

微重力培养条件对造血干祖细胞分化为功能成熟的中性粒细胞的影响

王哲哲 张潇予 张苏东 谢忻琰 刘鹏 相菲 任仟
谢雪梅 郭荣霞 刘飞 王彤 许元富*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 该文采用旋转培养方式研究微重力培养条件对造血干祖细胞向中性粒细胞分化的效率和功能的影响。脐血CD34⁺细胞用扩增体系[StemSpan SFEM培养基、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、Fms相关酪氨酸激酶3受体(Fms-related tyrosine kinase 3 ligand, Flt3)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)]静置培养7 d后, 再分成静置培养(static culture, SC)组和旋转培养(rotate cell culture system, RCCS)组, 并换为分化培养体系[StemSpan SFEM培养基、IL-6、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、SCF、Flt3、IL-3]再培养9 d。培养过程中用流式细胞术检测CD34、CD38、CD11b、CD16b、CD66b比例, 第16 d收集细胞进行中性粒细胞功能检测。结果表明, RCCS组和SC组均能形成形态正常和功能成熟的中性粒细胞, RCCS组CD16b⁺的中性粒细胞比例显著增多(29.82%±2.48% vs 15.01%±0.62%, $P<0.01$), 且细胞产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的能力显著增强($P<0.05$), 具有趋化运动能力的细胞增多(50.430%±3.275% vs 34.000%±0.700%, $P<0.05$)、运动速度增快(8.100±0.404 $\mu\text{m}/\text{min}$ vs 5.850±0.050 $\mu\text{m}/\text{min}$, $P<0.05$)。该文结果提示, 微重力培养条件能促进造血干祖细胞分化为形态正常和功能成熟的中性粒细胞。

关键词 旋转细胞培养; CD34⁺细胞; 中性粒细胞; 分化

Effect of Simulated Microgravity on the Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell into Functionally Mature Neutrophil

Wang Zhezhe, Zhang Xiaoyu, Zhang Sudong, Xie Xinyan, Liu Peng, Xiang Fei, Ren Qian,
Xie Xuemei, Guo Rongxia, Liu Fei, Wang Tong, Xu Yuanfu*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract This paper aims to determinate the impact of the RCCS (rotate cell culture system) on granulopoiesis of hematopoietic stem/progenitor cells and evaluate the efficiency of functionally mature neutrophil generation. CD34⁺ cells enriched from umbilical cord blood were cultured in StemSpan SFEM containing SCF (stem cell factor), Flt3 (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand), IL-3 (interleukin-3) and TPO (thrombopoietin). After

收稿日期: 2017-03-05 接受日期: 2017-04-17

重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB964903)、中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2016-12M-1-003)和国家自然科学基金(批准号: 31471116、81600083)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909415, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: March 5, 2017 Accepted: April 17, 2017

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2015CB964903), Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2016-12M-1-003) and National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471116, 81600083)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909415, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2017-05-27 15:21:21

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1521.004.html>

7 days, cells were cultured in medium containing SCF, Flt3, IL-3, IL-6 and G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). After 7 days of expansion, those cells were divided into 2 groups, SC (static culture) group and RCCS group, and separately cultured for next 9 days inducing granulocyte differentiation. To evaluate the differentiate efficiency, the expression of surface markers, such as CD34, CD38, CD11b, CD16b and CD66b were detected by flow cytometry. On day 16, cells were harvested and numerical expansion, cell morphology, chemotaxis, phagocytosis and ROS production were used for evaluating the quality and quantity of neutrophils from the two groups. Both groups could successfully induce functionally mature neutrophils, while the percentage of CD16b⁺ cells in RCCS group was higher than that in SC group (29.82%±2.48% vs 15.01±0.62%, $P<0.01$). Compared to the SC group, RCCS could increase the efficiency of neutrophil ROS production and chemotaxis ($P<0.05$). Altogether, these results indicated that the RCCS significantly promoted the efficiency of generation of functionally mature neutrophil from hematopoietic stem and progenitor cells.

Keywords rotate cell culture system; CD34⁺ cell; neutrophils; differentiation

中性粒细胞来源于造血干细胞,在骨髓中分化成熟后,进入血液和组织,是机体防御外来微生物入侵的第一道防线,是天然免疫系统中重要的效应细胞。中性粒细胞输注是临床治疗感染性疾病的一种有效方案,但细胞来源一直是限制该种疗法广泛应用的主要原因之一。近年来,随着造血干细胞体外诱导分化研究的深入,涌现出一些克服以上问题的新方法。旋转培养系统(rotate cell culture system, RCCS)是由美国国家航空航天局模拟微重力环境设计出的一种水平旋转的三维圆柱形悬浮培养体系^[1],近年来被用于造血干细胞研究。该体系的优点是使培养基中的物质时刻保持均一化,并促进细胞分散化以及与环境中的养分和氧气交换等^[2-4]。目前,旋转培养已在多种细胞的培养、增殖和分化等方面进行研究,结果表明,该培养体系能促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化^[5]以及促进造血干细胞向血小板分化^[6]等。最新的研究结果显示,旋转细胞培养使血小板形成效率较静置培养(static culture, SC)提高3.7倍^[6],但有关造血干细胞向中性粒细胞分化的研究还未见报道。基于上述研究背景,我们拟采用旋转培养体系培养脐血来源的造血干祖细胞向中性粒细胞分化,同时以常规静置培养为对照,对比分析2种培养体系诱导分化出的中性粒细胞的功能成熟性和分化效率,以期评价微重力条件是否能促进中性粒细胞的分化及生成中性粒细胞功能的成熟。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

