



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118325837 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202410748773.1

(22) 申请日 2024.06.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118325837 A

(43) 申请公布日 2024.07.12

(73) 专利权人 深圳市中佳生物医疗科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市光明区科联路
高科创新中心C座9层

(72) 发明人 刘佳

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

专利代理师 刘焱

(51) Int. Cl.

C12N 5/0787 (2010.01)

(56) 对比文件

WO 2021216460 A1, 2021.10.28

CN 110090228 A, 2019.08.06

审查员 储巧玲

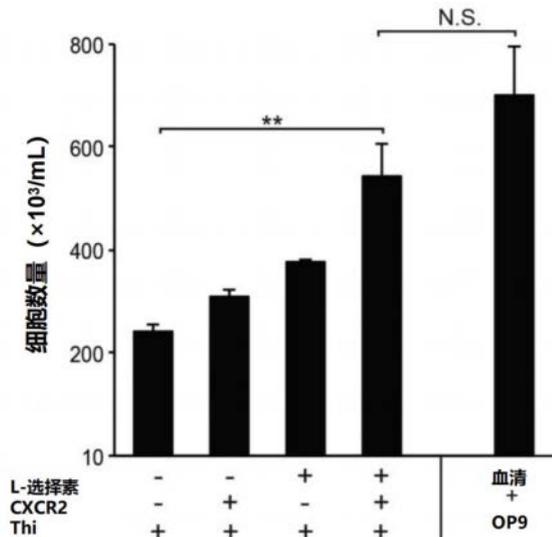
权利要求书1页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法

(57) 摘要

本申请公开了中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法。本申请的第一方面,提供中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法,包括以下步骤:提供细胞培养容器,细胞培养容器具有内壁,内壁包被有Thiazovivin;将中性粒细胞置入细胞培养容器,在无血清培养基中培养,得到中性粒细胞,无血清培养基包括基础培养基和添加剂,添加剂包括CXCR2和L-选择素。本方案选择以粘附形式的Thiazovivin取代基质细胞和血清,从而为中性粒细胞提供较佳的培养密度和增殖效果。另外,在培养过程中额外添加CXCR2和L-选择素,进一步避免了血清的使用,从而可以支持中性粒细胞系和克隆的建立以及长期维持。



1. 中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,包括以下步骤:
提供细胞培养容器,所述细胞培养容器具有内壁,所述内壁包被有Thiazovivin;
将所述中性粒细胞置入所述细胞培养容器,在无血清培养基中培养,所述无血清培养基包括基础培养基和添加剂,所述添加剂包括CXCR2和L-选择素,所述添加剂还包括IL-8。
2. 根据权利要求1所述的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,所述无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,L-选择素的浓度为1~100 ng/mL 。
3. 根据权利要求1所述的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,所述基础培养基包括DMEM培养基、RPMI 1640培养基、IMDM培养基、MEM培养基中的任一种。
4. 根据权利要求3所述的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,所述添加剂还包括1~500 μM 的多胺、1~10 ng/mL 的抗氧化剂、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的铁载体、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL 的干细胞因子、1~100 ng/mL 的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL 的IL-8、1~500 ng/mL 的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL 的血小板生成素中的至少一种。
5. 根据权利要求1所述的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,所述Thiazovivin的包被方法包括以下步骤:
在细胞培养容器中加入层粘连蛋白的溶液,孵育,洗涤,得到预包被细胞培养容器;
在所述预包被细胞培养容器中加入Thiazovivin工作液,孵育,洗涤,得到内壁包被有Thiazovivin的所述细胞培养容器。
6. 根据权利要求1所述的无血清无基质细胞培养方法,其特征在于,所述中性粒细胞为骨髓来源或外周血来源的中性粒细胞。
7. 中性粒细胞的无血清无基质细胞培养的试剂盒,其特征在于,包括:
细胞培养容器,所述细胞培养容器具有内壁,所述内壁包被有Thiazovivin;
无血清培养基,所述无血清培养基包括基础培养基和添加剂,所述添加剂包括CXCR2和L-选择素,所述添加剂还包括IL-8。
8. 权利要求1至6任一项所述的无血清无基质细胞培养方法或权利要求7所述的试剂盒在促进中性粒细胞增殖或制备促进中性粒细胞增殖的产品中的应用。
9. 权利要求1至6任一项所述的无血清无基质细胞培养方法或权利要求7所述的试剂盒在促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化或制备促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的产品中的应用。
10. 中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的方法,其特征在于,包括以下步骤:
提供细胞培养容器,所述细胞培养容器具有内壁,所述内壁包被有Thiazovivin;
将所述中性粒细胞置入所述细胞培养容器,在无血清培养基中培养,分离出所述成熟中性粒细胞,所述无血清培养基包括基础培养基和添加剂,所述添加剂包括CXCR2和L-选择素,所述添加剂还包括IL-8。

中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法

技术领域

[0001] 本申请涉及细胞培养技术领域,尤其是涉及中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法。

背景技术

[0002] 中性粒细胞(Neutrophils)来源于骨髓干细胞,是由其增殖分化为成熟的中性粒细胞。作为血液中数目最多的白细胞,中性粒细胞的占比在60~70%。中性粒细胞具有很强的吞噬、消化和消除病原微生物的能力以及趋化作用,在炎症刺激下可以快速穿过血管内皮细胞到达感染部位,发挥吞噬杀伤清除作用。此外,中性粒细胞不仅在机体早期抗感染免疫中发挥重要作用,也可以在抗体参与下发挥ADCC作用,参与适应性免疫。

[0003] 以白血病患者为例,在接受化疗和骨髓移植后,存在大约8至12天的严重中性粒细胞减少的危险期,需要通过输注中性粒细胞到病人体内快速发挥作用,从而避免出现严重的细菌和真菌感染。而骨髓功能丧失的患者以及对抗微生物治疗无反应的真菌或细菌感染的患者,同样需要通过外界输注中性粒细胞进行治疗。然而,中性粒细胞更新快、寿命短,在离体环境中实现有效扩增的难度较大。

[0004] 相关技术中虽然已有解决方案,但依赖于血清的添加来维持细胞的生长。尽管血清提供了增殖所需的生长因子,然而其中含有异源动物成分,且成分不明确、培养的重现性差,存在外源病毒和致病因子的污染风险,不适合于中性粒细胞的输注治疗。此外,基质细胞系如OP9可显著提高分化的成熟中性粒细胞的数量,但额外引入的细胞也导致了后续在中性粒细胞使用前需要进一步分离。因此,有必要提供一种中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法。

发明内容

[0005] 本申请旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本申请提出一种中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法。

[0006] 本申请的第一方面,提供中性粒细胞的无血清无基质细胞培养方法,包括以下步骤:

[0007] 提供细胞培养容器,细胞培养容器具有内壁,内壁包被有Thiazovivin;

[0008] 将中性粒细胞置入细胞培养容器,在无血清培养基中培养,得到中性粒细胞,无血清培养基包括基础培养基和添加剂,添加剂包括CXCR2和IL-选择素。

[0009] 根据本申请实施例的无血清无基质细胞培养方法,至少具有如下有益效果:

