

中性粒细胞不同亚群功能特性及其输注 应用前景分析

赵宏润^{1,2} 赵梓含^{1,2} 刘悦辛^{1,2} 张诗悦^{1,2} 范玉龙^{1,2} 席静雯^{1,2} 王彤^{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), 北京协和医学院, 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 该研究旨在比较中性粒细胞不同亚群的功能特性及体外存活能力差异, 并评价优化后的条件培养体系对中性粒细胞存活、功能维持及输注应用效果的影响。研究采用流式细胞术分选小鼠骨髓来源CXCR2⁺和CXCR2⁻中性粒细胞; 单细胞转录组分析两亚群细胞功能及细胞死亡相关通路差异; 通过吞噬实验和ROS检测评价其效应功能; 优化间充质干细胞培养上清联合粒细胞集落刺激因子培养体系(MSC+G), 比较不同培养条件下细胞存活、凋亡情况、功能维持及处理24 h后的后续存活能力; 在环磷酰胺诱导的粒细胞缺乏模型基础上, 于LPS诱导肺部炎症模型和大肠埃希菌诱导肺炎模型中分别评价整体及分群中性粒细胞的体内趋化能力和抗感染作用。单细胞转录组分析结果表明, CXCR2⁺中性粒细胞趋化、迁移及吞噬相关通路(与CXCR2⁻亚群相比)显著富集, 同时焦亡、炎症小体及铁死亡等细胞死亡相关通路亦显著激活($P < 0.001$); 体外功能实验结果显示, CXCR2⁺亚群的吞噬阳性率、吞噬指数及ROS水平均明显高于CXCR2⁻亚群。在常规培养条件下, CXCR2⁺中性粒细胞第1、2、3天的存活率分别为27.4%、12.3%和4.3%, 显著低于优化后的MSC+2G组(即间充质干细胞培养3 d上清联合G-CSF及GM-CSF的培养体系), 其对应存活率分别为84.7%、81.8%、77.5%($P < 0.05$); MSC+2G体系可持续维持CXCR2⁺中性粒细胞的吞噬功能与ROS生成能力, 该维持效果与CLON-G培养体系接近; CXCR2⁺中性粒细胞经MSC+2G培养24 h后, 换成常规培养条件培养仍能保持接近新鲜细胞的存活与功能状态; 体内实验显示, MSC+2G培养24 h后的中性粒细胞仍保持较好的体内趋化能力和抗感染作用, 且与新鲜细胞及CLON-G组无显著差异; 进一步分群分析表明, 在LPS诱导肺部炎症模型中, MSC+2G培养的CXCR2⁺中性粒细胞趋化至肺组织的绝对数为 3.2×10^4 , 显著高于CXCR2⁻中性粒细胞的 5.0×10^3 ($P < 0.0001$); 在大肠埃希菌诱导的粒缺肺炎模型中, MSC+2G培养的CXCR2⁺中性粒细胞可显著提高受体小鼠生存率, 而CXCR2⁻组未见明显改善。该研究得出CXCR2⁺中性粒细胞与CXCR2⁻中性粒细胞相比具有较强的免疫功能, 优化后的MSC+2G条件培养体系可显著延长其体外存活时间, 并能较好维持其体内外免疫功能, 整体效果接近国际报道的最优条件培养体系CLON-G。CXCR2⁺中性粒细胞结合MSC+2G条件培养体系, 为中性粒细胞的短期保存及粒细胞有效输注提供了实验和理论依据, 在应对临床上的粒细胞缺乏和重症感染等方面具有现实应用价值。

关键词 中性粒细胞; CXCR2; 间充质干细胞; GM-CSF; 粒细胞输注

Functional Characteristics of Distinct Neutrophil Subsets and Their Potential for Granulocyte Transfusion

收稿日期: 2026-04-07 接受日期: 2026-04-30

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-I2M-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 7, 2026 Accepted: April 30, 2026

This work was supported by the Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2021-I2M-1-017), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107)

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

ZHAO Hongrun^{1,2}, ZHAO Zihan^{1,2}, LIU Yuexin^{1,2}, ZHANG Shiyue^{1,2}, FAN Yulong^{1,2},
XI Jingwen^{1,2}, WANG Tong^{1,2}, XU Yuanfu^{1,2*}

(¹State 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; ²Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China)

Abstract This study aimed to compare the functional characteristics and *ex vivo* survival of distinct neutrophil subsets, and to evaluate the effects of an optimized culture system on neutrophil viability, functional maintenance, and the efficacy of granulocyte transfusion. The study employed flow cytometric sorting to isolate CXCR2⁺ and CXCR2⁻ neutrophils derived from mouse bone marrow. Single-cell transcriptomic analysis was performed to compare functional features and cell death-related pathways between the two subsets. Phagocytosis assays and ROS (reactive oxygen species) measurements were used to assess effector functions. An MSC-conditioned medium plus G-CSF culture system (MSC+G) was further optimized, and its effects on neutrophil survival, apoptotic status, functional maintenance, and post-treatment survival after 24 h of culture were evaluated. In addition, using a cyclophosphamide-induced neutropenic mouse model, both total and subset-defined neutrophils were examined for *in vivo* recruitment in an LPS-induced pulmonary inflammation model and for antibacterial protection in an *E. coli* (*Escherichia coli*)-induced pneumonia model. Single-cell transcriptomic analysis showed that, compared with CXCR2⁻ neutrophils, CXCR2⁺ neutrophils were significantly enriched for chemotaxis, migration, and phagocytosis-related pathways, while pyroptosis-, inflammasome-, and ferroptosis-associated pathways were also markedly activated ($P < 0.001$). *In vitro* functional assays demonstrated that CXCR2⁺ neutrophils exhibited significantly higher phagocytic positivity, phagocytic index, and ROS levels than CXCR2⁻ neutrophils. Under conventional culture conditions, the survival rates of CXCR2⁺ neutrophils on day 1, 2, and 3 were 27.4%, 12.3%, and 4.3%, respectively, which were significantly lower than those in the optimized MSC+2G group (i.e., a culture system combining the supernatant from 3-day-cultured mesenchymal stem cells with G-CSF and GM-CSF), whose corresponding survival rates were 84.7%, 81.8%, and 77.5% ($P < 0.05$). The MSC+2G system continuously preserved the phagocytic activity and ROS-generating capacity of CXCR2⁺ neutrophils, with effects comparable to those of the CLON-G culture system. After 24 h of MSC+2G treatment, CXCR2⁺ neutrophils maintained survival and functional status close to those of freshly isolated cells even after transfer to conventional culture conditions. *In vivo*, total neutrophils cultured in MSC+2G for 24 h retained substantial recruitment capacity and antibacterial activity, with no significant differences from fresh neutrophils or CLON-G-treated cells. Further subset analysis showed that, in the LPS-induced pulmonary inflammation model, the absolute number of MSC+2G-cultured CXCR2⁺ neutrophils recruited to the lungs reached 3.2×10^4 , significantly higher than that of CXCR2⁻ neutrophils (5×10^3 , $P < 0.0001$). In the *E. coli*-induced neutropenic pneumonia model, MSC+2G-cultured CXCR2⁺ neutrophils significantly increased the survival rate of recipient mice, whereas no significant improvement in recipient mouse survival was observed in the CXCR2⁻ group. The study concludes that CXCR2⁺ neutrophils possess stronger immune effector functions compared to the CXCR2⁻ neutrophils. The optimized MSC+2G culture system significantly prolongs their *ex vivo* survival while preserving both *in vitro* and *in vivo* immune functions, with an overall performance approaching that of the reported benchmark culture system, CLON-G. The combination of CXCR2⁺ neutrophils and the MSC+2G culture system provides experimental and theoretical support for short-term neutrophil preservation and effective granulocyte transfusion, with potential relevance for the management of neutropenia and severe infection.