StemSpanTM SFEM无血清培养基购自Stem Cell

Technologies公司。干细胞因子(stem cell factor, SCF)、Fms相关酪氨酸激酶3受体(Fms-related tyrosine kinase 3 ligand, Flt3)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)、IL-6和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)购自Peprotech公司。CD34⁺细胞磁珠分选试剂盒和LS分选柱购自美天旎生物技术有限公司。旋转细胞培养器购自Synthecon Inc公司。细胞动态可视化系统购自日本ECI公司。转盘式共聚焦显微实时成像系统购自美国PerkinElmer公司。

1.2 人脐血CD34⁺细胞的分离与制备

采集新生儿脐带血,用羟基淀粉沉降红细胞后,使用Ficoll淋巴细胞分离液于2 000 r/min离心20 min,分离出单个核细胞。在单个核细胞中加入免疫球蛋白Fc段受体(Fc-receptor, Fc-R)阻断剂和CD34免疫磁珠孵育30 min后过柱。磁珠分选2次得到较纯的CD34⁺细胞。细胞计数后用APC标记鼠抗人CD34抗体染色,流式细胞术检测CD34⁺所占比例。

1.3 细胞培养

细胞扩增阶段: CD34⁺细胞按照 1×10^5 /mL的细胞密度每孔2 mL接种于6孔板中静置培养7 d,分别第4 d和第7 d换液。扩增培养体系: StemSpanTM SFEM无血清培养基、SCF(20 ng/mL)、Flt-3(20 ng/mL)、TPO(50 ng/mL)、IL-3(20 ng/mL)。细胞分化阶段: 扩增培养7 d后,分为SC组和RCCS组再培养9 d,细胞接种密度为 3×10^5 /mL,每3 d换液1次。分化培养体系: StemSpanTM SFEM无血清培养基、SCF(20 ng/mL)、Flt-3(20 ng/mL)、G-CSF(100 ng/mL)、IL-3(20 ng/mL)、IL-6(20 ng/mL)。RCCS(rotate cell culture system)组

按与SC(static culture)组相同细胞密度接种到旋转生物反应器的10 mL腔体中,整个装置放置在5% CO₂细胞培养箱中,转速20 r/min,其他培养条件与静置培养组相同。

1.4 瑞氏-姬姆萨染色

用100 μL生理盐水重悬 6×10^4 细胞,700 r/min离心5 min甩片。晾干后滴加1:2的瑞氏染液和缓冲液染色20 min,冲洗,晾干,镜检。

1.5 细胞表面标志分子的检测

收集 2×10^5 细胞,用PBS将体系调整为200 μL,分为2组。其中,一组加入1 μL鼠抗人CD34抗体、1 μL鼠抗人CD38抗体;另外一组加入1 μL鼠抗人CD33抗体、1 μL鼠抗人CD11b抗体、1 μL鼠抗人CD16b抗体、1 μL鼠抗人CD66b抗体。2组均混合均匀,于4 °C染色30 min。清洗抗体后过滤300 μL至流式管进行流式检测。

1.6 细胞迁移趋化实验

RPMI-1640培养基孵育细胞1 h,将每种细胞分为2组,即实验组和对照组。对照组不加趋化剂刺激,实验组加入趋化剂白三烯B4(leukotriene B4, LTB4),浓度为25 ng/mL,使用TAXIScan-FL细胞动态可视化系统记录细胞运动,每30 s拍摄1次,持续拍摄30 min,并用Tracking Tool™(Gradientech)软件比较分析细胞的运动方向和速度等数据。

1.7 细胞吞噬实验——酵母聚糖颗粒

细胞用RPMI-1640培养基孵育2 h后与10%血清调制的酵母聚糖颗粒混匀,再避光孵育1 h。SC组和RCCS组培养的细胞各分为对照组和实验组,对照组置于4 °C孵育,实验组置于37 °C孵育。孵育后加入1 μL PE标记鼠抗人CD66b,混匀,放置30 min,清洗抗体,200 μL PBS重悬后,铺放至共聚焦小皿中,用双转盘激光共聚焦显微镜拍照。分别统计37 °C下SC组和RCCS组分化的细胞吞噬指数和吞噬百分率。吞噬指数即随机选取100个细胞,统计这些细胞所吞噬的颗粒数量。吞噬百分率是指随机选取100~300个细胞,计算其中发生吞噬行为的细胞比例。

