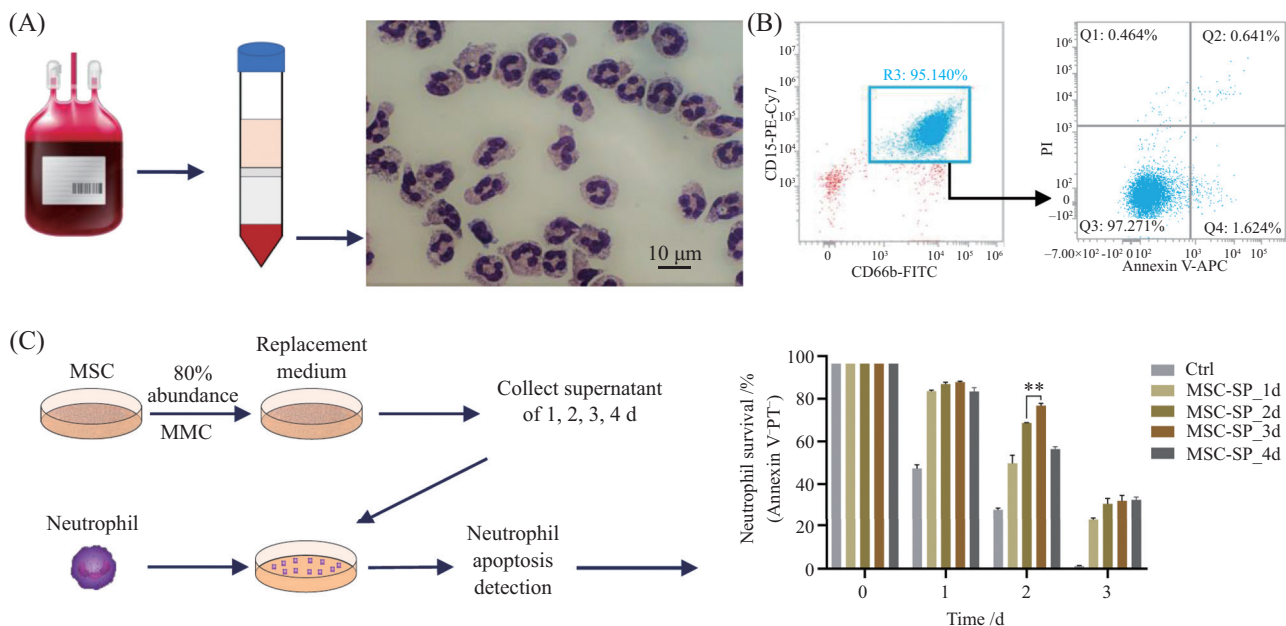
前期实验结果已明确间充质干细胞共培养可以延长中性粒细胞的体外寿命,为进一步探索间充质干细胞对中性粒细胞促存活的作用以及改善培养体系,本研究设计了MSC上清培养实验:使用MSC-3d的培养上清在体外培养中性粒细胞作为实验组,同时采用RPMI-1640培养基作为对照组培养中性粒细胞,通过流式细胞术及锥虫蓝拒染实验检测中性粒细胞的体外活性。结果发现:在倒置光学显微镜下可以看到随着培养时间的延长,实验组中性粒细胞的活性明显优于对照组(图2A)。将两组体外培养的中性粒细胞甩片经瑞氏-吉姆萨染色后,可以看到对照组中性粒细胞在培养1天时即可看到多数细胞出现胞核固缩即凋亡,而经MSC-3d上清培养的中性粒细胞体外培养3天后,细胞形态相对完整和正常(图2B)。经流式检测结果显示,在各个检测时间点,

经MSC-3d上清培养的中性粒细胞的存活率(82.5%、73.3%、46.8%)均明显高于对照组(64.3%、42.5%、8.17%)(图2C和图2D),锥虫蓝拒染实验镜下计数也得到了相似的结果(图2D)。

2.4 MSC-3d培养上清能够在体外维持中性粒细胞的ROS释放能力和吞噬功能

中性粒细胞杀伤细菌的一种方式是通过释放大量活性氧(ROS),因此,可以通过检测中性粒细胞激活时的ROS释放能力来判断中性粒细胞的功能(图3A)。采用fMLP刺激中性粒细胞,使其活化释放ROS,实验结果显示,在同等条件fMLP激活时, MSC-3d上清培养的中性粒细胞均可以活化释放较高水平的ROS,显著高于经RPMI-1640培养基培养的对照组中性粒细胞(图3A~图3C)。