[0010] 本方案选择以粘附形式的Thiazovivin取代基质细胞和血清,从而为中性粒细胞提供较佳的培养密度和增殖效果。另外,在培养过程中额外添加CXCR2和IL-选择素,进一步避免了血清的使用,从而可以支持中性粒细胞系和克隆的建立以及长期维持。

[0011] 与胚胎干细胞等未分化的全能干细胞所不同的是,中性粒细胞是一种分化程度较高的终末细胞,但从实验结果推测,Thiazovivin(CAS:1226056-71-8,化学式 $C_{15}H_{13}N_5O_8$,中

文名称为N-苄基2-(嘧啶-4-胺基)噻唑-4-甲酰胺或者N-苄基-2-(嘧啶-4-基氨基)噻唑-4-羧酰胺)在中性粒细胞的培养过程中可能是通过增加细胞-ECM粘附介导的 β 1整合蛋白活性,通过E-钙粘蛋白介导的胞间相互作用,从而使中性粒细胞在无ECM环境下免于死亡,促进细胞的存活和增殖。

[0012] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2,C-X-C基序趋化因子受体2)的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,例如可以是1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0013] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中L-选择素的浓度为1~100 ng/mL ,例如可以是1 ng/mL 、2 ng/mL 、3 ng/mL 、4 ng/mL 、5 ng/mL 、6 ng/mL 、7 ng/mL 、8 ng/mL 、9 ng/mL 、10 ng/mL 、20 ng/mL 、30 ng/mL 、40 ng/mL 、50 ng/mL 、60 ng/mL 、70 ng/mL 、80 ng/mL 、90 ng/mL 、100 ng/mL 。

[0014] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,L-选择素的浓度为1~100 ng/mL ,例如可以是CXCR2的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,L-选择素的浓度为1 ng/mL 、2 ng/mL 、3 ng/mL 、4 ng/mL 、5 ng/mL 、6 ng/mL 、7 ng/mL 、8 ng/mL 、9 ng/mL 、10 ng/mL 、20 ng/mL 、30 ng/mL 、40 ng/mL 、50 ng/mL 、60 ng/mL 、70 ng/mL 、80 ng/mL 、90 ng/mL 、100 ng/mL 。

[0015] 在本申请的一些实施方式中,基础培养基包括DMEM培养基、RPMI 1640培养基、IMDM培养基、MEM培养基中的任一种。

[0016] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括多胺、抗氧化剂、胰岛素、铁载体、B-27补充剂、干细胞因子、粒细胞集落刺激因子、IL-8、fms相关酪氨酸激酶3配体、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、血小板生成素中的至少一种。

[0017] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的多胺,例如可以是1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 、60 μM 、70 μM 、80 μM 、90 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 的多胺。

[0018] 在本申请的一些实施方式中,多胺包括腐胺、精胺、亚精胺中的至少一种。

[0019] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~10 ng/mL 的抗氧化剂,例如可以是1 ng/mL 、2 ng/mL 、3 ng/mL 、4 ng/mL 、5 ng/mL 、6 ng/mL 、7 ng/mL 、8 ng/mL 、9 ng/mL 的抗氧化剂。

[0020] 在本申请的一些实施方式中,抗氧化剂包括硒,硒可以以亚硒酸盐形式提供和计量。

[0021] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素,例如可以是1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素。

[0022] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的铁载体,例如可以是1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

mL、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、70 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、90 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的铁载体。

[0023] 在本申请的一些实施方式中,铁载体包括转铁蛋白。

[0024] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~10 ng/mL的亚硒酸盐、1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的胰岛素和1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的转铁蛋白。

[0025] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~5 v/v%的B-27补充剂,例如可以是1 v/v%、2 v/v%、3 v/v%、4 v/v%、5 v/v%的B-27补充剂。

[0026] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL的干细胞因子(Stem cell factor, SCF),例如可以是1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL的干细胞因子。

[0027] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony stimulating factor, G-CSF),例如可以是1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子。

[0028] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括0.1~10 ng/mL的IL-8,例如可以是0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、0.6 ng/mL、0.7 ng/mL、0.8 ng/mL、0.9 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL的IL-8。

[0029] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体(Flt-3L),例如可以是1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体。

[0030] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF),例如可以是1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0031] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL的血小板生成素(Thrombopoietin, TPO),例如可以是1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL的血小板生成素。

[0032] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的多胺、1~10 ng/mL的抗氧化剂、1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的胰岛素、1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的铁载体、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL的干细胞因子、1~100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL的IL-8、1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL的血小板生成素。

[0033] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的腐胺、1~10 ng/mL的硒、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的转铁蛋白、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL的干细胞因子、1~100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL的IL-8、1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL的血小板生成素。

[0034] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的包被方法包括以下步骤:

[0035] 在细胞培养容器中加入层粘连蛋白(laminin)的溶液,孵育,洗涤,干燥,得到预包被细胞培养容器;

[0036] 在预包被细胞培养容器中加入Thiazovivin工作液,孵育,洗涤,干燥,得到内壁包被有Thiazovivin的细胞培养容器。

[0037] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液的浓度为1~100 mg/mL,例如可以是1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL、100 mg/mL。

[0038] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白在细胞培养容器内壁的包被量为0.1~10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,例如可以是0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0039] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液为层粘连蛋白的缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。

[0040] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育时间为6~24 h,例如是6 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h。

[0041] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,例如可以是4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0042] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的洗涤液为缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。

[0043] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的溶剂包括PEG和水。

[0044] 在本申请的一些实施方式中,PEG包括PEG400。

[0045] 在本申请的一些实施方式中,溶剂还包括表面活性剂。

[0046] 在本申请的一些实施方式中,表面活性剂包括Tween,例如可以是Tween80。

[0047] 在本申请的一些实施方式中,工作液中PEG和水的体积比为1:0.1~10,例如可以是1:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

[0048] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的浓度为1~100 mg/mL,例如可以是1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL、100 mg/mL。

[0049] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育时间为1~10 h,例如是1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h。

[0050] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,例如可以是4

°C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C。

[0051] 在本申请的一些实施方式中, Thiazovivin的洗涤液为缓冲液, 如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。

[0052] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞为骨髓来源或外周血来源的中性粒细胞。

[0053] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞为哺乳纲动物(如单孔目、有袋目、食虫目、跳鼯目、攀兽目、皮翼目、翼手目、灵长目、贫齿目、鳞甲目、兔形目、啮齿目、食肉目、海牛目、蹄兔目、管齿目、奇蹄目、偶蹄目、鲸目等)来源的中性粒细胞, 具体包括啮齿目(如小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠)、兔形目(如兔)、奇蹄目(如马)、偶蹄目(如羊、猪)、灵长目(如猴、猩猩、大猩猩、黑猩猩、人)、食肉目(如狗)等其中至少一种来源的中性粒细胞。

[0054] 在本申请的一些实施方式中, 细胞培养容器包括细胞培养板(如4孔、6孔、8孔、12孔、24孔、48孔、96孔、384孔、1536孔的培养板)、细胞培养皿(如35 mm、60 mm、100 mm、150 mm的培养皿)、细胞培养瓶(如T25、T75、T175、T225的培养瓶)、细胞工厂(例如1层、2层、3层、4层、5层、10层、40层的细胞工厂)等。