1.8 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的测定

3×10^6 细胞用600 μL含0.1% BSA的PBS重悬后平分于96孔板的6个孔中,每孔100 μL。按以下浓度配制鲁米诺化学发光反应混合物:Luminol 50 μmol/L(12 μL)、HRP(horse reddish peroxidase) 4 U/mL(9.6 μL)、

fMLP(Formyl-Met-Leu-Phe) 500 nmol/L(1.2 μL),PBS补齐溶液至100 μL,对照组将fMLP换成PBS即可。反应混合物预加载到酶标仪自动进样系统中,设置自动进样程序进行检测,以最小时间间隔连续读数,持续检测20 min,收集和分析数据。

1.9 细胞扩增倍数与细胞数的计算方法

细胞扩增倍数=换液收集细胞数/接种细胞数;整个培养过程的总扩增细胞数=每次换液所得扩增倍数的积。

1.10 统计学处理

采用SPSS 16软件包进行分析,数据以均数±标准差表示,采用 t 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

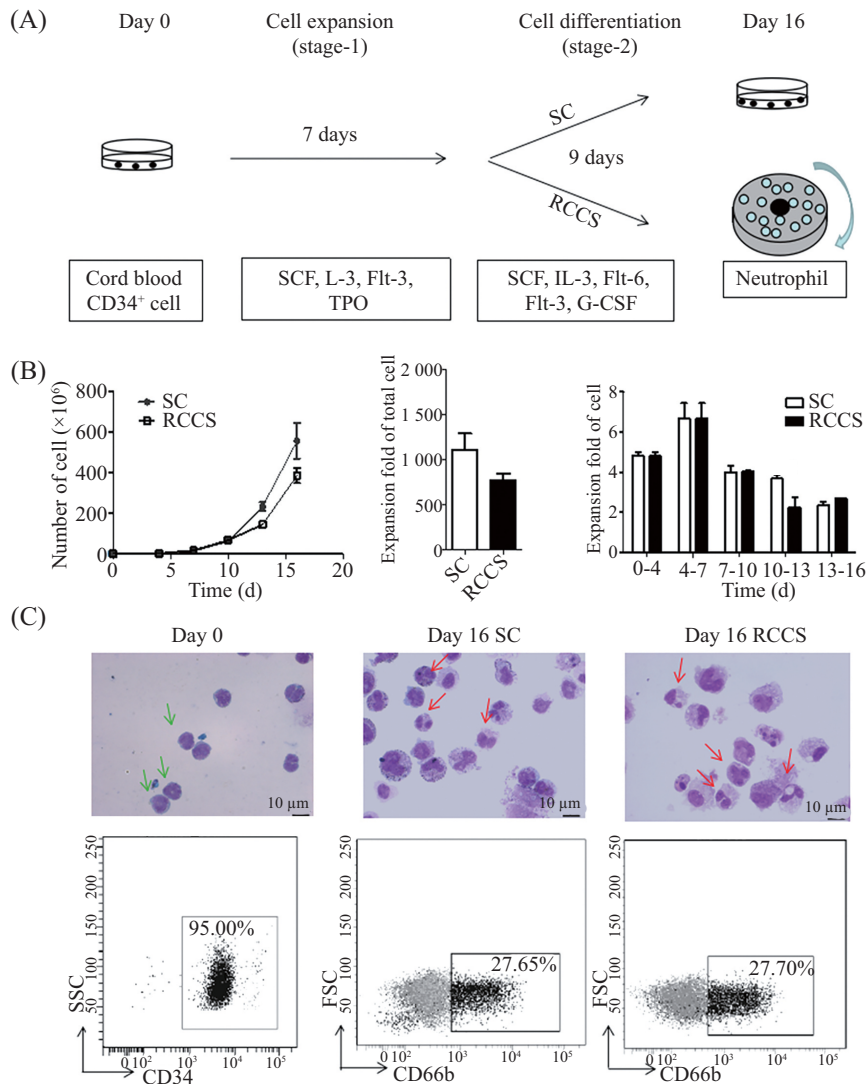
2 结果

2.1 SC和RCCS培养方式扩增及分化结果

首先,用免疫磁珠分选法从脐血中分离CD34⁺细胞,按流程图顺序培养(图1A)。经多次实验,最终结果显示,SC组和RCCS组整个培养过程细胞都是出于细胞数目增多的状态,总的增殖倍数分别为 $1\ 112.00 \pm 175.60$ 和 771.00 ± 73.84 倍;分段分析可知,扩增阶段的细胞扩增倍数为32.40倍;分化阶段中,SC组的细胞增殖倍数是34.00倍,RCCS组则为23.00倍,2组产生差别的培养时间段出现在第10~13 d,此时RCCS组扩增倍数比SC组低,但差异无统计学意义(图1B)。第0 d脐血分离的细胞经流式细胞术检测CD34阳性比例为 $97.17\% \pm 1.30\%$,细胞呈圆形或类椭圆形,胞核较大,约占细胞的2/3,核染色质呈细粒状,排列均匀,无浓集,核仁明显,呈现原始细胞形态。培养16 d后,SC组和RCCS组均出现典型的杆状和分叶核中性粒细胞样细胞,同时用CD66b抗体标记中性粒细胞发现,两组均有27.00%的细胞被标记(图1C)。