同时,吞噬作为中性粒细胞杀菌的重要功能之一,被广泛用于中性粒细胞的功能检测,通过将荧光标记的酵母聚糖颗粒与中性粒细胞共孵育,在共聚焦实时显微成像系统下进行观察,结果显示,对照组的中性粒细胞在体外培养1天时已基本丧失吞噬功能,而经MSC-3d上清培养的中性粒细胞,在体外培养3天后,仍然可以保持较好的吞噬能力(图3D),其

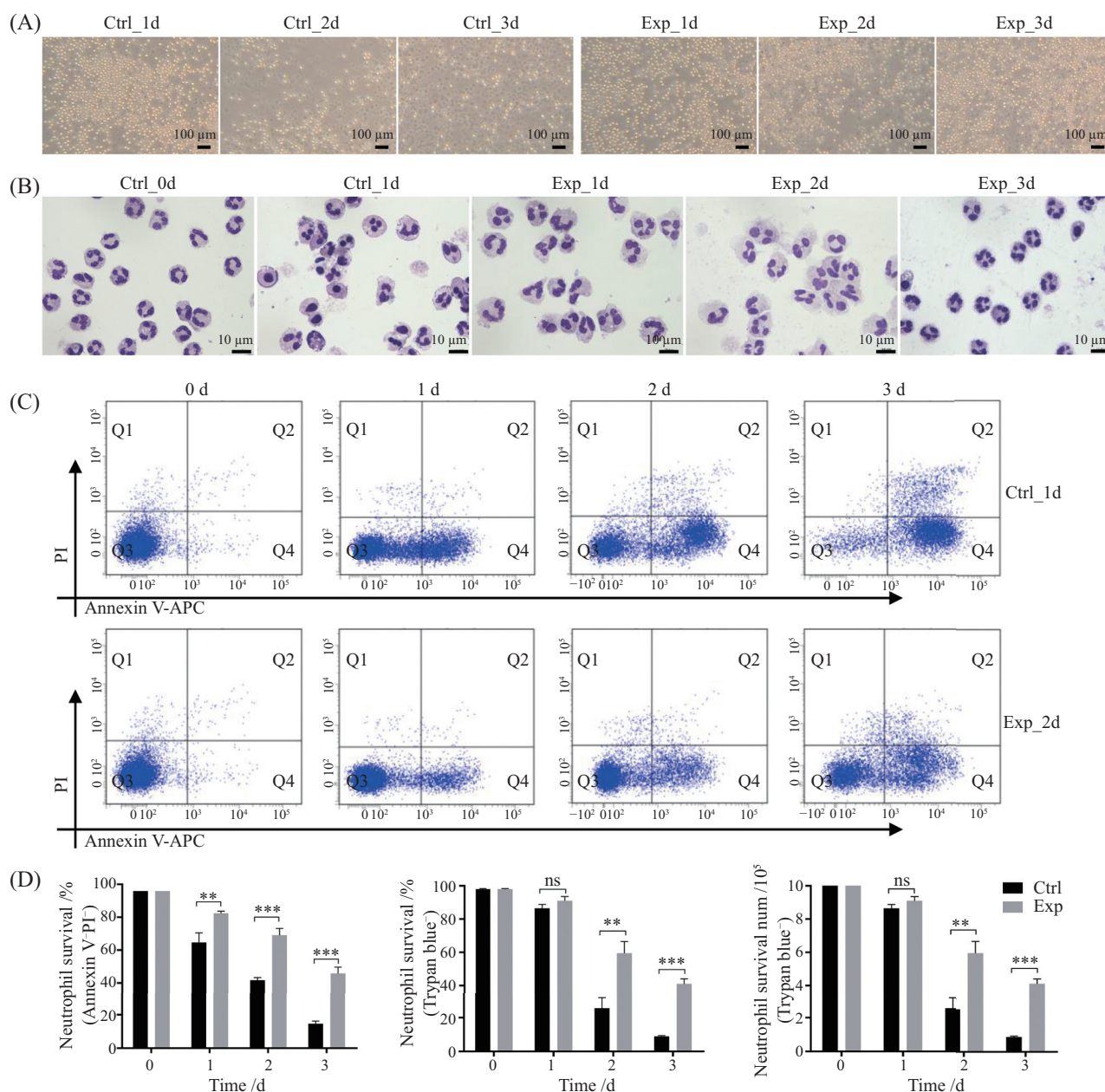


A: 分离获得的人外周血中性粒细胞,经瑞氏-吉姆萨染色后形态; B: 新鲜分离的中性粒细胞纯度及活性; C: 分别收集不同培养时长的MSC上清,检测不同培养时长的上清维持中性粒细胞体外活性的差异($F=0.5482$, $P=0.7032$), $**P<0.01$ 。