[0055] 在本申请的一些实施方式中, 细胞培养容器的制备原料包括聚合物, 如聚苯乙烯。

[0056] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1小时以上、2小时以上、4小时以上、6小时以上、12小时以上、16小时以上、20小时以上、1天以上、2天以上、3天以上、4天以上、5天以上、6天以上、8天以上、10天以上、12天以上、14天以上、16天以上、18天以上、20天以上、22天以上、24天以上、26天以上、28天以上、30天以上。

[0057] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1~30天, 例如1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30天。

[0058] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养过程中, 每隔1~5天更换培养基和细胞培养容器传代培养, 例如可以是每隔1、2、3、4、5天。

[0059] 本申请的第二方面, 提供一种中性粒细胞的无血清无基质细胞培养的试剂盒, 该试剂盒包括:

[0060] 细胞培养容器, 具有内壁, 内壁包被有Thiazovivin;

[0061] 无血清培养基, 包括基础培养基和添加剂, 添加剂包括CXCR2和L-选择素。

[0062] 在本申请的一些实施方式中, 无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0063] 在本申请的一些实施方式中, 无血清培养基中L-选择素的浓度为1~100 ng/mL 。

[0064] 在本申请的一些实施方式中, 无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, L-选择素的浓度为1~100 ng/mL 。

[0065] 在本申请的一些实施方式中, 基础培养基包括DMEM培养基、RPMI 1640培养基、IMDM培养基、MEM培养基中的任一种。

[0066] 在本申请的一些实施方式中, 添加剂还包括多胺、抗氧化剂、胰岛素、铁载体、B-27补充剂、干细胞因子、粒细胞集落刺激因子、IL-8、fms相关酪氨酸激酶3配体、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、血小板生成素中的至少一种。

[0067] 在本申请的一些实施方式中, 添加剂还包括1~500 μM 的多胺。

[0068] 在本申请的一些实施方式中, 添加剂还包括1~10 ng/mL 的抗氧化剂。

[0069] 在本申请的一些实施方式中, 抗氧化剂包括硒, 硒可以以亚硒酸盐形式提供和计

量。

[0070] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素。

[0071] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的铁载体。

[0072] 在本申请的一些实施方式中,铁载体包括转铁蛋白。

[0073] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~10 ng/mL 的亚硒酸盐、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素和1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的转铁蛋白。

[0074] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~5 v/v%的B-27补充剂,例如可以是1 v/v%、2 v/v%、3 v/v%、4 v/v%、5 v/v%的B-27补充剂。

[0075] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL 的干细胞因子。

[0076] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL 的粒细胞集落刺激因子。

[0077] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括0.1~10 ng/mL 的IL-8。

[0078] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL 的fms相关酪氨酸激酶3配体。

[0079] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~50 ng/mL 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0080] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL 的血小板生成素。

[0081] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的多胺、1~10 ng/mL 的抗氧化剂、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的铁载体、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL 的干细胞因子、1~100 ng/mL 的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL 的IL-8、1~500 ng/mL 的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL 的血小板生成素。

[0082] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的腐胺、1~10 ng/mL 的硒、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的转铁蛋白、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL 的干细胞因子、1~100 ng/mL 的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL 的IL-8、1~500 ng/mL 的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL 的血小板生成素。

[0083] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin通过以下步骤包被于细胞培养容器的内壁:

[0084] 在细胞培养容器中加入层粘连蛋白(laminin)的溶液,孵育,洗涤,干燥,得到预包被细胞培养容器;

[0085] 在预包被细胞培养容器中加入Thiazovivin工作液,孵育,洗涤,干燥,得到内壁包被有Thiazovivin的细胞培养容器。

[0086] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液的浓度为1~100 mg/mL 。

[0087] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白在细胞培养容器内壁的包被量为0.1~10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0088] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液为层粘连蛋白的缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。

[0089] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育时间为6~24 h。

[0090] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$ 。

- [0091] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的洗涤液为缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。
- [0092] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的溶剂包括PEG和水。
- [0093] 在本申请的一些实施方式中,PEG包括PEG400。
- [0094] 在本申请的一些实施方式中,溶剂还包括表面活性剂。
- [0095] 在本申请的一些实施方式中,表面活性剂包括Tween,例如可以是Tween80。
- [0096] 在本申请的一些实施方式中,工作液中PEG和水的体积比为1:0.1~10。
- [0097] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的浓度为1~100 mg/mL。
- [0098] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育时间为1~10 h。
- [0099] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育温度为4~40 °C。
- [0100] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的洗涤液为缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。
- [0101] 在本申请的一些实施方式中,中性粒细胞为骨髓来源或外周血来源的中性粒细胞。
- [0102] 在本申请的一些实施方式中,中性粒细胞为哺乳纲动物(如单孔目、有袋目、食虫目、跳鼯目、攀兽目、皮翼目、翼手目、灵长目、贫齿目、鳞甲目、兔形目、啮齿目、食肉目、海牛目、蹄兔目、管齿目、奇蹄目、偶蹄目、鲸目等)来源的中性粒细胞,具体包括啮齿目(如小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠)、兔形目(如兔)、奇蹄目(如马)、偶蹄目(如羊、猪)、灵长目(如猴、猩猩、大猩猩、黑猩猩、人)、食肉目(如狗)等其中至少一种来源的中性粒细胞。
- [0103] 在本申请的一些实施方式中,细胞培养容器包括细胞培养板(如4孔、6孔、8孔、12孔、24孔、48孔、96孔、384孔、1536孔的培养板)、细胞培养皿(如35 mm、60 mm、100 mm、150 mm的培养皿)、细胞培养瓶(如T25、T75、T175、T225的培养瓶)、细胞工厂(例如1层、2层、3层、4层、5层、10层、40层的细胞工厂)等。
- [0104] 在本申请的一些实施方式中,细胞培养容器的制备原料包括聚合物,如聚苯乙烯。
- [0105] 在本申请的一些实施方式中,中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1小时以上、2小时以上、4小时以上、6小时以上、12小时以上、16小时以上、20小时以上、1天以上、2天以上、3天以上、4天以上、5天以上、6天以上、8天以上、10天以上、12天以上、14天以上、16天以上、18天以上、20天以上、22天以上、24天以上、26天以上、28天以上、30天以上。
- [0106] 在本申请的一些实施方式中,中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1~30天,例如1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30天。
- [0107] 在本申请的一些实施方式中,中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养过程中,每隔1~5天更换培养基和细胞培养容器传代培养,例如可以是每隔1、2、3、4、5天。
- [0108] 本申请的第三方面,提供前述的无血清无基质细胞培养方法或试剂盒在促进中性粒细胞增殖或制备促进中性粒细胞增殖的产品中的应用。
- [0109] 在本申请的一些实施方式中,前述的无血清无基质细胞培养方法在促进中性粒细胞增殖的应用包括按照该无血清无基质细胞培养方法培养中性粒细胞。
- [0110] 在本申请的一些实施方式中,前述的试剂盒在促进中性粒细胞增殖的应用包括利用该试剂盒培养中性粒细胞。
- [0111] 在本申请的一些实施方式中,前述的试剂盒在制备促进中性粒细胞增殖的产品中