2.2 微重力条件对造血干祖细胞分化过程及分化细胞形态的影响

在培养各阶段均采用流式细胞术检测细胞表面CD34、CD38、CD11b、CD16b、CD66b等水平,以此来动态监测造血干祖细胞向中性粒细胞的分化过程。结果显示,在造血干祖细胞扩增培养的前4 d,CD34⁺细胞(造血干祖细胞)比例一直维持在90%以上的高水平,随后下降,16 d时已降至4%以下。进一步分析发现,第0 d分离出来的细胞中CD34⁺CD38⁻



A: 诱导脐造血干细胞向成熟中性粒细胞分化的过程; B: 细胞数目变化、总增殖倍数(day 16/day 0)和不同培养阶段扩增倍数; C: 第0 d分离纯化的CD34⁺细胞比例和形态、第16 d SC组和RCCS组细胞形态图及CD66b⁺细胞比例, 绿色箭头指CD34⁺细胞, 红色箭头指形态正常的中性粒细胞。
A: the process of the culture system used to direct the differentiation of umbilical CD34⁺ cells into mature neutrophils; B: the variation of total cell number, the total expansion fold (day 16/day 0) and the expansion fold at various stages; C: the percentage and morphology of CD34⁺ cell on day 0; the morphology and the percentage of CD66b⁺ cell in the SC group and RCCS group, respectively. CD34⁺ cell indicated by green arrows and mature neutrophil indicated by red arrows.

图1 体外静置培养(SC)和旋转细胞培养(RCCS)诱导造血干祖细胞向中性粒细胞分化的过程及效率

Fig.1 The process and efficiency of granulopoiesis of hematopoietic stem and progenitor cell in SC and RCCS

细胞(通常指造血干细胞)所占比例为35.65%±3.85%, 扩增培养4 d后该亚群细胞所占比例达到80%, 随后该群细胞的增殖和分化的变化趋势与上述CD34⁺亚群相同, 呈现持续下降的趋势(图2A)。在诱导细胞分化阶段, 静置和旋转培养体系中CD34⁺细胞所占比例均迅速降低, 而髓系细胞(CD11b⁺)和中性粒细胞(CD16b⁺和CD66b⁺)所占比例逐渐增加。培养到第16 d时, 成熟中性粒细胞表面蛋白质分子CD66b⁺细胞的比例均达到27%。2种诱导分化培养体系中, CD16b⁺细胞所占比例从细胞分化的起始阶段就已

产生差异, 且随着分化的进程差异逐渐加大。培养到第16 d时, SC组与RCCS组的CD16b⁺细胞比例分别为15.01%±0.62%和29.82%±2.48%, RCCS组的CD16b⁺细胞所占比例与SC组的相比显著提高(图2B, $P<0.01$)。

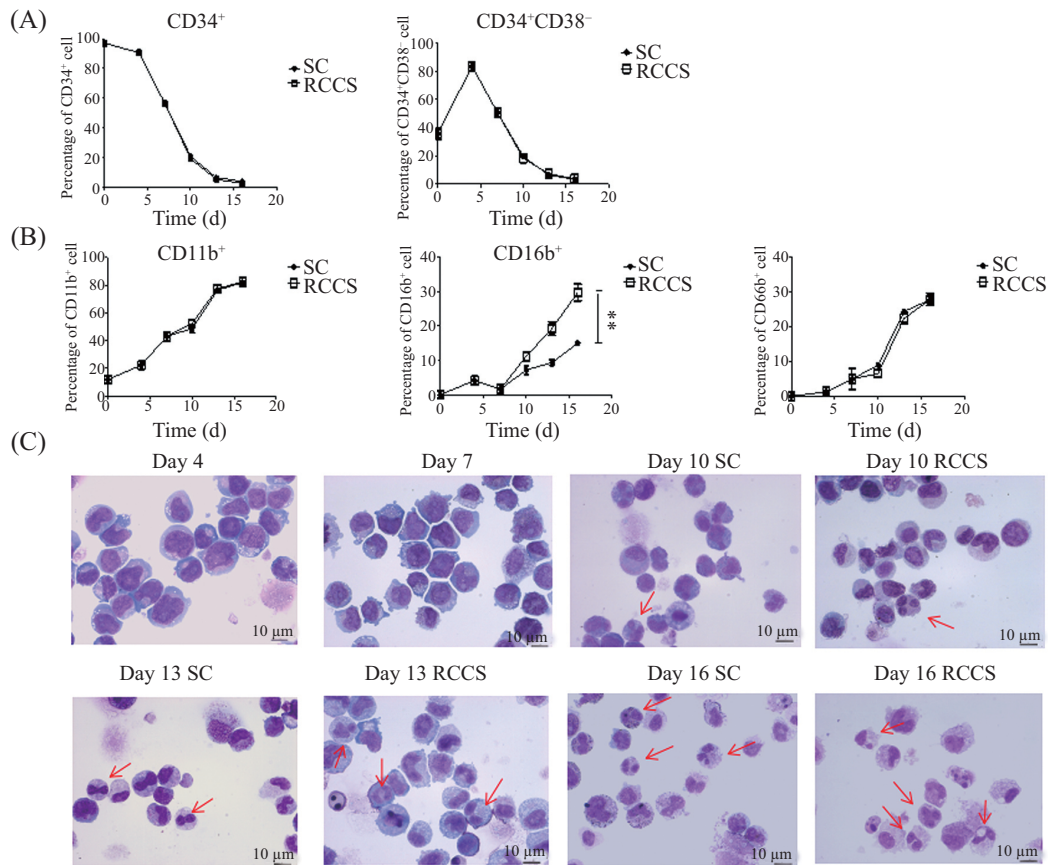
在细胞培养过程中, 我们还通过瑞氏染色法来动态观察培养过程中细胞形态变化。图2C为各阶段细胞形态图。将各阶段图中的细胞经过分类计数, 结果显示, 培养的前4 d, 90%以上细胞维持原始细胞形态, 4 d后有部分细胞分化成早幼粒细胞, 但未