A: morphology of neutrophils isolated from human peripheral blood after Wright's Giemsa staining; B: purity and activity of freshly isolated neutrophils; C: MSC supernatants of different culture duration were collected, and the difference of maintaining neutrophil activity *in vitro* was detected ($F=0.5482$, $P=0.7032$), $**P<0.01$ 。

图1 新鲜分离中性粒细胞的纯度、活性及MSC培养上清筛选

Fig.1 Purity and activity of freshly isolated neutrophils and screening of MSC culture supernatant



A: 体外培养中性粒细胞光学显微镜下活性状态; B: 体外培养中性粒细胞经瑞氏-吉姆萨染色结果; C: 流式细胞学检测中性粒细胞体外培养活性; D: 中性粒细胞体外存活比例及绝对数($F=46.28$, $P<0.0001$; $F=33.09$, $P<0.0001$; $F=33.44$, $P<0.0001$), ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: $P>0.05$ 。

A: active state of neutrophils cultured *in vitro* under optical microscope; B: results of Wright's Giemsa staining of neutrophils cultured *in vitro*; C: detection of neutrophil culture activity *in vitro* by flow cytology; D: survival ratio and absolute number of neutrophils *in vitro* ($F=46.28$, $P<0.0001$; $F=33.09$, $P<0.0001$; $F=33.44$, $P<0.0001$), ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: $P>0.05$ 。

图2 MSC培养上清延缓中性粒细胞凋亡

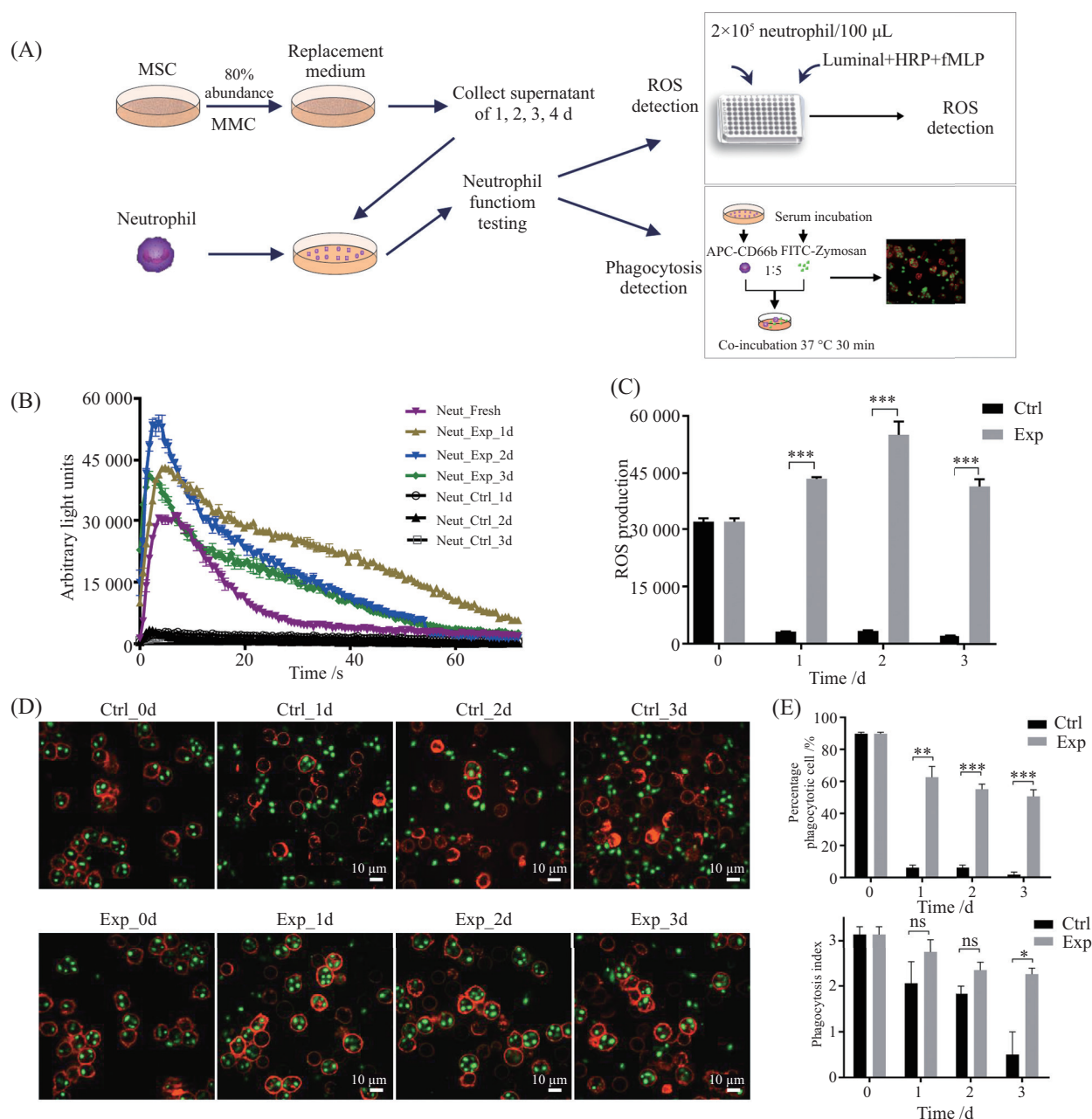
Fig.2 MSC culture supernatant delays neutrophil apoptosis