的应用包括在促进中性粒细胞增殖的产品中提供该试剂盒。

[0112] 本申请的第四方面,提供前述的无血清无基质细胞培养方法或试剂盒在促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化或制备促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的产品中的应用。

[0113] 在本申请的一些实施方式中,前述的无血清无基质细胞培养方法在促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的应用包括按照该无血清无基质细胞培养方法培养中性粒细胞,然后分离出成熟中性粒细胞。

[0114] 在本申请的一些实施方式中,前述的试剂盒在促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的应用包括利用该试剂盒培养中性粒细胞,然后分离出成熟中性粒细胞。

[0115] 在本申请的一些实施方式中,前述的试剂盒在制备促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的产品中的应用包括在促进中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的产品中提供该试剂盒。

[0116] 本申请的第五方面,提供一种中性粒细胞向成熟中性粒细胞分化的方法,该方法包括以下步骤:

[0117] 提供细胞培养容器,具有内壁,内壁包被有Thiazovivin;

[0118] 将中性粒细胞置入细胞培养容器,在无血清培养基中培养,分离出成熟中性粒细胞,无血清培养基包括基础培养基和添加剂,添加剂包括CXCR2和L-选择素。

[0119] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0120] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中L-选择素的浓度为1~100 ng/mL 。

[0121] 在本申请的一些实施方式中,无血清培养基中CXCR2的浓度为1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,L-选择素的浓度为1~100 ng/mL 。

[0122] 在本申请的一些实施方式中,基础培养基包括DMEM培养基、RPMI 1640培养基、IMDM培养基、MEM培养基中的任一种。

[0123] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括多胺、抗氧化剂、胰岛素、铁载体、B-27补充剂、干细胞因子、粒细胞集落刺激因子、IL-8、fms相关酪氨酸激酶3配体、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、血小板生成素中的至少一种。

[0124] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μM 的多胺。

[0125] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~10 ng/mL 的抗氧化剂。

[0126] 在本申请的一些实施方式中,抗氧化剂包括硒,硒可以以亚硒酸盐形式提供和计量。

[0127] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素。

[0128] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的铁载体。

[0129] 在本申请的一些实施方式中,铁载体包括转铁蛋白。

[0130] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~10 ng/mL 的亚硒酸盐、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素和1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的转铁蛋白。

[0131] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~5 v/v%的B-27补充剂,例如可以是1 v/v%、2 v/v%、3 v/v%、4 v/v%、5 v/v%的B-27补充剂。

[0132] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL 的干细胞因子。

[0133] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL 的粒细胞集落刺激因子。

- [0134] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括0.1~10 ng/mL的IL-8。
- [0135] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体。
- [0136] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。
- [0137] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~100 ng/mL的血小板生成素。
- [0138] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μ M的多胺、1~10 ng/mL的抗氧化剂、1~100 μ g/mL的胰岛素、1~100 μ g/mL的铁载体、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL的干细胞因子、1~100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL的IL-8、1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL的血小板生成素。
- [0139] 在本申请的一些实施方式中,添加剂还包括1~500 μ M的腐胺、1~10 ng/mL的硒、1~100 μ g/mL的胰岛素、1~100 μ g/mL的转铁蛋白、1~5 v/v%的B-27补充剂、1~500 ng/mL的干细胞因子、1~100 ng/mL的粒细胞集落刺激因子、0.1~10 ng/mL的IL-8、1~500 ng/mL的fms相关酪氨酸激酶3配体、1~50 ng/mL的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、1~100 ng/mL的血小板生成素。
- [0140] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin通过以下步骤包被于细胞培养容器的内壁:
- [0141] 在细胞培养容器中加入层粘连蛋白(laminin)的溶液,孵育,洗涤,干燥,得到预包被细胞培养容器;
- [0142] 在预包被细胞培养容器中加入Thiazovivin工作液,孵育,洗涤,干燥,得到内壁包被有Thiazovivin的细胞培养容器。
- [0143] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液的浓度为1~100 mg/mL。
- [0144] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白在细胞培养容器内壁的包被量为0.1~10 μ g/cm²。
- [0145] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的溶液为层粘连蛋白的缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。
- [0146] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育时间为6~24 h。
- [0147] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的孵育温度为4~40 $^{\circ}$ C。
- [0148] 在本申请的一些实施方式中,层粘连蛋白的洗涤液为缓冲液,如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。
- [0149] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的溶剂包括PEG和水。
- [0150] 在本申请的一些实施方式中,PEG包括PEG400。
- [0151] 在本申请的一些实施方式中,溶剂还包括表面活性剂。
- [0152] 在本申请的一些实施方式中,表面活性剂包括Tween,例如可以是Tween80。
- [0153] 在本申请的一些实施方式中,工作液中PEG和水的体积比为1:0.1~10。
- [0154] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的工作液的浓度为1~100 mg/mL。
- [0155] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育时间为1~10 h。
- [0156] 在本申请的一些实施方式中,Thiazovivin的孵育温度为4~40 $^{\circ}$ C。

[0157] 在本申请的一些实施方式中, Thiazovivin的洗涤液为缓冲液, 如PBS、HBSS、DPBS、EBSS等其中任一种。

[0158] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞为骨髓来源或外周血来源的中性粒细胞。

[0159] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞为哺乳纲动物(如单孔目、有袋目、食虫目、跳鼯目、攀兽目、皮翼目、翼手目、灵长目、贫齿目、鳞甲目、兔形目、啮齿目、食肉目、海牛目、蹄兔目、管齿目、奇蹄目、偶蹄目、鲸目等)来源的中性粒细胞, 具体包括啮齿目(如小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠)、兔形目(如兔)、奇蹄目(如马)、偶蹄目(如羊、猪)、灵长目(如猴、猩猩、大猩猩、黑猩猩、人)、食肉目(如狗)等其中至少一种来源的中性粒细胞。

[0160] 可以理解的是, 向成熟中性粒细胞分化的中性粒细胞为未成熟的中性粒细胞, 例如在一些具体的实施方式中, 向成熟中性粒细胞分化的中性粒细胞可以是前体中性粒细胞, 具体可以是骨髓或外周血来源的前体中性粒细胞。

[0161] 在本申请的一些实施方式中, 细胞培养容器包括细胞培养板(如4孔、6孔、8孔、12孔、24孔、48孔、96孔、384孔、1536孔的培养板)、细胞培养皿(如35 mm、60 mm、100 mm、150 mm的培养皿)、细胞培养瓶(如T25、T75、T175、T225的培养瓶)、细胞工厂(例如1层、2层、3层、4层、5层、10层、40层的细胞工厂)等。

[0162] 在本申请的一些实施方式中, 细胞培养容器的制备原料包括聚合物, 如聚苯乙烯。

[0163] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1小时以上、2小时以上、4小时以上、6小时以上、12小时以上、16小时以上、20小时以上、1天以上、2天以上、3天以上、4天以上、5天以上、6天以上、8天以上、10天以上、12天以上、14天以上、16天以上、18天以上、20天以上、22天以上、24天以上、26天以上、28天以上、30天以上。