Keywords neutrophils; CXCR2; mesenchymal stem cells; GM-CSF; granulocyte transfusion

中性粒细胞是机体天然免疫应答中的关键细胞,主要通过吞噬病原体、释放颗粒酶、产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)及形成中性粒细胞外诱捕网等方式参与感染防御与炎症调控^[1-2]。临床上,粒细胞输注可作为粒细胞缺乏患者预防或治疗感染的重要辅助治疗手段^[3-4]。但由于中性粒细胞寿命短,离体后又缺乏能够在短期内维持其生存的体外培养体系,导致细胞加速死亡,从而影响粒细胞输注的实际效果。近年报道的CLON-G(caspases-lysosomal membrane permeabilization-oxidant-necrosis inhibition plus granulocyte colony-stimulating factor)体系是多种阻断粒细胞死亡的小分子化合物与粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)组成的一种条件培养体系,可在体外显著延长其中性粒细胞存活时间并在动物输注研究中取得较好效果,提示通过优化体外培养体系可提高粒细胞输注治疗的有效性^[5]。然而CLON-G体系中包含多种非临床批准的小分子化合物,其临床应用仍受限制。

近年来,随着单细胞转录组学的广泛应用,人们发现以往用于输注的成熟中性粒细胞具有异质性,可以根据中性粒细胞的功能成熟程度、迁移能力、效应状态及组织适应性等分为不同的亚群细胞^[6-7],但不同亚群细胞在粒细胞输注中的实际作用及应用前景仍不清楚。CXC趋化因子受体2(C-X-C motif chemokine receptor 2, CXCR2)是调控中性粒细胞由骨髓释放并向炎症部位迁移的重要分子。既往研究表明, CXCR2及其相关信号不仅参与中性粒细胞的趋化运动,也与其成熟、吞噬和活性氧生成等效应功能密切相关^[8-9]。因此,基于CXCR2表达进行亚群划分,从功能角度筛选更适合保存和输注的中性粒细胞亚群是该领域中一个亟需深入探索的前沿问题。

我们在前期工作中揭示了脐带来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)培养上清可在一定程度上延缓中性粒细胞凋亡并维持其功能;在此基础上, MSC培养上清联合G-CSF的策略可进一步增强中性粒细胞体外活性维持效果^[10-11]。基于此,本研究将结合组学的分析结果,进一步优化和筛选一种具有潜在转化价值的体外条件培养体系。

总之,本研究将根据CXCR2的表达情况对小鼠骨髓来源中性粒细胞进行分群,比较CXCR2⁺与

CXCR2⁻亚群在功能状态及细胞死亡相关特征上的差异;同时基于组学分析结果,优化MSC培养上清联合G-CSF的条件培养体系,并评价其对不同亚群细胞体外存活能力、功能维持及体内趋化能力的影响,以期为临床粒细胞的体外保存及粒细胞输注提供切实可行的方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8周龄雄性C57BL/6-Ly5.2/CD45.2和C57BL/6-Ly5.1/CD45.1小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司,饲养于SPF级动物房。动物实验经中国医学科学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会批准(批准号: CIFMS2021004-EC-2)。

1.2 主要试剂和仪器

脐带来源的间充质干细胞(货号: 904505)及间充质干细胞培养基(货号: 637050)购自金准生物医药科技有限公司; G-CSF(货号: RP00573)及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)(货号: RP01206)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; Q-VD-Oph(货号: S7311)购自美国Selleck公司; 甲磺酸去铁胺(deferoxamine, DFO)(货号: D9533)及N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)(货号: A9165)购自美国Sigma公司; 热休克蛋白70(heat shock protein70, Hsp70)(货号: ab113187)购自英国Abcam公司; 受体相互作用蛋白1抑制剂Nec-1s(necrostatin-1s)(货号: 852391-15-2)购自美国EMD Millipore公司; 二氧化碳恒温培养箱(型号: P-150A)购自美国ThermoFisher Scientific公司; 共聚焦实时显微镜(型号: Dragonfly200)购自英国Oxford Instruments公司。

1.3 CXCR2亚群中性粒细胞分选

分离小鼠股骨和胫骨骨髓细胞,裂解红细胞后加入Ly6G、CD11b和CXCR2抗体,于4℃孵育30 min。采用BD FACSAria III流式细胞仪进行分选,经DAPI染色排除死细胞后,收集Ly6G⁺CD11b⁺CXCR2^{hi}(CXCR2⁺)和Ly6G⁺CD11b⁺CXCR2^{low/-}(CXCR2⁻)亚群,中间过渡群不纳入后续实验分析。分选纯度≥95%、细胞活率≥90%。

1.4 单细胞转录组分析

单细胞转录组数据来源于XIE等^[6]发表于*Nat Immunol*的公开数据集[基因表达综合数据库(Gene

Expression Omnibus, GEO): GSE137540; 小鼠数据集: GSE137539]。原研究经过质量控制(quality control, QC)后获得19 582个高质量细胞,其中12 285个中性粒细胞用于分析。下载作者公开的表达矩阵及注释文件后,参考原文流程进行再分析。上游处理由原作者采用Cell Ranger v2.2.0完成,下游分析在R v3.5.2环境中使用Seurat v2.3.4和Monocle v2进行。按*Cxcr2*表达水平对中性粒细胞再分组,比较不同表达组在趋化(chemotaxis)、迁移(migration)、吞噬及细胞死亡相关通路中的差异。

1.5 中性粒细胞体外存活及功能检测

采用锥虫蓝拒染法检测活细胞数并计算存活率;采用Annexin V/7-AAD双染流式细胞术检测细胞凋亡情况。吞噬实验采用FITC标记的酵母聚糖颗粒进行检测,颗粒经10%血浆调理后按5:1与中性粒细胞于37 °C孵箱中共孵育30 min,以CD11b-APC标记中性粒细胞,在共聚焦显微镜下采集图像并计算吞噬阳性细胞率和吞噬指数。ROS检测采用DCFH-DA探针(10 μmol/L),37 °C孵育30 min后进行流式检测,以平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示ROS水平。

1.6 MSC+2G培养体系构建及体外培养

人脐带间充质干细胞传代至P3,融合度约80%时以丝裂霉素C处理3 h,继续培养3 d后收集培养上清,3 000 r/min室温离心10 min后收集上清,于-20 °C保存,避免反复冻融。前期筛选显示MSC培养3 d所得上清(MSC-3d)维持中性粒细胞活性效果较好,故后续实验均采用MSC-3d上清。

常规培养基为RPMI 1640,补充15%热灭活胎牛血清和1%青霉素-链霉素。以小鼠骨髓来源的未分群中性粒细胞为研究对象,比较常规培养基、MSC-3d、MSC-3d+G-CSF(MSC+G)、MSC-3d+GM-CSF(MSC+GM)及MSC-3d+G-CSF+GM-CSF(MSC+2G)对细胞存活的影响。细胞接种浓度为 1×10^6 /mL,于培养第0、1、2、3天检测存活率。在前期预实验中,对G-CSF及GM-CSF分别设置2.5、5、10及20 ng/mL浓度梯度进行筛选。结果显示,当MSC培养3 d上清联合G-CSF和GM-CSF终浓度均为10 ng/mL时,对中性粒细胞体外活性维持效果较佳。因此,在后续实验中,G-CSF及GM-CSF的终浓度均设定为10 ng/mL。

参考文献[5]的方法,并结合小鼠中性粒细胞培

养条件对CLON-G体系进行优化配制。在常规培养基基础上加入Q-VD-Oph(50 μmol/L)、DFO(1 μmol/L)、Hsp70(10 pmol/L)、NAC(1 mmol/L)、Nec-1s(10 μmol/L)及G-CSF(10 ng/mL),共同组成CLON-G培养基。CXCR2⁺和CXCR2⁻中性粒细胞分别接种于常规培养基(对照组)、MSC+2G及CLON-G体系中,于培养第1、2、3天检测存活率、凋亡情况、吞噬功能及ROS生成能力。

1.7 不同培养体系预处理后中性粒细胞后续存活能力检测

CXCR2⁺和CXCR2⁻中性粒细胞分别置于CLON-G或MSC+2G体系中培养24 h,随后以PBS洗涤2次后重悬于常规培养基中继续培养3 d;新鲜分离后直接置于常规培养基的细胞作为对照。于后续培养第1、2、3天采用锥虫蓝拒染法检测细胞存活率。