吞噬比例可以维持在60%左右, 吞噬指数接近于新鲜中性粒细胞(图3E)。以上结果表明, MSC-3d上清可以在体外维持中性粒细胞的ROS释放和吞噬能力。

2.5 培养上清添加小分子药物筛选

在以上实验结果的基础上, 结合文献报道以及

实验室前期针对中性粒细胞凋亡的研究表明: 尼古丁、粒细胞集落刺激因子、NAC、DFP等小分子药物可以特异性抑制中性粒细胞的凋亡。因此, 通过将MSC上清培养体系与这些小分子药物相结合进一步促进中性粒细胞体外寿命的延长。根据先前的研究报道, 如图(图4A~图4E)设置每个小分子药物的浓度梯度, 在



A: MSC上清体外培养的中性粒细胞功能实验流程图; B: 体外培养中性粒细胞生成ROS的能力; C: 体外培养中性粒细胞生成ROS的最高水平分析($F=703.0$, $P<0.0001$); D: 中性粒细胞体外培养吞噬酵母聚糖颗粒; E: 体外培养中性粒细胞发生吞噬的比例及吞噬指数($F=27.85$, $P<0.0001$; $F=5.490$, $P=0.0131$), $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, ns: $P>0.05$ 。

A: flow chart of neutrophil function in MSC supernatant culture *in vitro*; B: ROS production ability of neutrophils cultured *in vitro*; C: analysis of the highest level of ROS produced by neutrophils *in vitro* ($F=703.0$, $P<0.0001$); D: culture of neutrophils *in vitro* phagocytosis of yeast glycan granules; E: phagocytosis ratio and phagocytosis index of neutrophils cultured *in vitro* ($F=27.85$, $P<0.0001$; $F=5.490$, $P=0.0131$), $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, ns: $P>0.05$ 。