[0164] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养1~30天, 例如1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30天。

[0165] 在本申请的一些实施方式中, 中性粒细胞在细胞培养容器中以无血清培养基培养过程中, 每隔1~5天更换培养基和细胞培养容器传代培养, 例如可以是每隔1、2、3、4、5天。

[0166] 本申请的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出, 部分将从下面的描述中变得明显, 或通过本申请的实践了解到。

附图说明

[0167] 图1是本申请的一个实施例中性粒细胞在不同培养条件下的增殖情况, 包括以OP9基质细胞以及含血清培养基培养; 微孔板包被Thiazovivin(Thi)用含血清培养基培养; 微孔板包被Thiazovivin(Thi)用无血清培养基培养; 用溶解有Thiazovivin(Thi)的含血清培养基培养。

[0168] 图2是本申请的一个实施例Thiazovivin以不同形式进行培养得到的中性粒细胞的镜检结果。其中, 左侧为Thiazovivin以粘附形式包被于培养板上进行培养的结果, 右侧为Thiazovivin以可溶性形式溶解于培养基中进行培养的结果。

[0169] 图3是本申请的一个实施例Thiazovivin以最佳浓度包被于培养瓶中并采用添加CXCR2和L-选择素的无血清培养基, 以及与其他对照组在连续培养外周血来源的中性粒细胞30天情况下的细胞增殖情况。

[0170] 图4是本申请的一个实施例中骨髓源性中性粒细胞在Thiazovivin包被条件下对于无血清培养基中添加L-选择素或CXCR2影响细胞增殖的情况。

[0171] 图5是本申请的一个实施例中在Thiazovivin包被条件下,采用添加CXCR2和L-选择素的无血清培养基,以及与其他对照组在连续培养骨髓源性中性粒细胞30天情况下的细胞增殖情况。

[0172] 图6是本申请的一个实施例中在Thiazovivin包被条件下,采用添加CXCR2和L-选择素的无血清培养基,以及与其他对照组采用有限稀释法检测中性粒细胞克隆效率的结果。

[0173] 图7是本申请的一个实施例中在Thiazovivin包被条件下,采用添加CXCR2和L-选择素的无血清培养基,以及与其他对照组检测中性粒细胞分化为成熟中性粒细胞能力的结果。

具体实施方式

[0174] 以下将结合实施例对本申请的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述,以充分地理解本申请的目的、特征和效果。显然,所描述的实施例只是本申请的一部分实施例,而不是全部实施例,基于本申请的实施例,本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,均属于本申请保护的范围。

[0175] 下面详细描述本申请的实施例,描述的实施例是示例性的,仅用于解释本申请,而不能理解为对本申请的限制。

[0176] 在本申请的描述中,若干的含义是一个以上,多个的含义是两个以上,大于、小于、超过等理解为不包括本数,以上、以下、以内等理解为包括本数。如果有描述到第一、第二只是用于区分技术特征为目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量或者隐含指明所指示的技术特征的先后关系。

[0177] 除非另有定义,本申请中所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的术语只是为了描述本申请实施例的目的,不是旨在限制本申请。

[0178] 本申请的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本申请的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0179] 实施例1

[0180] 通过以下步骤制备包被Thiazovivin的微孔板:

[0181] 1. 配制Thiazovivin工作液

[0182] 以1 mL工作液为例,步骤如下:取300 μ L 100 mg/mL的Thiazovivin的澄清PEG400储备液,加到5 μ L Tween 80中,混合均匀使其澄清;继续向其中加入50 μ L丙二醇,混合均匀使其澄清;然后继续加入645 μ L ddH₂O,定容至1 mL,得到30 mg/mL (96.35mM)的Thiazovivin工作液。存放于-20 °C冰箱,使用前用ddH₂O稀释成所需浓度。

[0183] 2. 微孔板预包被层粘连蛋白

[0184] 将层粘连蛋白用无菌HBSS平衡盐溶液稀释,然后滴加适量到96孔板内,37 °C过夜孵育后,吸去多余的溶液并用PBS清洗两次,晾干,得到预包被层粘连蛋白的96孔板,层粘连蛋白的包被量约为1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0185] 3.微孔板包被Thiazovivin

[0186] 按照50 μL /孔将不同浓度的Thiazovivin工作液滴加到预包被层粘连蛋白的96孔板内,室温孵育2 h,再用200 μL PBS/0.05% tween-20洗涤3次,然后加入100 μL PBS溶液,在4 °C下孵育2 h。用PBS/0.05% tween-20洗涤5次后,加入100 μL 1 \times TMB溶液,使用酶标仪检测450 nm处的吸光度。

[0187] 实施例2

[0188] 1.配制培养基

[0189] 按照以下组成,分别配制含血清培养基和无血清培养基。

[0190] 含血清培养基:以IMDM(包括4 mM L-谷氨酰胺、3024 mg/L NaHCO_3 、4500 mg/L D-葡萄糖,1mM丙酮酸钠)作为基础液,另外以终浓度计补充0.036 mM NaHCO_3 、50 μM β -巯基乙醇、0.03 wt%蛋白胨、1 \times 卡那霉素、1 \times 非必需氨基酸、1 ng/mL IL-8、2%(v/v)胎牛血清(FBS)、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人转铁蛋白、0.005%脂肪酸补充剂。

[0191] 无血清培养基:以IMDM(包括4 mM L-谷氨酰胺、3024 mg/L NaHCO_3 、4500 mg/L D-葡萄糖,1mM丙酮酸钠)作为基础液,另外以终浓度补充100 μM 腐胺、5 ng/mL硒、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 转铁蛋白、2%(v/v)B-27补充剂、100 ng/mL干细胞因子(SCF)、50 ng/mL粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、1 ng/mL IL-8、100 ng/mL fms相关酪氨酸激酶3配体(Flt-3L)、15 ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、20 ng/mL血小板生成素(TPO)。

[0192] 2.获取中性粒细胞

[0193] 在获得5名健康成年人的知情同意后,从肝素化静脉血中分离出中性粒细胞。具体过程包括:取肝素化静脉血10 mL,加入2.5 mL 6%右旋糖酐生理盐水,混匀后37 °C恒温箱静置30 min,取上层按照1:1的体积比加入到Ficoll分离液顶部,500 rpm离心30 min后弃上清,沉淀加入0.155M NH_4Cl 溶液重悬裂解红细胞,Hanks平衡液洗涤3次,得到中性粒细胞。然后将中性粒细胞分别重悬于上述两种培养基中,得到相应的细胞悬液。

[0194] 3.接种培养

[0195] 将细胞悬液以 1×10^4 个/mL的密度接种到96孔板,每孔200 μL 。

[0196] 其中,加入含血清培养基培养时,预先将OP9细胞按照 1×10^4 个/ cm^2 预涂微孔板,作为基质细胞培养,并施以总量30Gy的X射线照射。

[0197] 加入无血清培养基培养时,参考实施例1预先将Thiazovivin以1 ng/mL~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的不同浓度下包被在层粘连蛋白涂覆预处理的微孔板上,室温孵育2小时,PBS洗涤3次。另外,设置非粘附Thiazovivin的对照,将可溶性Thiazovivin直接加入到无血清培养基的细胞悬液中,其浓度与粘附Thiazovivin相同。