1.8 小鼠粒缺肺炎模型构建及中性粒细胞输注实验

以CD45.2小鼠为受体,于第0天和第3天分别腹腔注射150 mg/kg和100 mg/kg环磷酰胺(cyclophosphamide, CPM)建立粒细胞缺乏模型。于第4天确认外周血中性粒细胞降至最低水平后,分别进行整体中性粒细胞输注实验和分群中性粒细胞输注实验。

在中性粒细胞输注实验中,受体小鼠气管内滴注3 mg/kg脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导肺部炎症,或气管内滴注 5×10^3 CFU大肠埃希菌构建粒缺肺炎模型。4 h后分别经尾静脉输注PBS、CD45.1小鼠来源新鲜中性粒细胞、CLON-G培养24 h或MSC+2G培养24 h的中性粒细胞(每只小鼠输注 2×10^6 个细胞)。在LPS诱导模型中,于输注后3 h取肺组织用于趋化检测;在大肠埃希菌诱导模型中,记录输注后72 h内受体小鼠生存情况,并绘制生存曲线。

在CXCR2亚群中性粒细胞输注实验中,受体小鼠同样分别建立LPS诱导肺部炎症模型和大肠埃希菌诱导粒缺肺炎模型。4 h后,分别经尾静脉输注PBS、MSC+2G培养24 h的CXCR2⁻中性粒细胞或CXCR2⁺中性粒细胞(每只小鼠输注 2×10^6 个细胞)。在LPS诱导模型中,于输注后3 h取肺组织用于趋化检测;在大肠埃希菌诱导模型中,记录输注后72 h内受体小鼠生存情况,并绘制生存曲线。

取上述肺组织剪碎并制备单细胞悬液,采用流式细胞术以CD45标记白细胞、CD11b、Ly6G标记中性粒细胞、CD45.1标记供体细胞,在CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺细胞群中分析CD45.1⁺细胞的比

例及绝对数。其中趋化比例定义为肺组织总中性粒细胞中供体来源CD45.1⁺中性粒细胞所占比例。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。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并进行 Tukey 事后检验;涉及培养体系和时间两因素的实验采用双因素方差分析并进行 Tukey 事后多重比较校正;生存曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制并以 log-rank 检验比较。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 比较和分析不同中性粒细胞亚群的特性

为比较不同亚群中性粒细胞的功能特性及体外存活能力差异,本研究依据 CXCR2 表达水平对小鼠骨髓来源中性粒细胞进行分群。结果显示:可稳定分选获得 CXCR2⁺和 CXCR2⁻两个中性粒细胞亚群,其中 CXCR2⁻和 CXCR2⁺细胞分别占分选后中性粒细胞的 27.2%和 61.4%(图 1A);两亚群细胞均呈典型中性粒细胞形态,未见明显形态学差异(图 1B)。单细胞转录组分析显示:与 CXCR2⁻亚群相比, CXCR2⁺中性粒细胞中趋化、迁移及吞噬相关通路显著富集,其中中性粒细胞趋化通路 NES=2.67, FDR=9.5×10⁻⁵,中性粒细胞迁移通路 NES=2.57, FDR=5.7×10⁻⁵,吞噬调控通路 NES=1.61, FDR=0.024(图 1C)。CXCR2⁺亚群焦亡(pyroptosis)、炎症小体(inflammasome)及铁死亡(ferroptosis)相关评分均明显高于 CXCR2⁻亚群(P 均<0.001,图 1D);细胞存活结果显示: CXCR2⁺中性粒细胞体外存活率下降更快,第 1、2、3 天分别为 27.4%、12.3%和 4.3%,均显著低于 CXCR2⁻亚群的 74.6%、39.9%和 16.6%(P 均<0.01,图 1E);体外功能检测表明: CXCR2⁺中性粒细胞的吞噬阳性率、吞噬指数及 ROS 水平均显著高于 CXCR2⁻亚群,分别为(95.3% vs 42.3%、3.2 vs 1.8、1 923 vs 1 206)(P 均<0.01,图 1F~图 1H)。上述结果提示, CXCR2⁺中性粒细胞具有更强效应功能,但在常规培养条件下体外存活时间相对较短。