图3 体外MSC-3d培养上清具有维持中性粒细胞功能的作用

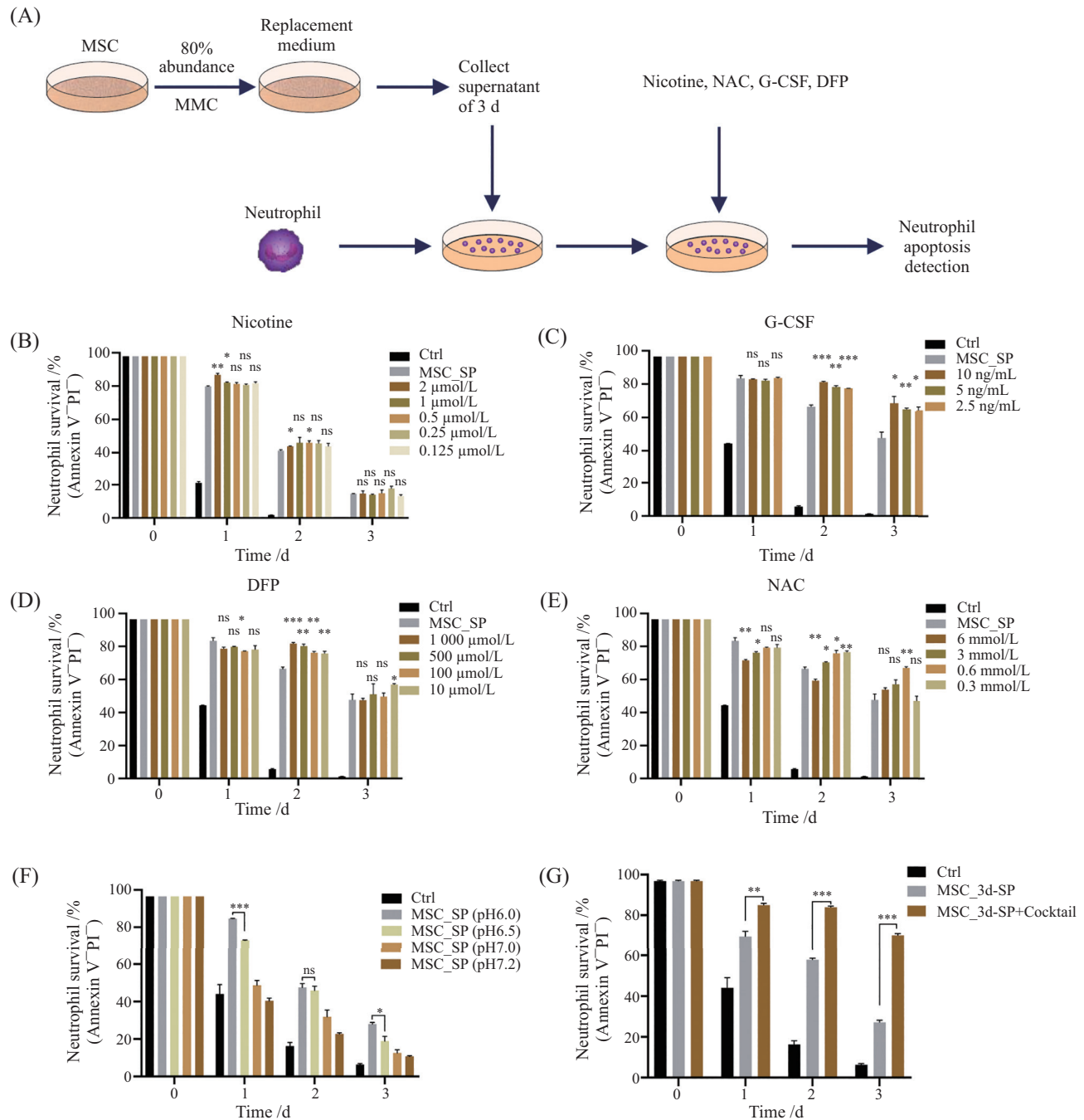
Fig.3 The supernatant of MSC-3d culture can maintain the function of neutrophils *in vitro*

培养体系中筛选最适合的药物浓度, 通过浓度梯度调节, 筛选出每个药物的最适浓度: 1 μmol/L nicotine、10 ng/mL G-CSF、0.6 mmol/L NAC、10 μmol/L DFP(图4A~图4E), 在MSC上清培养体系中, 以上药物分别在各自最适浓度时达到抑制中性粒细胞凋亡

的最佳效果。

2.6 培养上清pH调节筛选

除小分子药物以外, 实验室前期结果证实了培养基的pH会对中性粒细胞的寿命产生影响, 因此本实验设计通过调节培养上清的pH值, 验证不同的



A: MSC上清添加小分子药物用于中性粒细胞体外培养实验流程; B~E: 分别添加不同小分子药物后体外培养中性粒细胞标抗经流式检测细胞存活率($F=90.12$, $P<0.0001$; $F=2.544$, $P=0.0829$; $F=1.58$, $P=0.2159$; $F=1.64$, $P=0.2003$), ns: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与MSC_SP组比较; F: 不同pH值的MSC培养上清用于中性粒细胞体外培养, 标抗经流式检测细胞存活率($F=0.3213$, $P=0.8593$), $*P<0.05$, $***P<0.001$, ns: $P>0.05$; G: 使用经筛选的小分子药物浓度和pH值配制Cocktail, 使用Cocktail体外培养中性粒细胞, 标抗经流式检测细胞存活率($F=2.419$, $P=0.1443$), $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: experimental flow of adding small molecule drugs to MSC supernatant for neutrophil culture *in vitro*; B-E: after adding different small molecule drugs, the survival rate of neutrophils cultured *in vitro* was detected by flow cytometry ($F=90.12$, $P<0.0001$; $F=2.544$, $P=0.0829$; $F=1.580$, $P=0.2159$; $F=1.640$, $P=0.2003$), respectively. ns: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with MSC_SP; F: MSC culture supernatants with different pH values were used to culture neutrophils *in vitro*, and the survival rate of neutrophils was detected by flow cytometry ($F=0.3213$, $P=0.8593$), $*P<0.05$, $***P<0.001$, ns: $P>0.05$; G: the neutrophils were cultured *in vitro* with Cocktail, and the viability of neutrophils were detected by flow assay ($F=2.419$, $P=0.1443$), $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图4 小分子药物筛选、培养基pH的调节以及Cocktail培养