[0198] 4.传代

[0199] 每3天或4天将细胞传代到另一个预涂有OP9细胞或Thiazovivin的孔中,通过流式细胞仪分析计数碘化丙啶阴性的活细胞数量,评估细胞增殖情况。数据分析采用FlowJo进行。

[0200] 本实施例中利用不同浓度的Thiazovivin和层粘连蛋白包被微孔板,以模拟通常

存在于微孔板表面的基质细胞涂层,测试中性粒细胞系的增殖,结果如图1所示,可以看出,层粘连蛋白涂覆板上粘附的Thiazovivin与IL-8一起,以剂量依赖的方式刺激细胞长期增殖。当Thiazovivin以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度进行包被,并在无基质细胞的含血清培养基中培养时,中性粒细胞的增殖率最大,且增殖效率几乎与基质细胞含血清培养基培养相同;而Thiazovivin在更低浓度或更高浓度下,刺激作用相对较小。此外,Thiazovivin以可溶性形式进行培养时,不刺激中性粒细胞的增殖。图2为镜下观察结果,可见粘附的Thiazovivin刺激生长中的中性粒细胞附着在微孔板底部,该结果与基质细胞相似,而在Thiazovivin以可溶性的未粘附形式进行培养时,细胞则漂浮在培养基中。这些结果表明,粘附的Thiazovivin与中性粒细胞上的受体结合,交联这些受体以刺激中性粒细胞增殖。而过低或过高的浓度对于中性粒细胞的刺激是不利的,细胞受体交联在最优浓度下以最佳模式提供了最大化的增殖刺激。因此,可以采用粘附的Thiazovivin作为基质细胞的代替,促进中性粒细胞在无ECM环境下的存活和增殖。

[0201] 实施例3

[0202] 参考实施例2,使用含IL-8的无血清培养基,将中性粒细胞按照 1×10^4 个/mL的密度在预先用Thiazovivin以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被在层粘连蛋白涂覆预处理的培养瓶中培养,同时培养基中额外加入终浓度为50 ng/mL 的L-选择素和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CXCR2。并参考设置未加入L-选择素和CXCR2以及同时采用含血清培养基的对照。

[0203] 培养结果如图3所示,可以看出,第26天,Thiazovivin以粘附方式包被的条件下,中性粒细胞在无血清培养基中培养的增殖率是在含血清培养基中培养的增殖率的一半,而在无血清培养基中添加L-选择素和CXCR2进行培养后,增殖效率是在含血清培养基中的增殖效率的3~4倍。

[0204] 实施例4

[0205] 1.骨髓源性前体中性粒细胞的获取

[0206] 取若干8至12周龄的C57BL/6小鼠,颈椎脱臼法处死,分离出股骨,用5 mL RPMI 1640完全培养基(含1%青霉素-链霉素、10% FBS和2 mM EDTA)反复冲洗以收集骨髓细胞,加入红细胞裂解液处理10 min,然后70 μm 细胞过滤器过滤,离心弃上清,加入RPMI 1640完全培养基重悬。流式细胞术收集骨髓源性前体中性粒细胞($\text{CD}45^+ \text{CD}11\text{b}^+ \text{Ly}6\text{G}^- \text{CD}115^- \text{SSC}^{\text{高}}$)。

[0207] 2.骨髓源性前体中性粒细胞的培养

[0208] 以实施例2中含有IL-8的无血清培养基额外加入50 ng/mL 的L-选择素和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CXCR2,并预先包被Thiazovivin作为培养条件,将收集到的骨髓源性前体中性粒细胞进行培养,并设置L-选择素和CXCR2的阴性对照,以及采用实施例2中基质细胞与含血清培养基培养的方式的对照,培养4天的效果如图4所示,可以看到,单独添加L-选择素或CXCR2,骨髓源性前体中性粒细胞的增殖效率的变化不大,均与两者都不添加的情况下细胞增殖效率无显著差异,而在添加L-选择素和CXCR2的组合后,细胞增殖效率明显提升,并且与在基质细胞(OP9)含血清培养基培养的细胞没有显著差异。

[0209] 长期培养的结果如图5所示,采用骨髓源性前体中性粒细胞的细胞系能在含有IL-8、CXCR2和L-选择素,并且粘附Thiazovivin的无血清培养基中建立和维持长时间培养,而不能在任何含血清培养基条件下培养。

[0210] 实施例5

[0211] 在粘附Thiazovivin刺激、含IL-8、L-选择素、CXCR2的无血清培养基、无基质细胞的培养条件下通过有限稀释法测试人外周血来源的中性粒细胞的克隆效率。

[0212] 有限稀释法的具体过程如下:将含有中性粒细胞的无血清培养基按照200个/mL的细胞密度稀释,稀释后在96孔板(预包被Thiazovivin)中每孔加0.1 mL,4个重复,每个孔内20个,按照3倍倍比稀释依次接种得到每孔6.6个、2.2个、0.7个细胞的2排孔板。培养7天后,显微镜对组成的中性粒细胞集落进行评分,根据泊松分布,计算中性粒细胞的频率。

[0213] 结果如图6所示,在CXCR2和L-选择素存在的无血清培养基中,粘附Thiazovivin上的中性粒细胞的克隆效率为1/6,而在基质细胞含血清培养基中的克隆效率为1/5,即在5个细胞中培养1个,两者几乎相同。而在不含CXCR2和L-选择素的含血清培养条件下,克隆的效率降低了2倍(1/13),显示了这两种添加物的重要性。而当Thiazovivin以非粘附的可溶性形式加入培养基中参与培养的条件下,中性粒细胞的克隆效率要低得多,在不到100个细胞中只有1个。

[0214] 实施例6

[0215] 中性粒细胞采用前述方法在预包被Thiazovivin的无血清培养基中培养5天,使用抗体标记,用APC-Cy7标记抗CD45抗体、PE-Cy5标记抗CD11b抗体、FITC标记抗CD115抗体,在冰上混匀染色,再在黑暗环境中孵育30 min,使用DPBS清洗掉多余的细胞表面染色抗体后,上流式细胞用APC-Cy7标记抗CD3抗体和PE-Cy5标记抗CD56抗体,并在冰上染色15 min进行表达分析,流式细胞术检测分化的成熟中性粒细胞表型CD45+CD11b+CD115-,其结果如图7所示,加入的CXCR2和L-选择素明显提升了分化频率,与采用OP9基质细胞在含血清培养基中培养的效果相同。

[0216] 上面结合实施例对本申请作了详细说明,但是本申请不限于上述实施例,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本申请宗旨的前提下作出各种变化。此外,在不冲突的情况下,本申请的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