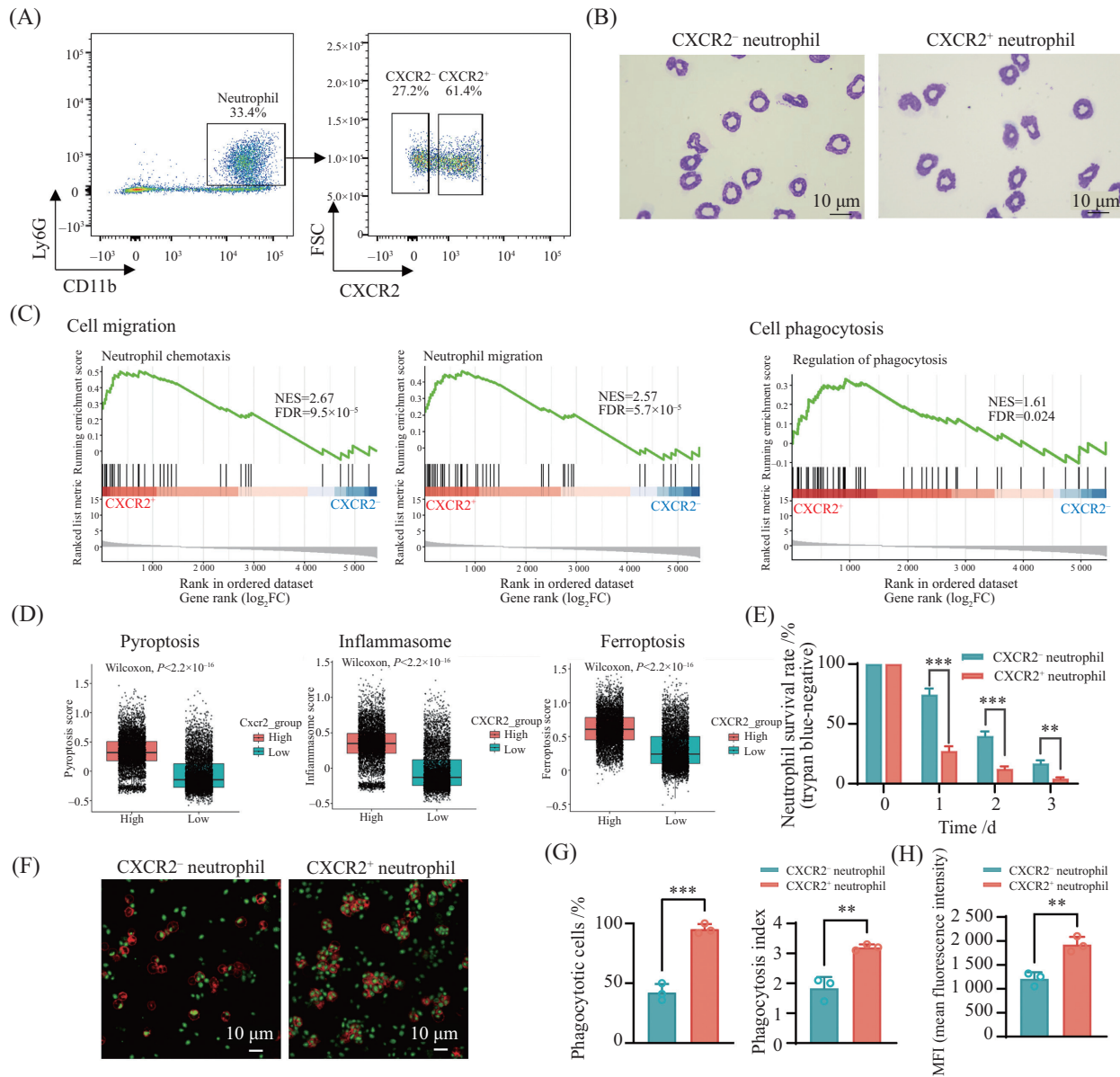
2.2 MSC+2G 培养体系的建立及其对中性粒细胞存活能力影响

单细胞转录组分析结果显示: CXCR2⁺中性粒细胞中不仅 G-CSF 受体基因 *Csf3r* 表达水平显著高于

CXCR2⁻亚群($P<0.05$),而且 GM-CSF 受体相关基因 *Csf2rb* 的表达水平也显著高于 CXCR2⁻亚群($P=0.0032$), *Csf2ra* 也呈升高趋势($P=0.1484$,图 2A),这提示可加入 GM-CSF 来进一步优化 MSC+G 条件培养体系为 MSC+2G,并评价其对不同亚群中性粒细胞存活能力的影响。首先比较不同培养条件对中性粒细胞存活率的影响,结果显示:与 MSC-3d 培养上清相比,单独加入 G-CSF 或 GM-CSF 后细胞存活率均进一步提高,而同时加入两者形成的 MSC+2G 体系维持效果最佳,培养至第 3 天时, MSC+2G 组存活率为 83.7%,显著高于 MSC+G 组(55.5%, $P<0.0001$,图 2B)。因此,选用 MSC+2G 作为优化后的培养体系,分析其对不同亚群中性粒细胞的影响,结果显示: MSC+2G 组在培养第 1、2、3 天均维持较高的细胞密度和较完整的细胞形态,而对照组细胞数量明显减少,且细胞形态逐渐出现皱缩和破碎(图 2C);细胞存活能力分析结果显示:培养至第 3 天时, CXCR2⁻亚群在对照组和 MSC+2G 组中的存活率分别为 17%和 68%($P<0.0001$), CXCR2⁺亚群分别为 4.3%和 79%($P<0.0001$,图 2D),提示 MSC+2G 可显著提高两亚群中性粒细胞的体外存活率,且 CXCR2⁺亚群在 MSC+2G 处理后的存活率的提升幅度更大。CLON-G 组两亚群中性粒细胞存活率整体高于 MSC+2G 组($P<0.05$),提示其体外维持效果整体仍优于 MSC+2G;细胞凋亡检测结果显示:培养至第 3 天, CXCR2⁻亚群在对照组和 MSC+2G 组中的凋亡比例分别为 68.4%和 10.4%, CXCR2⁺亚群分别为 86.0%和 11.3%(P 均<0.0001,图 2E 和图 2F), CLON-G 组凋亡比例与 MSC+2G 组接近($P>0.05$)。上述结果表明, MSC+2G 培养体系可显著提高中性粒细胞体外存活率并减少凋亡,虽然整体维持效果略低于 CLON-G,但已表现出较好的促存活作用,且对 CXCR2⁺亚群的维持作用更为明显。

2.3 MSC+2G 培养体系可持续维持中性粒细胞亚群功能

为评价 MSC+2G 培养体系对中性粒细胞功能维持的作用,检测 CXCR2⁻及 CXCR2⁺中性粒细胞在培养过程中吞噬功能和 ROS 生成能力的变化。结果显示: MSC+2G 组在培养过程中可持续维持两亚群中性粒细胞的吞噬能力(图 3A)。定量分析显示:对照组 CXCR2⁻中性粒细胞吞噬阳性细胞比例由 50%下降至 5.7%,而 MSC+2G 组第 3 天为 34.6%($P<0.05$),



A: 中性粒细胞亚群分选的流式细胞术门控策略; B: 分选后CXCR2⁺与CXCR2⁻中性粒细胞的瑞氏-吉姆萨染色形态; C: GSEA分析显示两亚群细胞在趋化、迁移及吞噬相关通路中的富集差异; D: 单细胞水平对两亚群细胞焦亡、炎症小体及铁死亡相关状态的评分比较; E: 锥虫蓝拒染法检测两亚群细胞在常规培养条件下各时间点的存活率; F: 两亚群细胞吞噬FITC标记酵母聚糖颗粒的代表性共聚焦图像(红色: 中性粒细胞, 绿色: 酵母聚糖颗粒); G: 两亚群细胞吞噬阳性率及吞噬指数的定量分析; H: 两亚群中性粒细胞ROS水平的定量分析[以平均荧光强度表示]. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

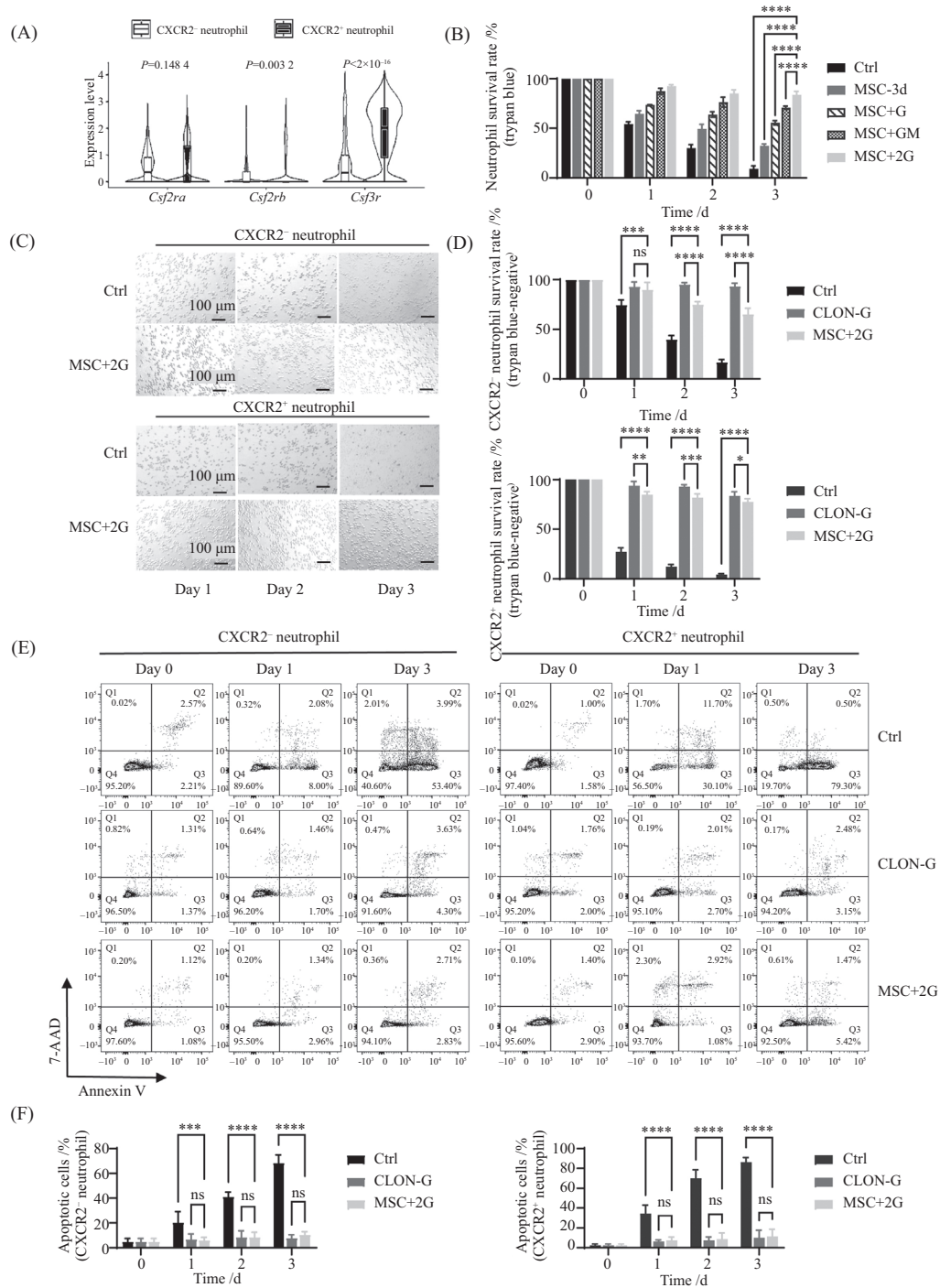
A: flow cytometric gating strategy for neutrophil subset sorting; B: Wright-Giemsa staining of sorted CXCR2⁺ and CXCR2⁻ neutrophils; C: GSEA showing differential enrichment of chemotaxis-, migration-, and phagocytosis-related pathways between the two neutrophil subsets; D: single-cell scoring of pyroptosis-, inflammasome-, and ferroptosis-related states in the two subsets; E: trypan blue exclusion assay showing the survival rate of the two neutrophil subsets at different time points under conventional culture conditions; F: representative confocal images showing phagocytosis of FITC-labeled zymosan particles by the two neutrophil subsets (red, neutrophils; green, zymosan particles); G: quantification of the percentage of phagocytic cells and the phagocytic index in the two subsets; H: quantification of ROS levels in the two neutrophil subsets [expressed as MFI (mean fluorescence intensity)]. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 比较和分析不同中性粒细胞亚群的特性