Fig.4 Screening of small molecule drugs, adjustment of pH of culture medium and Cocktail culture

酸碱度对中性粒细胞寿命的影响。MSC-3d培养上清的初始pH为7.2, 将MSC-3d的培养上清pH调整至6.0、6.5、7.0, 分别使用4种pH的MSC培养上清培养中性粒细胞, 同时设置RPMI-1640培养作为对照组, 在既定时间点收集细胞并通过流式标抗检测分析细胞的存活率, 根据结果分析, 在每个检测时间点, pH6.0的MSC培养上清对中性粒细胞的促存活作用最明显(图4F), 该结果与我们实验室前期研究结果相一致^[7]。

2.7 组方培养体系可以更有效地延长中性粒细胞体外寿命

通过对培养条件的筛选, 获得每种培养条件的最优设置, 将这些最优的培养条件相结合, 形成新的体外培养体系即组方培养体系, 对中性粒细胞的凋亡进一步调控。实验组设计如下: (1) 培养基使用间充质干细胞培养3天的上清; (2) 使用1 mol/L浓度的HCl调节培养基pH至6.0; (3) 配制小分子Cocktail(1 000×), 确保组方培养体系的终浓度为: 尼古丁为1 $\mu\text{mol/L}$ 、粒细胞集落刺激因子为10 ng/mL、NAC为0.6 mmol/L、DFP为10 $\mu\text{mol/L}$ 。同时设置空白组 and 对照组, 空白组采用间充质干细胞培养3天的上清培养中性粒细胞; 对照组采用RPMI-1640培养基单独培养中性粒细胞。经过体外培养, 实验结果显示, 与对照组(44%、16%、6%)相比, 实验组和空白组的抗凋亡效果均显著性提升($P<0.01$); 实验组的组方培养体系的中性粒细胞存活率(85%、83%、70%)在各个时间点均明显高于空白组(69%、57%、27%)(图4G), 且具有显著性差异($P<0.01$), 组方培养体系的抗凋亡能力显著提升, 证明我们新组合的培养体系可以更有效地延长中性粒细胞的体外寿命。

3 讨论

中性粒细胞的凋亡调控是中性粒细胞研究的首要问题, 作为终末分化细胞, 在体外培养时会自发进入凋亡程序, 但同时多种环境因素均会影响中性粒细胞的寿命, 如细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、氧分压、pH、温度、细胞培养密度以及细胞因子[如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)]等均可以影响中性粒细胞的凋亡^[9]。有关间充质干细胞对中性粒细胞寿命影响的研究表明, 间充质干细胞与中性粒细胞混合培养可以显著延长中性粒细胞的体外寿

命^[9], 已有研究发现MSC可以降低C反应蛋白和促炎因子水平, 减少中性粒细胞侵袭和胞外捕获网的形成, 从而延长中性粒细胞的寿命^[10]。然而MSC是否通过分泌因子调控中性细胞功能仍不清楚, 本研究发现MSC培养上清可以减少中性粒细胞的凋亡, 提示间充质干细胞可能是通过间接作用影响中性粒细胞的寿命。

已有研究表明MSC的外泌体和培养上清都与改善中性粒细胞寿命相关^[11]。AKIYAMA等^[12]研究发现MSC具有抗凋亡的能力, HE等^[13]的研究表明, MSCs通过增加心肌细胞中的Bcl-2与Bax蛋白比例降低凋亡水平。MSC还通过释放各种因子, 如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)来参与神经元的存活^[14]。MSC-CM的抗凋亡作用可能与MSC上清中的一些因子, 如TNF- α 、G-CSF、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、干扰素- α (interferon- α , IFN- α)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和IL-6^[15]相关。其中, IL-6是延长中性粒细胞功能的主要贡献者, 其他一些研究也证实IL-6在抑制中性粒细胞的凋亡方面起关键作用^[16]。目前, 也有研究发现MSC的抗中性粒细胞的凋亡作用也可能通过MSC的外泌体将蛋白质、microRNA和mRNA从MSC转移到中性粒细胞中进而延长中性粒细胞的寿命^[17]。本研究证实MSC-3d上清中含有促进中性粒细胞寿命延长的因子也可能包含上述因子, 但是具体的相关分泌因子仍需进一步的研究加以证实。