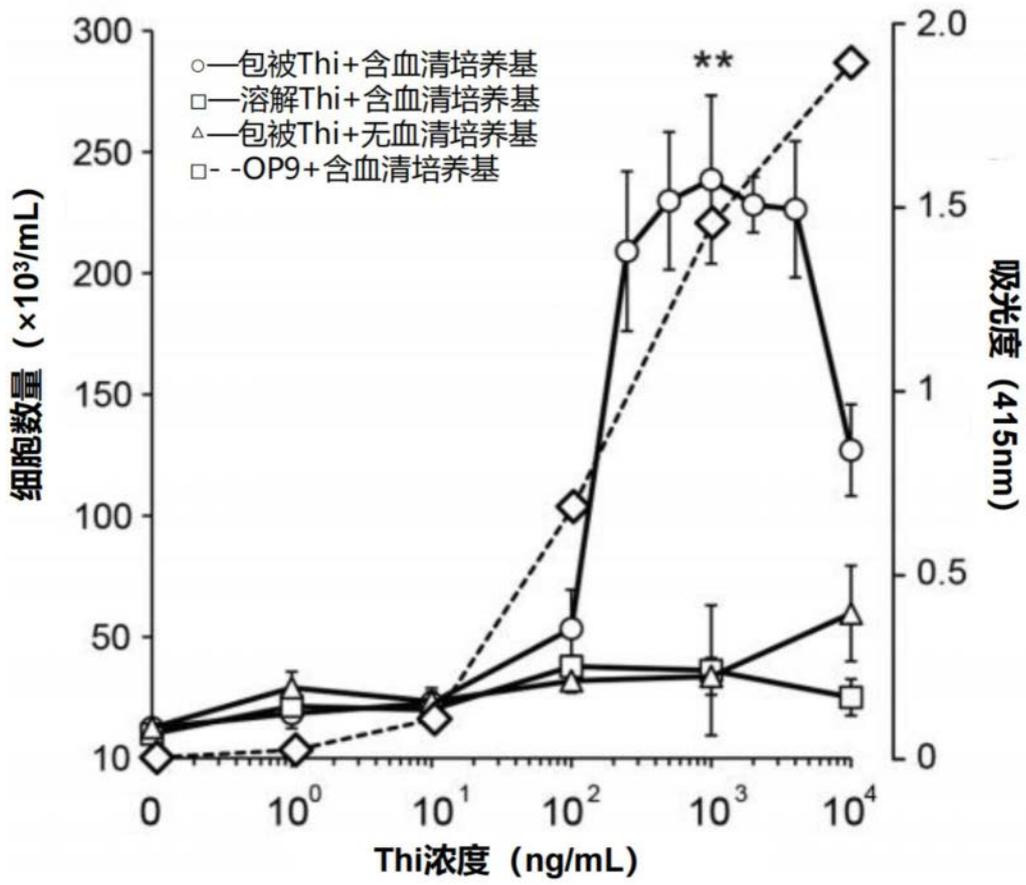


图1

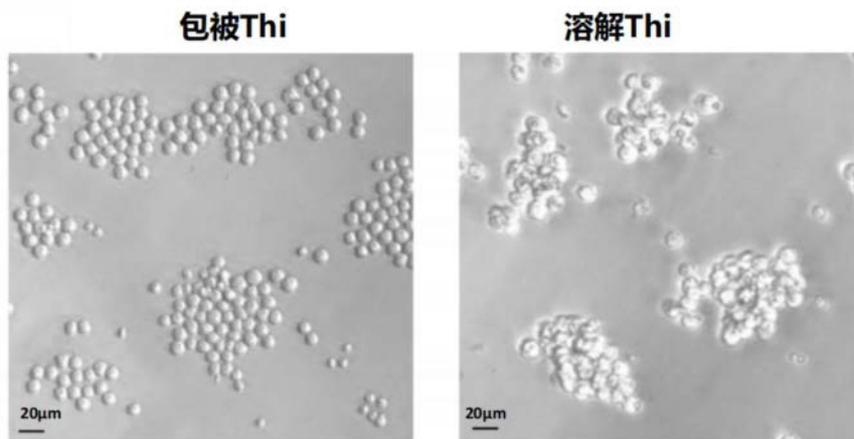


图2

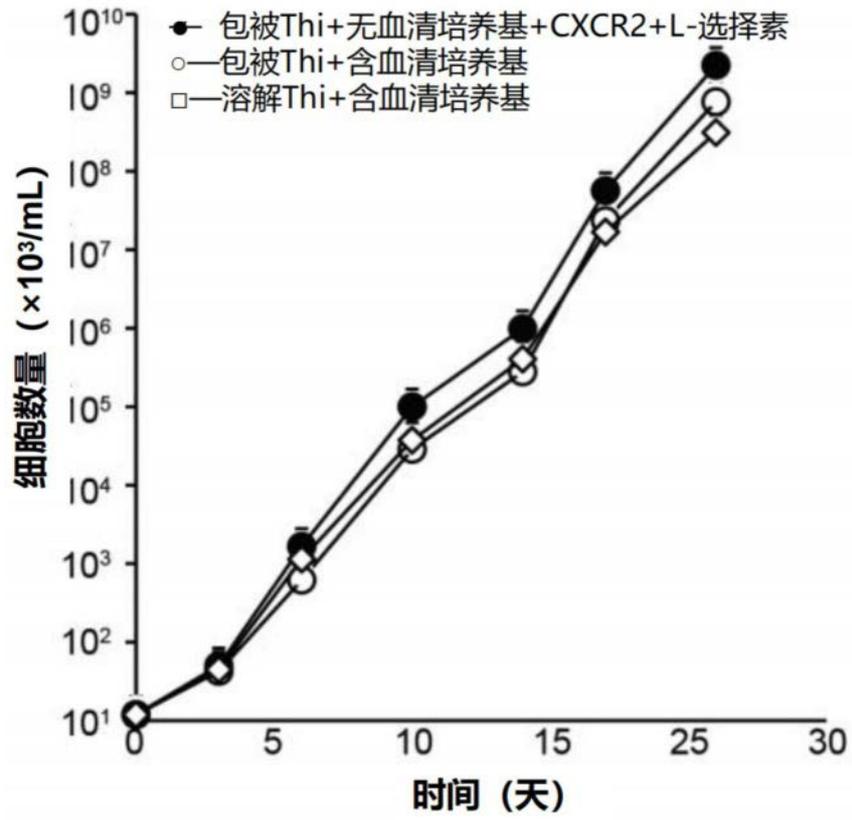


图3

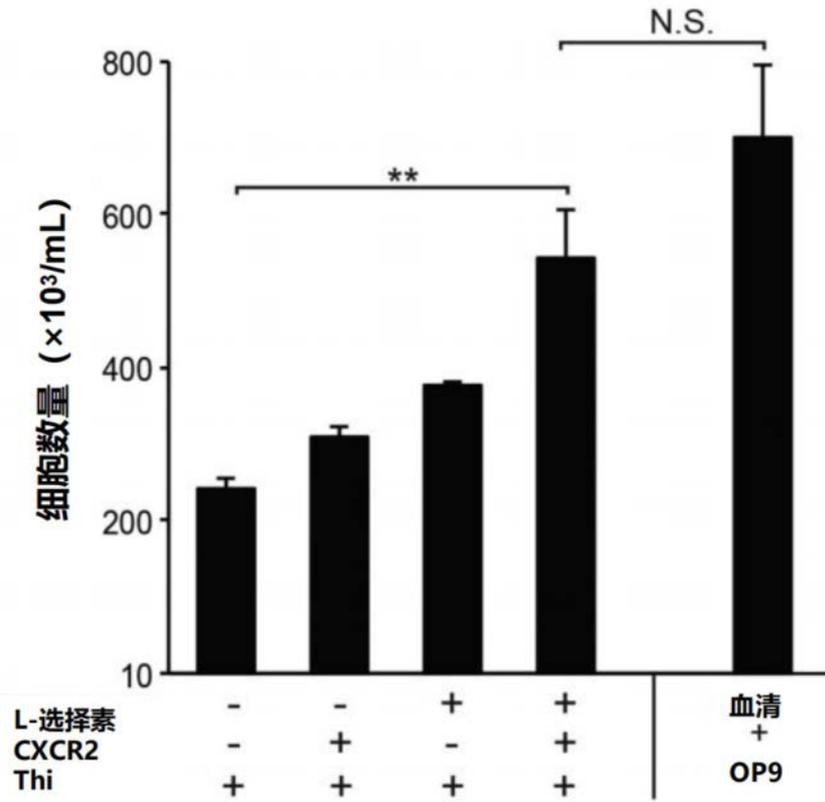