Fig.1 Characteristics of distinct neutrophil subsets

对照组CXCR2⁺中性粒细胞吞噬阳性细胞比例由90%下降至18.3%, 而MSC+2G组第3天仍维持在85%($P < 0.05$, 图3B); MSC+2G组在CXCR2⁻和

CXCR2⁺亚群中的吞噬指数均显著高于对照组(P 均 < 0.05 , 图3C); ROS检测结果显示: 培养至第3天, CXCR2⁻中性粒细胞在对照组和MSC+2G组中的平

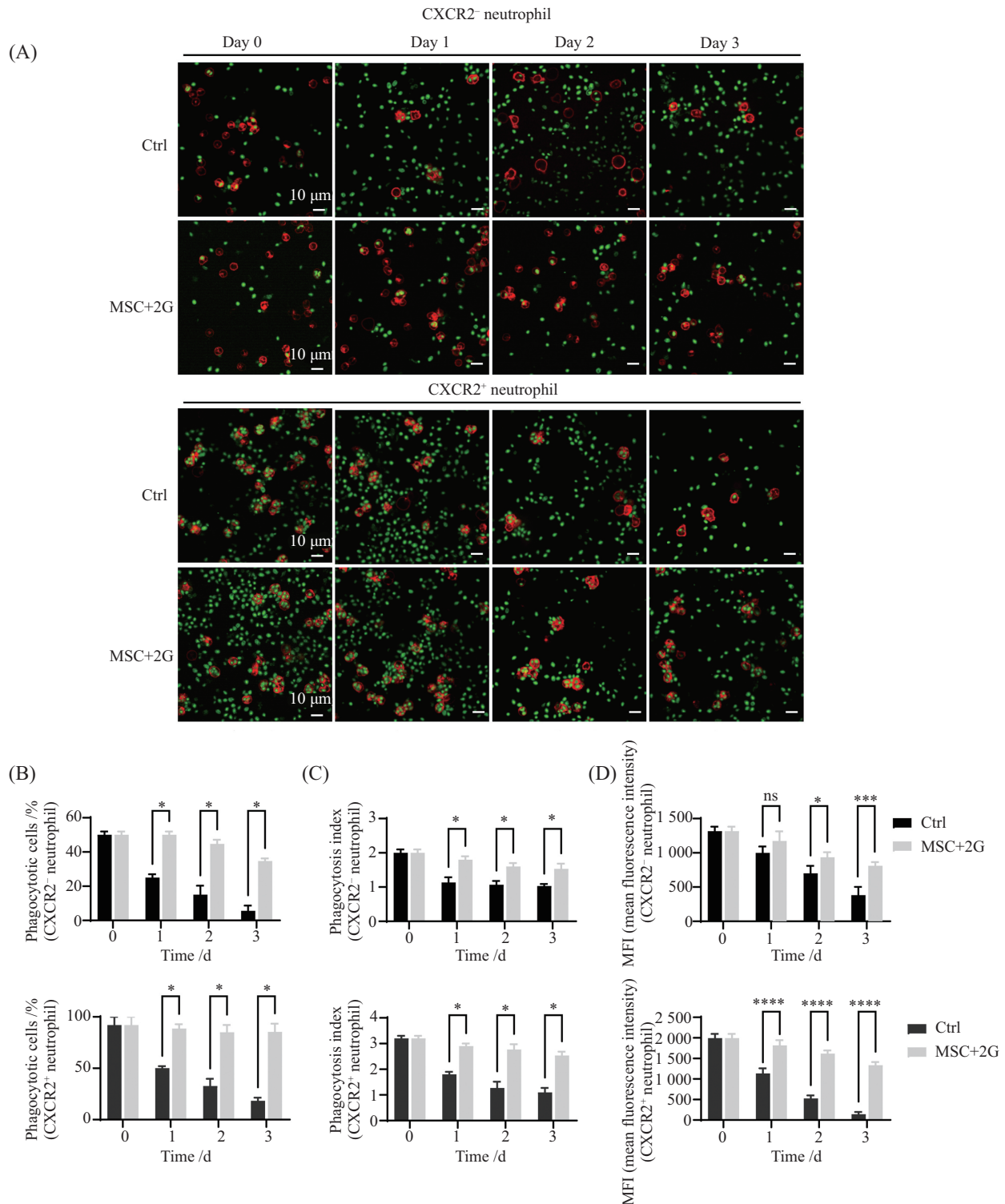


A: 单细胞转录组分析比较CXCR2⁻和CXCR2⁺中性粒细胞中G-CSF和GM-CSF受体相关基因的表达水平; B: 小鼠骨髓来源中性粒细胞在不同培养条件下各时间点的存活率比较(与MSC+2G比较); C: CXCR2⁻及CXCR2⁺中性粒细胞在不同培养条件下于培养第1、2、3天的光学显微镜图像; D: 锥虫蓝拒染法检测两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点的存活率; E: Annexin V/7-AAD双染流式细胞术检测两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点的凋亡情况; F: 两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点凋亡细胞比例的定量分析。^{ns}*P*>0.05, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1。

A: single-cell transcriptomic analysis comparing the expression levels of G-CSF and GM-CSF receptor-related genes between CXCR2⁻ and CXCR2⁺ neutrophils; B: survival rate of mouse bone marrow-derived neutrophils under different culture conditions at the indicated time points (compared with MSC+2G); C: bright-field images of CXCR2⁻ and CXCR2⁺ neutrophils cultured under different conditions on day 1, 2, and 3; D: trypan blue exclusion assay showing the survival rate of the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points; E: annexin V/7-AAD flow cytometric analysis of apoptosis in the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points; F: quantification of apoptotic cells in the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points. ^{ns}*P*>0.05, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1.

图2 MSC+2G培养体系的建立及其对中性粒细胞存活能力的影响

Fig.2 Establishment of the MSC+2G culture system and its effects on neutrophil survival



A: CXCR2⁻及CXCR2⁺中性粒细胞在对照组和MSC+2G组于培养第0、1、2、3天吞噬FITC标记酵母聚糖颗粒的共聚焦显微图像; B: 两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点吞噬阳性细胞比例的定量分析; C: 两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点吞噬指数的定量分析; D: 两亚群中性粒细胞在不同培养条件下各时间点ROS水平的定量分析。^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: representative confocal images showing phagocytosis of FITC-labeled zymosan particles by CXCR2⁻ and CXCR2⁺ neutrophils in the control and MSC+2G groups on day 0, 1, 2, and 3; B: quantification of the percentage of phagocytic cells in the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points; C: quantification of the phagocytic index in the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points; D: quantification of ROS levels in the two neutrophil subsets under different culture conditions at the indicated time points. ^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图3 MSC+2G培养体系可持续维持中性粒细胞亚群功能

Fig.3 The MSC+2G culture system sustains the functions of neutrophil subsets

均荧光强度分别为383和810($P < 0.001$), CXCR2⁺中性粒细胞的平均荧光强度分别为140和1 333($P < 0.000 1$, 图3D)。上述结果表明, MSC+2G培养体系可延缓两亚群中性粒细胞吞噬功能及ROS生成能力的减退, 其中对CXCR2⁺亚群高吞噬和高ROS功能状态的维持更为充分。