对于上清培养体系的改良, 本研究主要参考针对中性粒细胞凋亡调控的已发表文献和实验室前期的研究结果: 活性氧(ROS)的积累已被证明是中性粒细胞死亡的原因之一^[18-19], NAC可以抑制细胞内ROS的积累, 达到促进中性粒细胞存活的目的^[21]。通过对吸烟导致的慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)的研究发现, 肺内聚集的大量中性粒细胞与香烟烟雾中的尼古丁成分有关^[21], 尼古丁能够抑制细胞内IP7的产生, 从而阻断AKT活性的下调, 延迟中性粒细胞的凋亡^[22]。本研究发现衰老的中性粒细胞会释放丝氨酸蛋白酶3(proteinase 3, PR3)独立剪切活化caspase-3, 加速中性粒细胞的凋亡, 而加入特异性PR3抑制剂DFP后, 可以有效延缓中性粒细胞的死亡^[23]。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)能够延长中性粒细胞在体内和体外的存活时间^[24], G-CSF可以促进粒系造血, 动员成熟

中性粒细胞离开骨髓释放入血^[25]。有研究报道多种病原微生物可以影响中性粒细胞的凋亡^[26], 在炎症状态下, 中性粒细胞趋化募集到感染损伤部位发挥功能, 感染部位的微环境会对中性粒细胞的寿命产生影响^[27-28], 由于病原菌的代谢等原因导致局部微环境酸化, 局部pH值可降低至6.0甚至更低, 通过对中性粒细胞体外培养环境的pH调节, 我们确认了弱酸性(pH6.0)环境可以延缓中性粒细胞的凋亡。

通过综合以上体外培养条件的改善以及小分子药物的添加, 从而形成优化的培养体系。一方面, 通过优化培养体系的体外培养, 中性粒细胞的体外寿命进一步得到延长, 在3天时, 仍有高于70%的中性粒细胞存活, 相较于MSC-3d上清培养体系(存活率40%), 优化后的培养体系对中性粒细胞的促存活作用大幅提升, 表明本研究的上清培养体系的可行性以及优化培养体系的可能性。另一方面, 本研究的培养体系在延长中性粒细胞寿命, 实现粒细胞的体外保存的同时, 也可以为中性粒细胞的体外功能实验的研究提供帮助。传统观点认为, 中性粒细胞的功能仅限于在机体有感染风险时发挥吞噬、杀伤病原微生物等抗感染的作用, 而现有的结果表明, 中性粒细胞的功能已经超越了抗感染的作用^[4,29]。通过对中性粒细胞体外功能的研究发现, 中性粒细胞能够通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)对肿瘤细胞产生强大的杀伤力^[30], 本研究建立的培养体系无疑可以为该研究提供条件, 同时也可以作为肿瘤治疗的新方向。

综上所述, 本研究基于实验室前期研究结果, 在间充质干细胞的培养上清中添加多种抑制中性粒细胞死亡和促进中性粒细胞存活的小分子药物, 建立了一种新的体外长期维持中性粒细胞寿命和活性的条件培养体系。目前该培养体系正用于改善中性粒细胞的体外冷冻保存体系, 并有望实现中性粒细胞的长期储存, 解决中性粒细胞输注研究的瓶颈问题, 从而推动粒细胞输注技术在临床上的广泛应用。

参考文献 (References)