见中性粒细胞样的细胞。7 d后基于细胞核形态及胞质颗粒来比较分析SC组和RCCS组细胞分化差异,发现2组中早幼粒、中幼粒、晚幼粒细胞及成熟中性粒细胞所占比例随着分化进程均发生相应变化。其中,后者由原始粒细胞向下分化速率较快,尤其是培养到第13 d时, RCCS组原始粒细胞占总细胞比例

比SC组低, 而早幼粒、中幼粒和成熟中性粒细胞所占比例比SC组高。培养至第16 d时, 2组中成熟中性粒细胞占总细胞比例均超过20%(表1)。

2.3 微重力条件对形成的中性粒细胞功能的影响

当机体发生感染后, 外周血中的中性粒细胞就会迅速穿越血管内皮单层, 并趋化到局部组织, 通



A: 培养过程中造血干细胞相关表面分子标志的变化; B: 髓系各亚群表面分子标记的变化; C: 各阶段亚群组成形态观察图, 红色箭头指成熟中性粒细胞。

A: the variation of surface molecular markers of the stem and progenitor cells in cell culture process; B: the variation of surface molecular markers of the myeloid subpopulations; C: the morphology of different subpopulations at various stages, the mature neutrophil indicates by red arrows.

图2 培养各阶段细胞表面和形态变化

Fig.2 The variation of morphology and surface markers during the culture

表1 造血干细胞向中性粒细胞分化过程中的各阶段细胞占细胞总数的比例(%)

Table 1 The percentage of each subpopulation in the process of differentiation of hematopoietic stem and progenitor cell into neutrophil (%)

细胞类型 Cell type	第4天 Day 4	第7天 Day 7	第10天 Day 10		第13天 Day 13		第16天 Day 16	
			SC	RCCS	SC	RCCS	SC	RCCS
Myeloblasts	92.7	72.0	15.0	11.4	4.2	2.5	-	-
Promyelocytes	2.4	24.0	30.0	29.5	13.9	22.5	15.6	16.7
Myelocytes	-	-	25.0	31.8	30.6	32.5	22.2	23.8
Metamyelocytes	-	-	17.5	18.2	37.5	27.5	35.6	33.3
Mature neutrophils	-	-	7.5	6.8	9.7	12.5	22.2	21.4

过吞噬作用、释放颗粒酶和ROS来发挥杀菌作用。因此,我们采用3种精细的分析方法(鲁米诺化学发光法检测fMLP激活作用下ROS的释放、TAXIScan可视化操作系统检测中性粒细胞的趋化作用以及用共聚焦显微镜观察中性粒细胞吞噬酵母聚糖颗粒的能力)分别测定由造血干祖细胞分化来的中性粒细胞的趋化、吞噬和释放ROS能力。研究结果显示,SC和RCCS细胞在趋化剂LTB₄的作用下,均出现定向迁移运动,RCCS组细胞15 min左右迁移过整个130 μm通道,而SC组需要更长的时间(图3A),随机选取图3A中发生迁移的细胞描绘细胞的运动轨迹,通过统计,SC组和RCCS组细胞发生迁移的细胞比例分别为34.000%±0.700%和50.430%±3.275%,迁移速度分别为5.850±0.050 μm/min和8.100±0.404 μm/min,提示来源于RCCS组的分化细胞在具有趋化能力的细胞数和趋化速率方面均明显高于SC组($P<0.05$,图3B)。Grademoch Tracking Tool™软件量化分析细胞运动的方向性的结果表明,2组细胞间无明显差异($P>0.05$,图3C)。共聚焦显微镜的观察结果显示,2组细胞均有吞噬功能,且RCCS组的分化细胞在吞噬百分率与吞噬指数上均高于SC组(SC组和RCCS组吞噬指数分别为69.0±2.0和78.5±3.5,中性粒细胞的吞噬百分率分别为12.25%±0.08%和16.43%±3.93%),但两者之间差异均无统计学意义($P>0.05$,图3D和图3E)。在fMLP刺激下,SC组与RCCS组的诱导分化细胞均可产生ROS,但后者ROS释放量较前者有明显增高($P<0.05$,图3F)。