2.4 不同粒细胞亚群在不同培养体系中预培养后的存活能力分析

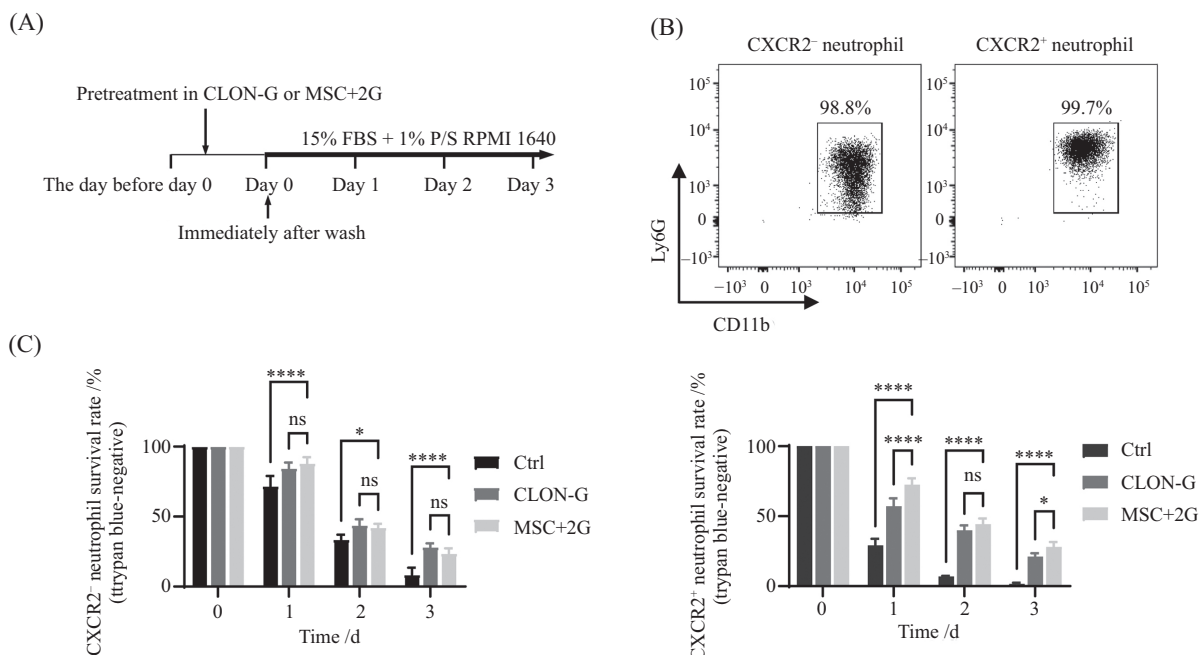
为模拟中性粒细胞临床输注前的处理过程和质量检测标准, 将CXCR2⁻和CXCR2⁺中性粒细胞分别在CLON-G或MSC+2G体系中培养24 h后恢复常规培养条件, 检测两亚群细胞后续存活能力(图4A)。结果显示: 两亚群中性粒细胞的CD11b⁺Ly6G⁺纯度均 $\geq 98\%$, 提示经不同培养条件处理后细胞纯度保持稳定(图4B); 细胞存活率结果显示: 在CXCR2⁻中性粒细胞中, MSC+2G组在后续培养第1、2、3天的存活率分别为88.0%、42.2%和23.7%, 均显著高于对照组的71.7%、33.6%和8.4%(P 均 < 0.05), 且与CLON-G组相比差异无统计学意义($P > 0.05$, 图4C左)。在CXCR2⁺中性粒细胞中, MSC+2G组对细胞存活率的维持作用更为明显, 第1、2、3天存活率分

别为72.6%、44.3%和28.0%, 均显著高于对照组的29.2%、7.0%和1.69%(P 均 $< 0.000 1$), 与CLON-G组相比略高($P < 0.05$, 图4C右)。结果提示, 中性粒细胞经MSC+2G体系培养24 h后, 在恢复常规培养条件下仍可保持较好的后续存活能力, 且对CXCR2⁺亚群的维持作用更为明显。

2.5 不同培养体系对中性粒细胞体内趋化及抗感染作用的影响

为评价不同培养体系处理后的中性粒细胞在体内向炎症部位的趋化能力及抗感染作用, 本研究在粒细胞缺乏模型的基础上, 分别通过LPS诱导的肺部炎症模型观察中性粒细胞的体内炎症趋化能力, 通过大肠埃希菌诱导的肺炎模型评价中性粒细胞输注后受体小鼠的生存情况(图5A)。结果显示: 环磷酰胺处理后受体小鼠外周血中性粒细胞计数由基线 $1.1 \times 10^9/L$ 下降至第4天的 $1.0 \times 10^8/L$, 提示中性粒细胞缺乏模型构建成功(图5B)。

在整体中性粒细胞输注实验中, LPS诱导肺部炎症模型结果显示: 新鲜中性粒细胞组、CLON-G培养24 h组和MSC+2G培养24 h组在肺组织总中性粒细胞中, CD45.1⁺供体来源的中性粒细胞所占比例



A: 实验流程示意图, P/S: 青霉素/链霉素双抗; B: 培养24 h后CXCR2⁻和CXCR2⁺中性粒细胞纯度检测的代表性流式图; C: 锥虫蓝拒染法检测两亚群中性粒细胞在不同培养体系培养24 h后, 在后续培养过程中各时间点的存活率。^{ns} $P > 0.05$, $*P < 0.05$, $****P < 0.000 1$ 。

A: schematic diagram of the experimental design, P/S: penicillin/streptomycin; B: representative flow cytometric plots showing the purity of CXCR2⁻ and CXCR2⁺ neutrophils after 24 h of culture; C: trypan blue exclusion assay showing the survival rate of the two neutrophil subsets at the indicated time points during subsequent culture after 24 h pretreatment in different culture systems. ^{ns} $P > 0.05$, $*P < 0.05$, $****P < 0.000 1$.

图4 不同粒细胞亚群在不同培养体系中预培养后的生存能力分析

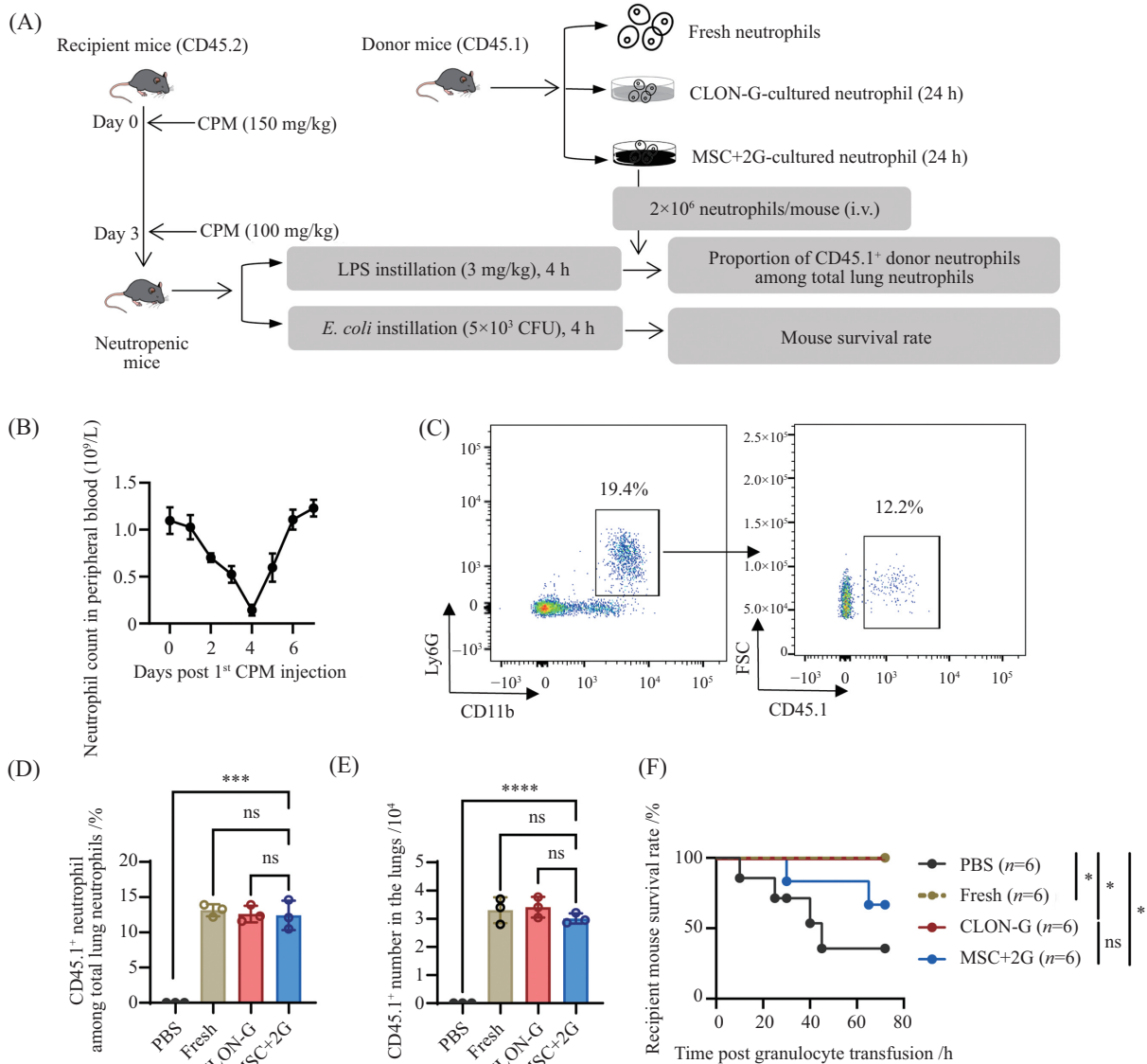
Fig.4 Survival of neutrophil subsets after pretreatment in different culture systems