- [1] TAK T, TESSELAAR K, PILLAY J, et al. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(4): 595-601.
- [2] BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes [J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 657-70.
- [3] KOBAYASHI S D, DELEO F R, QUINN M T. Microbes and the fate of neutrophils [J]. *Immunol Rev*, 2023, 314(1): 210-28.
- [4] AMULIC B, CAZALET C, HAYES G L, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 459-89.
- [5] 王永荣, 范玉龙, 吕梦楠, 等. AGM-S3基质细胞共培养对中性粒细胞自发凋亡及其免疫功能的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(WANG Y R, FAN Y L, LÜ M N, et al. Effects of Co-culture of AGM-S3 stromal cells on spontaneous apoptosis and immune function of neutrophils [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(8): 1558-68.
- [6] FAN Y L, KONG X Y, WANG Y R, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the survival and immune functions of neutrophil [J]. *Immunol J*, 2021, 37(1): 8-16.
- [7] CAO S, LIU P, ZHU H, et al. Extracellular acidification acts as a key modulator of neutrophil apoptosis and functions [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e137221.
- [8] DORWARD D A, ROSSI A G, DRANSFIELD I, et al. Assessment of neutrophil apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1124: 159-80.
- [9] HARRELL C R, VOLAREVIC V. Apoptosis: a friend or foe in mesenchymal stem cell-based immunosuppression [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2021, 126: 39-62.
- [10] ZHU R, YAN T, FENG Y, et al. Mesenchymal stem cell treatment improves outcome of COVID-19 patients via multiple immunomodulatory mechanisms [J]. *Cell Res*, 2021, 31(12): 1244-62.
- [11] TAGHAVI-FARAHABADI M, MAHMOUDI M, REZAEI N, et al. Wharton's Jelly mesenchymal stem cells exosomes and conditioned media increased neutrophil lifespan and phagocytosis capacity [J]. *Immunol Invest*, 2021, 50(8): 1042-57.
- [12] AKIYAMA K, CHEN C, WANG D, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(5): 544-55.
- [13] HE A, JIANG Y, GUI C, et al. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning [J]. *Can J Cardiol*, 2009, 25: 353-8.
- [14] GU Y, HE M, ZHOU X, et al. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18587.
- [15] YANG G, FAN X, LIU Y, et al. Immunomodulatory mechanisms and therapeutic potential of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(5): 1214-31.
- [16] RAFFAGHELLO L, BIANCHI G, BERTOLOTTO M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 151-62.
- [17] TAGHAVI-FARAHABADI M, MAHMOUDI M, HASHEMI S M, et al. Evaluation of the effects of mesenchymal stem cells on neutrophils isolated from severe congenital neutropenia patients [J]. *Int Immunopharmacol*. 2020, 83: 106463.
- [18] PEREZ-FIGUEROA E, ÁLVAREZ-CARRASCO P, ORTEGA E, et al. Neutrophils: many ways to die [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631821.

- [19] BUCK A, SANCHEZ KLOSE F P, VENKATAKRISHNAN V, et al. DPI selectively inhibits intracellular NADPH oxidase activity in human neutrophils [J]. Immunohorizons, 2019, 3(10): 488-97.
- [20] XU Y, LOISON F, LUO H R. Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3K γ , ROS, and actin [J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(7): 2950-5.
- [21] FINKELSTEIN E I, NARDINI M, VAN DER VLIET A. Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease [J]? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(3): L732-9.
- [22] XU Y, LI H, BAJRAMI B, et al. Cigarette smoke (CS) and nicotine delay neutrophil spontaneous death via suppressing production of diphosphoinositol pentakisphosphate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(19): 7726-31.
- [23] LOISON F, XU Y, LUO H R. Proteinase 3 and Serpin B1: a novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation [J]. Inflamm Cell Signal, 2014, 1(6): e462.
- [24] THEYAB A, ALGAHTANI M, ALSHARIF K F, et al. New insight into the mechanism of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) that induces the mobilization of neutrophils [J]. Hematology, 2021, 26(1): 628-36.
- [25] CHEN W, BORAS B, SUNG T, et al. A physiological model of granulopoiesis to predict clinical drug induced neutropenia from *in vitro* bone marrow studies: with application to a cell cycle inhibitor [J]. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2020, 47(2): 163-82.
- [26] CHERLA R, ZHANG Y, LEDBETTER L, et al. *Coxiella burnetii* Inhibits neutrophil apoptosis by exploiting survival pathways and antiapoptotic protein Mcl-1 [J]. Infect Immun, 2018, 86(4): e00504-17.
- [27] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(3): 159-75.
- [28] LOH W, VERMEREN S. Anti-inflammatory neutrophil functions in the resolution of inflammation and tissue repair [J]. Cells, 2022, 11(24): 4076.
- [29] MANTOVANI A, CASSATELLA M A, COSTANTINI C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(8): 519-31.
- [30] VALGARDSDOTTIR R, CATTANEO I, KLEIN C, et al. Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies [J]. Blood, 2017, 129(19): 2636-44.