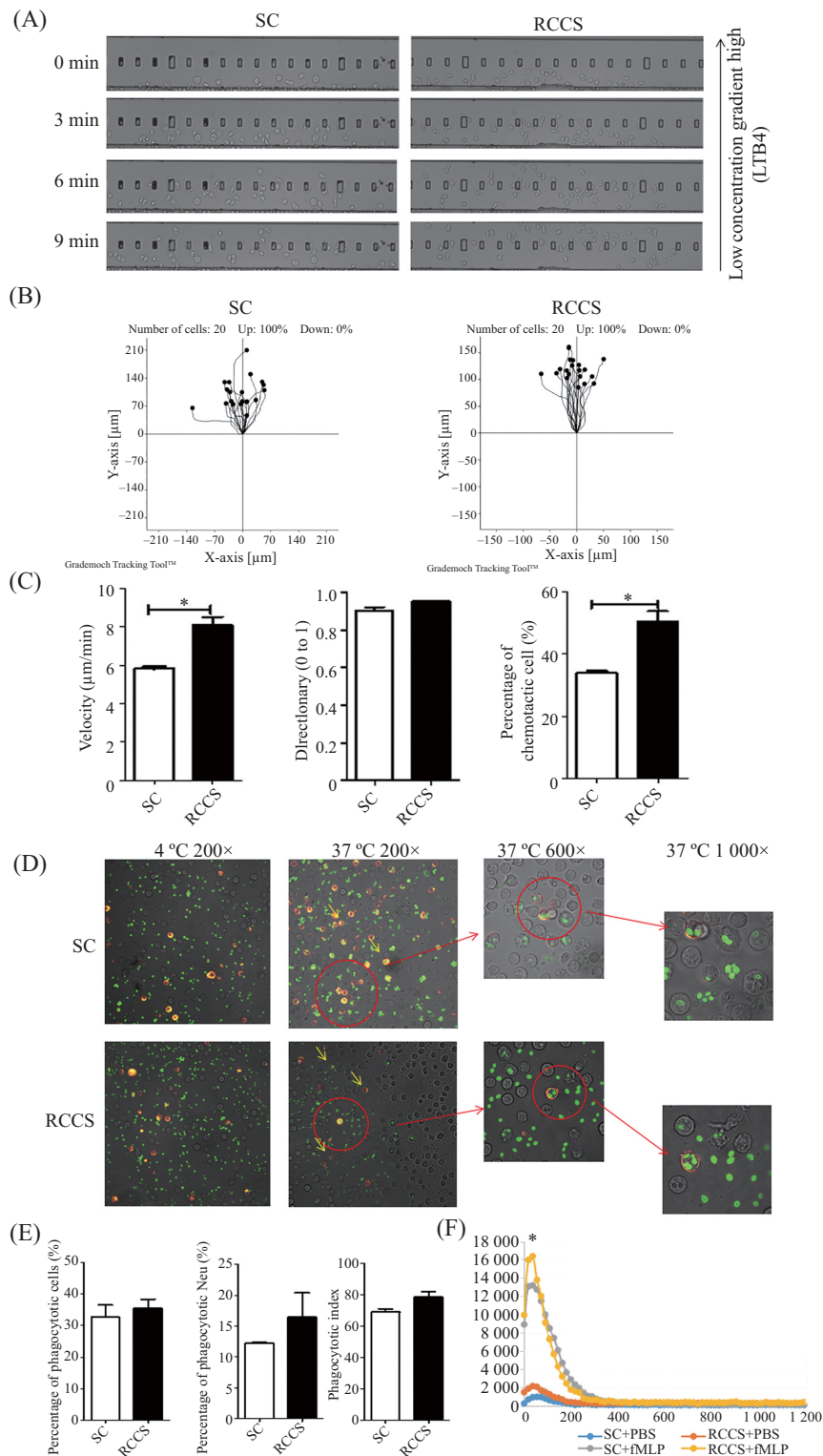
3 讨论

放化疗是当前治疗肿瘤的常用手段^[7],放化疗后患者常出现中性粒细胞减少等免疫抑制现象,故易发生感染和发热。目前,合理使用抗生素使此症状得到缓解^[8],但是当骨髓抑制期患者抗生素治疗效果不佳时,粒细胞成分输注则成为一种治疗粒缺的重要方案,但此方案存在一定限制,如粒细胞来源不足及免疫源性的问题,故提高脐血造血干祖细胞形成功能性中性粒细胞的效率或增强中性粒细胞功能成为解决以上问题的重点。国际上已使用微重力条件(旋转培养技术)进行多种细胞或组织的培养以及造血干祖细胞向血小板的分化,效果均很好^[5-6]。近几年来,将微重力条件用于细胞分化的研究越来越多,Ramaswamy等^[9]发现,在微重力的作用下猪的