分别为13.14%、12.60%和12.41%，三组间差异无统计学意义($P>0.05$, 图5C和图5D); 绝对数分析结果也显示, 三组间差异无统计学意义($P>0.05$, 图5E); 在大肠埃希菌诱导的粒缺肺炎模型中观察受体小鼠的生存情况, 结果显示: 新鲜中性粒细胞组、CLON-G组和MSC+2G组受体小鼠生存率均显著高于对照组(P 均 <0.05 , 图5F), 其中CLON-G组保护作用略优于

MSC+2G组, 但差异无统计学意义。上述结果提示, MSC+2G培养24 h后的整体中性粒细胞仍具有一定抗感染作用, 但其整体保护效果较CLON-G略弱。

2.6 MSC+2G培养体系对不同粒细胞亚群体内趋化及抗感染作用的影响

本研究基于上述小鼠粒缺和肺炎模型, 进一步开展了经过MSC+2G培养体系处理的不同亚群中性

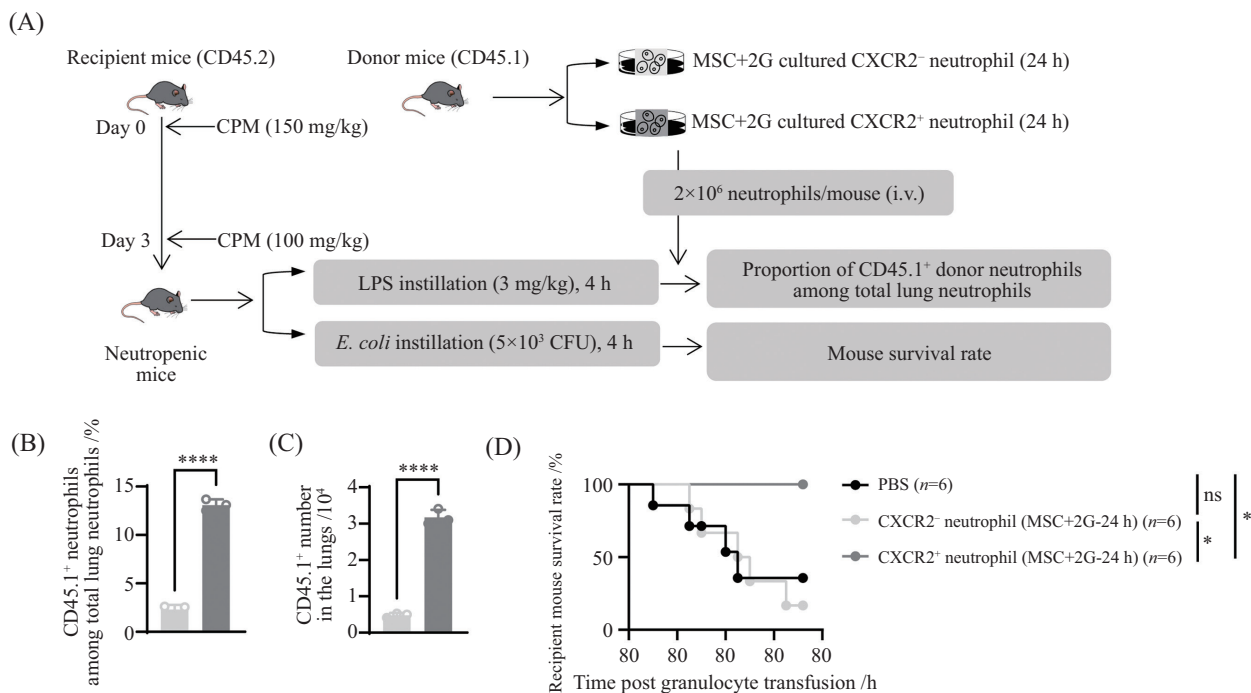


A: 实验流程图, i.v.: 静脉注射, CFU: 菌落形成单位; B: 环磷酰胺(CPM)诱导的粒细胞缺乏模型验证; C: LPS诱导肺部炎症模型中肺组织中供体来源CD45.1⁺中性粒细胞的代表性流式图; D: LPS诱导肺部炎症模型中肺组织总中性粒细胞中CD45.1⁺供体细胞所占比例的定量分析; E: LPS诱导肺部炎症模型中肺组织中CD45.1⁺中性粒细胞绝对数分析; F: 大肠埃希菌诱导肺炎模型中受体小鼠72 h生存曲线。^{ns} $P>0.05$, $*P<0.05$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

A: schematic diagram of the experimental design, i.v.: intravenous injection, CFU: colony-forming unit; B: validation of the cyclophosphamide-induced neutropenia model; C: representative flow cytometric plots of donor-derived CD45.1⁺ neutrophils in the lungs in the LPS-induced pulmonary inflammation model; D: quantification of the proportion of donor-derived CD45.1⁺ cells among total lung neutrophils in the LPS-induced pulmonary inflammation model; E: quantification of the absolute number of CD45.1⁺ neutrophils in the lungs in the LPS-induced pulmonary inflammation model; F: 72 h survival curves of recipient mice in the *E. coli*-induced pneumonia model. ^{ns} $P>0.05$, $*P<0.05$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$.

图5 不同培养体系对中性粒细胞体内趋化及抗感染作用的影响

Fig.5 Effects of different culture systems on the *in vivo* recruitment and antibacterial activity of neutrophils



A: 实验流程图; B: LPS诱导肺部炎症模型中肺组织总中性粒细胞中CD45.1⁺供体细胞所占比例的定量分析; C: LPS诱导肺部炎症模型中肺组织总中性粒细胞中CD45.1⁺中性粒细胞绝对数分析; D: 大肠埃希菌诱导肺炎模型中受体小鼠72 h生存曲线。^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

A: schematic diagram of the experimental design; B: quantification of the proportion of donor-derived CD45.1⁺ cells among total lung neutrophils in the LPS-induced pulmonary inflammation model; C: quantification of the absolute number of CD45.1⁺ neutrophils in the lungs in the LPS-induced pulmonary inflammation model; D: 72 h survival curves of recipient mice in the *E. coli*-induced pneumonia model. ^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

图6 MSC+2G培养体系对不同粒细胞亚群体内趋化及抗感染作用的影响

Fig.6 Effects of the MSC+2G culture system on the *in vivo* recruitment and antibacterial activities of distinct neutrophil subsets

粒细胞的体内输注治疗实验(图6A), LPS诱导肺部炎症模型结果显示: MSC+2G培养24 h后的CXCR2⁺中性粒细胞在肺组织总中性粒细胞中的比例和绝对数均显著高于CXCR2⁻亚群(13.09% vs 2.3%, 3.2×10^4 vs 5.0×10^3 , P 均 <0.0001 , 图6B和图6C);在大肠埃希菌诱导的粒缺肺炎模型中观察受体小鼠的生存情况, 结果显示: MSC+2G培养24 h后的CXCR2⁺中性粒细胞与CXCR2⁻中性粒细胞相比能显著提高受体小鼠的生存率($P<0.05$), 而CXCR2⁻组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$, 图6D)。这些结果提示, MSC+2G培养体系处理后的中性粒细胞体内趋化及抗感染作用主要由CXCR2⁺亚群介导。