图4

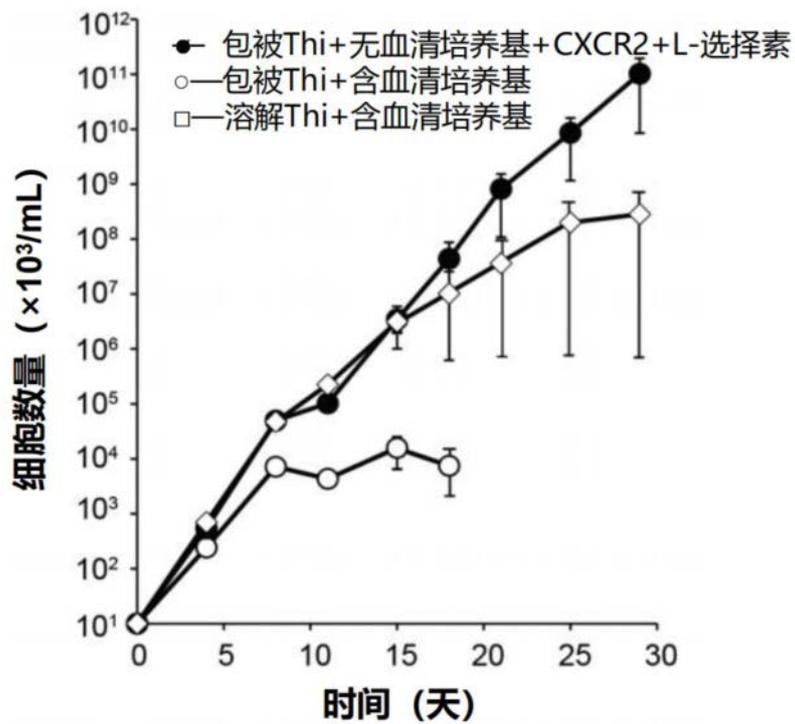


图5

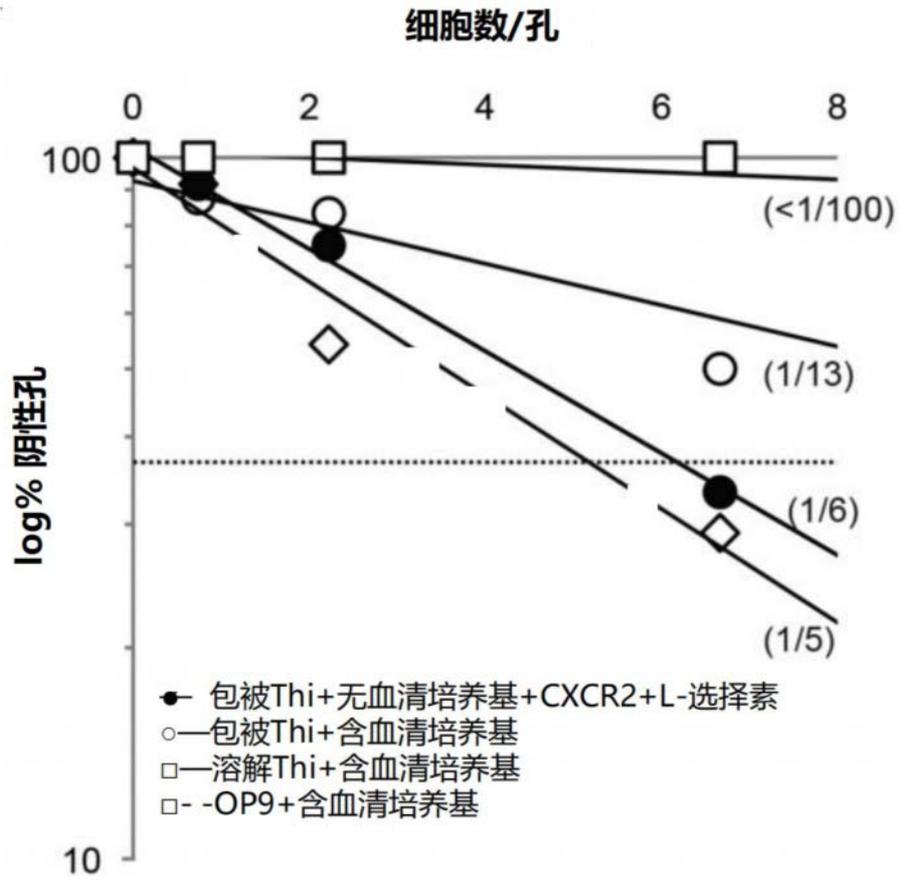


图6

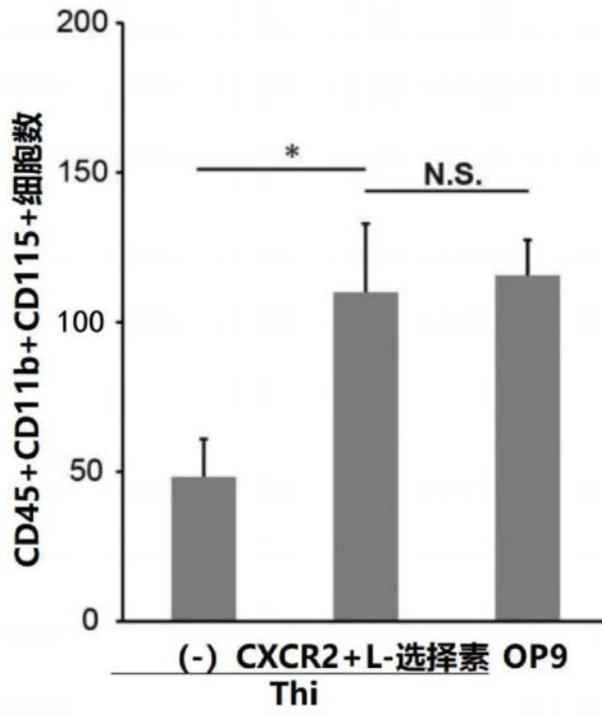


图7