内皮祖细胞分化形成的内皮细胞迁移、增殖和抗凝血作用受到一定的抑制作用。Li等^[10]证实了短期(72 h)微重力刺激促进间充质干细胞向内皮、神经元和脂肪细胞分化,但是持续的微重力作用会促进间充质干细胞向成骨细胞分化。有多个实验室均证明了微重力条件抑制红系细胞的生成^[11-12]。但是,微重力条件对造血干细胞向中性粒细胞分化以及在促进中性粒细胞功能成熟方面的研究还未见报道。基于以上研究背景,我们开展了基于旋转细胞培养体系深入研究微重力条件与造血干细胞向髓系分化之间的关系,以期回答旋转细胞培养能否促进造血干细胞向中性粒细胞分化,以及对分化形成的中性粒细胞功能是否有影响。更深远的意义就是利用旋转细胞培养模拟太空失重条件,推测航天员升空后免疫系统是否会受到失重状态的影响。

此培养体系更加适合造血干细胞的增殖与分化,造血祖细胞增殖较慢,这有可能是造血干细胞比例上升的原因;造血干祖细胞开始向下游细胞亚群分化,细胞干性会随着细胞分化逐渐下降。造血干细胞向下分化形成的细胞类型也通过验证确实分化形成了形态和细胞表面标志正常的中性粒细胞,证实了此体系的可行性。

中性粒细胞的分化过程和成熟状态可从形态学和细胞表面标记的变化来判断。我们已知粒细胞分化主要分为原始粒细胞、早幼粒细胞、中性粒细胞、晚幼粒细胞、杆状核中性粒细胞和分叶核中性粒细胞等6个阶段^[13]。我们通过形态学观察到了此培养体系下中性粒细胞成熟过程与骨髓中是一致的,而且细胞表面蛋白质CD34、CD11b、CD16b、CD66b的表达也与体内的表达模式是相同的^[14]。例如,CD11b在早幼粒阶段至成熟粒细胞阶段均有表达,在髓系细胞的分化成熟中逐渐增多^[15],故培养过程终末阶段细胞表面CD11b的比例很高。CD16b是人多形核中性粒细胞细胞表面一个重要的免疫球蛋白Fc受体,参与了中性粒细胞的激活和免疫复合物介导的吞噬作用^[15-16]。本研究发现,旋转培养获得的中性粒细胞CD16b阳性比例明显高于静置培养获得的,提示RCCS组得到的中性粒细胞的功能可能强于SC组。但对于导致2种培养方式获得的细胞表面CD16b比例不同的原因,目前还不清楚,需要以后进一步研究。机体感染状态下,由于炎症介质的刺激作用,中性粒细胞发生趋化作用,并迁移和聚集到感染部位,



A: 趋化运动过程; B: 趋化运动轨迹; C: 终末细胞趋化运动的速度、方向性和趋化率分析, * $P < 0.05$; D: 吞噬酵母聚糖的荧光图片, 黄色箭头所指的是标有CD66b⁺且吞噬的细胞; E: 吞噬百分率、吞噬的中性粒细胞占细胞总数的比例及吞噬指数分析; F: ROS的释放; * $P < 0.05$, 与SC+fMLP组比较。

A: the movement process of chemotaxis; B: the pathways of cell migration; C: the velocity, directionality and chemotaxis rate analyse of neutrophil chemotaxis, * $P < 0.05$; D: the fluorescence pictures of neutrophil phagocytosis of FITC-Zymosan. The phagocyte labeling CD66b indicates by yellow arrows; E: the percentage of phagocytosis cells, the percentenge of phagocytosis CD66b⁺ neutrophil, and phagocytosis index; F: the release of ROS of neutrophils in the presence of fMLP, * $P < 0.05$ compared with SC+fMLP group.