3 讨论

中性粒细胞减少或功能受损常见于血液系统疾病、造血干细胞移植以及肿瘤化疗过程中, 此类患者一旦发生持续粒细胞缺乏, 感染风险和感染相关死亡风险均明显升高^[12]。当前临床处理主要依赖抗生素和G-CSF等支持治疗, 但在耐药菌增多、

感染负荷重或骨髓恢复缓慢的情况下, 单纯依赖上述措施往往难以获得理想效果^[13-14]。因此, 粒细胞输注一直被视为改善粒缺状态、增强宿主抗感染能力的潜在策略, 但其推广长期受限, 关键原因并不在于治疗理念本身, 而在于中性粒细胞离体后寿命短、功能衰减快, 难以在体外维持足够数量和有效活性^[5,15]。本研究即围绕这一问题展开, 主要关注不同亚群的应用潜力及其体外维持策略。

本研究提示, 不同中性粒细胞亚群在输注价值上并不均一。与CXCR2⁻亚群相比, CXCR2⁺亚群在吞噬功能、ROS生成及体内趋化方面均表现出更强的效应特征, 同时在转录组层面呈现趋化和吞噬相关通路上调。这说明CXCR2不仅是一个分群标志, 还在一定程度上反映了中性粒细胞的功能状态和输注潜力。一方面, CXCR2⁺亚群具有更强的效应功能; 另一方面, CXCR2⁺亚群在常规培养条件下更易发生死亡, 提示其高效应特征与较高耗竭倾向并存。相比之下, CXCR2⁻亚群功能较弱, 且经短期体外刺激后其吞噬及ROS生成能力并未出现明显提

升,这提示CXCR2⁺亚群不能被视为可通过短期干预轻易转化为高效应细胞的简单储备库。由此看,粒细胞应用的重点不应是普遍激活全部中性粒细胞,而应是优先识别并维持真正具有输注价值的优势亚群。

基于这一点,本研究进一步对培养体系进行了优化。前期研究及相关文献已提示,MSC培养上清及MSC培养上清联合G-CSF能够在一定程度上延缓中性粒细胞死亡并维持其功能^[16-18]。本研究在此基础上进一步引入GM-CSF,建立MSC+2G体系。其依据在于CXCR2⁺亚群对GM-CSF相关信号可能更为敏感,而结果也表明,MSC+2G在延长CXCR2⁺亚群体外存活时间、降低细胞凋亡率并维持其吞噬和ROS功能方面均表现出较好效果。需要强调的是,MSC+2G的意义不在于单纯延长细胞寿命,而在于尽可能同步维持优势亚群的存活和功能。

为进一步验证MSC+2G体系在维持优势亚群功能方面的作用,本研究开展了体内输注实验。整体中性粒细胞输注结果表明,MSC+2G培养24 h后的中性粒细胞仍具有较好的体内趋化能力和抗感染保护作用,这说明该体系并未因延长体外存活时间而明显削弱细胞进入体内后的基本效应。进一步分群分析显示这种体内效应主要由CXCR2⁺亚群介导。也就是说,MSC+2G维持的不仅是中性粒细胞的存活状态,更重要的是保留了在体内输注过程中发挥关键作用的CXCR2⁺高效应亚群。这一点对于粒细胞输注尤为重要,因为真正具有临床意义的不是单纯延长细胞寿命,而是在延长寿命的基础上保留细胞的有效迁移和抗感染能力,这也为进一步评价MSC+2G与现有优化培养体系的相对价值提供了依据。

在此基础上,再看MSC+2G与CLON-G的比较,其意义就更清楚了。本研究结果显示,MSC+2G在维持CXCR2⁺中性粒细胞存活、功能及体内效应方面已接近CLON-G,但在部分指标上CLON-G仍略占优势。需要指出的是,CLON-G体系中包含多种非临床用药,其后续转化应用存在一定限制;相比之下,MSC+2G主要由MSC培养上清、G-CSF和GM-CSF构成,其中G-CSF和GM-CSF均具有明确的临床应用基础^[18-19]。因此,MSC+2G的意义不在于全面超越CLON-G,而在于在取得较好维持效果的同时,提供一种更简洁也更具转化可行性的候选体

系。

综上,本研究提示,CXCR2⁺中性粒细胞是更具输注潜力的优势亚群,而优化的MSC+2G条件培养体系能够在较好维持其功能和体内应用能力的同时,显著延长其体外存活时间,且整体效果已达到国际报道的先进水平。这将为中性粒细胞的短期保存和粒细胞输注提供一种较为切实可行的解决方案和研究方向。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG F Y, XIA Y D, SU J Y, et al. Neutrophil diversity and function in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 343.
- [2] SHAHZAD A, NI Y L, YANG Y F, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in health and disease [J]. *Mol Biomed*, 2025, 6(1): 130.
- [3] GEA-BANACLOCHE J. Granulocyte transfusions: a concise review for practitioners [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(11): 1256-69.
- [4] BAYKARA Y, JAMAL Y, NGUYEN A, et al. Granulocyte transfusion in pediatric and adult neutropenic patients: a 16-year retrospective review [J]. *Cureus*, 2025, 17(5): e83578.
- [5] FAN Y P, TENG Y, LOISON F, et al. Targeting multiple cell death pathways extends the shelf life and preserves the function of human and mouse neutrophils for transfusion [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(604): eabb1069.
- [6] XIE X M, SHI Q, WU P, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1119-33.
- [7] GYSEMANS C, BEYA M, PEDACE E, et al. Exploring neutrophil heterogeneity and plasticity in health and disease [J]. *Biomedicines*, 2025, 13(3): 597.
- [8] DELOBEL P, GINTER B, RUBIO E, et al. CXCR2 intrinsically drives the maturation and function of neutrophils in mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1005551.
- [9] LAZENNEC G, RAJARATHNAM K, RICHMOND A. CXCR2 chemokine receptor-a master regulator in cancer and physiology [J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(1): 37-55.
- [10] 范玉龙, 孔鑫垚, 王永荣, 等. 脐带间充质干细胞共培养对中性粒细胞存活和免疫功能的影响[J]. *免疫学杂志(FAN Y L, KONG X Y, WANG Y R, et al. The modulation of neutrophil survival and immune functions via coculturing with human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Immunological Journal)*, 2021, 37(1): 8-16.
- [11] 王彤, 范玉龙, 邵雅, 等. 体外长期维持中性粒细胞活性的条件培养体系的建立[J]. *中国细胞生物学学报(WANG T, FAN Y L, SHAO Y, et al. Establishment of a conditioned culture system to maintain the activity of neutrophils *in vitro* for a long time [J]. Chinese Journal of Cell Biology)*, 2024, 46(7): 1367-76.
- [12] STOHS E J, ABBAS A, FREIFELD A. Approach to febrile neutropenia in patients undergoing treatments for hematologic malignancies [J]. *Transpl Infect Dis*, 2024, 26(2): e14236.
- [13] LEHRNBECHER T, ROBINSON P D, AMMANN R A, et al. Guideline for the management of fever and neutropenia in pe-

- diatric patients with cancer and hematopoietic cell transplantation recipients: 2023 update [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(9): 1774-85.
- [14] CRAWFORD J, HERNDON D, GMITTER K, et al. The impact of myelosuppression on quality of life of patients treated with chemotherapy [J]. *Future Oncol*, 2024, 20(21): 1515-30.
- [15] FILEP J G. Targeting neutrophils for promoting the resolution of inflammation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 866747.
- [16] AUBIN M R, PAZ A H, ARAÚJO A B. The impact of mesenchymal stromal cells on neutrophils: a concise review [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2023, 18(7): 878-91.
- [17] LIANG Y Q, LOU X L, XU Y Z, et al. Protection of neutrophils by bone marrow mesenchymal stromal cells is enhanced by tumor-associated inflammatory cytokines [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1361596.
- [18] VAN RAAM B J, DREWNIAK A, GROENEWOLD V, et al. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3 [J]. *Blood*, 2008, 112(5): 2046-54.
- [19] CASTELLANI S, D'ORIA S, DIANA A, et al. G-CSF and GM-CSF modify neutrophil functions at concentrations found in cystic fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12937.