图3 造血干祖细胞体外分化形成的中性粒细胞功能检测

Fig.3 The function analysis of neutrophil differentiated from hematopoietic stem and progenitor cell

对细菌等进行吞噬和杀灭^[17-18]。因此,微重力条件下培养分化的中性粒细胞是否正常,不仅要检测成熟中性粒细胞表面标志物,还要对其功能进行分析。RCCS体系培养确实增强了中性粒细胞的趋化和ROS产生等功能,但2种体系培养的中性粒细胞吞噬能力没有明显差异,其原因尚需进一步研究。

细胞与细胞间和细胞与基质间的相互作用是影响高效分化信号的一个重要原因。RCCS会产生低剪切力和微重力影响细胞与细胞间或细胞与基质间的相互作用^[6,19];而且RCCS使细胞始终处于悬浮状态,有利于细胞间营养成分的交换^[20];特殊结构膜式氧合器更好地保证了氧气的供给与交换^[20]。RCCS产生的低剪切力和微重力通过抑制p/ROCK(Rho-associated coil-containing protein kinase)通路促进了血小板的形成,产生的机械刺激促进骨髓基质细胞向成骨细胞的分化,但是RCCS培养对于促进有功能的成熟中性粒细胞分化的机制尚需进一步研究。综上所述,旋转培养或者微重力条件不影响造血干细胞向中性粒细胞分化,且分化出的中性粒细胞部分抗感染功能强于静置培养,因此,该种培养体系对于旨在解决体外诱导出功能成熟的中性粒细胞来预防机体感染的问题有一定的应用前景。此外,该研究结果提示,人类微重力环境下太空探索对机体内造血干细胞的多向分化能力和免疫细胞的功能成熟可能有一定的影响,如何应对这种变化还有待今后的深入研究。

参考文献 (References)

- Li S, Ma ZF, Niu ZY, Qian H, Xuan DY, Hou R, *et al.* NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18(9): 1273-82.
- King JA, Miller WM. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol* 2007; 11(4): 394-8.
- Wang YJ, Zhang YP, Zhang SC, Peng GY, Liu T, Li YX, *et al.* Rotating microgravity-bioreactor cultivation enhances the hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells on biodegradable polymer scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(21/22): 2376-85.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004; 22(2): 80-6.
- Mauney JR, Sjostrom S, Blumberg J, Horan R, O'Leary JP, Vunjak-Novakovic G, *et al.* Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(5): 458-68.
- Yang YQ, Liu CC, Lei XH, Wang HT, Su P, Ru YX, *et al.* Integrated biophysical and biochemical signals augment megakaryopoiesis and thrombopoiesis in a three-dimensional rotary culture system. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(2): 175-85.
- 王绿化. 肿瘤同时放化疗治疗的研究进展. *中国癌症杂志* (Wang Lühua. Concurrent chemoradiotherapy in cancer treatment. *China Oncology*) 2006; 16(6): 405-8.
- 屈元姣, 刘陶文, 徐李容, 曹铁林. 肿瘤化疗后中性粒细胞缺乏症20例临床分析. *现代肿瘤医学* (Qu Yuanjiao, Liu Taowen, Xu Lirong, Cao Yilin. Clinical analysis of 20 patients with neutropenic after chemotherapy for cancer. *Modern Oncology*) 2010; 18(1): 156-8.
- Ramaswamy V, Dirr EW, Allen JB. The effect of simulated microgravity on differentiation of porcine blood-derived vascular stem cells. *Stem Cells Dev* 2015; 25(4): 329-36.
- Xue Li, Li Yaohui, Chen Jun. Duration of simulated microgravity affects the differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2017; 15(5): 3011-8.
- Blaber EA, Dvorochkin N, Torres ML, Yousuf R, Burns BP, Globus RK, *et al.* Mechanical unloading of bone in microgravity reduces mesenchymal and hematopoietic stem cell-mediated tissue regeneration. *Stem Cell Res* 2014; 13(2): 181-201.
- Sotnezova EV, Markina EA, Andreeva ER, Buravkova LB. Myeloid precursors in the bone marrow of mice after a 30-day space mission on a bion-m1 biosatellite. *Bull Exp Biol Med* 2017; 162(4): 496-500.
- Glasser L, Fiederlein RL. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 1987; 69(3): 937-44.
- Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, Shiga S, Tohyama K, Ichiyama S, *et al.* Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* 2000; 42(6): 371-8.
- Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, *et al.* Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* 2009; 113(26): 6584-92.
- Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, *et al.* Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 2013; 122(20): 3482-91.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000; 80(5): 617-53.
- 李杰, 周红卫. 血液净化对中性粒细胞功能的影响. *医学综述* (Li Jie, Zhou Hongwei. Effect of blood purification on heterophil granulocyte function. *Medical Recapitulate*) 2008; 14(3): 387-9.
- Siti-Ismail N, Samadikuchaksaraei A, Bishop AE, Polak JM, Mantalaris A. Development of a novel three-dimensional, automatable and integrated bioprocess for the differentiation of embryonic stem cells into pulmonary alveolar cells in a rotating vessel bioreactor system. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(4): 263-72.
- Gerlach JC, Hout M, Edsbagge J, Björquist P, Lübberstedt M, Miki M, *et al.* Dynamic 3D culture promotes spontaneous embryonic stem cell differentiation *in vitro*. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 16(1): 115-21.