

深低温冻存十六年后脐血造血干细胞活性的检测

低温医学研究室 山东 济南 时庆 侯怀水 李栋 沈柏均
山东大学齐鲁医院 鞠秀丽

【摘要】目的：检测液氮深低温冻存十六年后，脐血造血干细胞的生物学功能。方法：分离脐血单个核细胞，加入冷冻保存剂 10% DMSO+25% 人 AB 血清，在 4℃ 平衡 2h，-80℃ 过夜后，转至 -196℃ 液氮罐保存。16 年后复苏 34 份样本，分别进行有核细胞（NC）计数、台盼蓝拒染试验、CD34+ 细胞计数和甲基纤维素半固体集落培养分析。结果：通过比较冻存前后数据，MNC 回收率达到 79%，活细胞率 82%，CD34+ 细胞占 1.3%。14d 后可形成大量 CFU-GM、BFU-E 和 CFU-GEM 集落。结论：冻存 16 年后的脐带血造血细胞具有很强的生物学活性，可用于临床移植。

【关键词】 细胞冻存；脐血；造血干细胞；集落培养

脐血无疑含有丰富的造血干祖细胞，具有广阔的应用前景^[1-2]。由于多家脐血库的自体采集和宣传，这已逐渐为普通人群所接受，其中在液氮中是否能够长期保持干细胞活力已成为关注焦点，但有关 10 年以上的脐血冻存-复苏报告目前国内外还较少报道^[3-4]。我们实验室于 1991 年完成世界首例无血缘关系脐血移植术（中华器官移植杂志 1991,12:138），十余年来一直从事脐血的冻存和临床应用，近日我们复苏了一批冻存了 16 年的脐血单个核细胞，并就其复苏后的细胞活力、单个核细胞回收率、CD34+ 细胞数和 CFU 形成能力进行了检测，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 脐血的采集 脐血标本全部来自山东大学齐鲁医院产科，采用密闭式收集法采集足月顺产之健康新生儿脐血，而且产前检查孕妇和丈夫均无遗传性疾病家族史，采用柠檬酸-磷酸-葡萄糖（CPD）抗凝的密闭式血袋在胎盘娩出前从脐带断端远离新生儿侧采集。采集后 4℃ 冰箱保存，8 小时内进行分离和冻存处理。

1.2 脐血 HSC 的富集与 MNC 的分离 采用 6% 羟乙基淀粉（HES，平均分子量 480,000）（Dupon 公司，美国）沉降后 1 次离心法去除绝大多数红细胞及大部分血浆。具体方法：每份脐血按照 1:4 的比例加入脐血内，充分混匀，垂直倒置悬挂，使红细胞自然沉降 20~30 分钟，直至红细胞界面不再下降时，去除红细胞。再将富含核细胞的血浆离心（2000r/min），10℃ 10 分钟，沉降有核细胞，去上清，用 PBS 稀释至为 30~40ml，

小心加到淋巴细胞分离液上，2200rpm × 20min，吸取中间白色雾状层，PBS 洗涤 2~3 次后，调整细胞密度为 5×10^7 个/mL。

1.3 脐血冷冻保存 冷冻保护剂 DMSO 终浓度为 10%，另加终浓度为 25% 的人 AB 血清（购自山东省血站），其余组分为 1640 培养基。细胞悬液在 4℃ 平衡 2h，-80℃ 过夜后，转至 -196℃ 液氮罐保存。

1.4 脐血的检测 脐血自 1991 年 3 月起保存 16 年，2007 年 4 月从液氮罐中取出标本 34 人份，在 42℃ 水浴中迅速在 2min 内融解，分别进行下列检测：

1.4.1 有核细胞（NC）计数 用 PBS 稀释细胞，在血细胞计数板上计数 MNC，计算 MNC 的回收率。MNC 回收率（%）= 每管冻存后 MNC 总数 / 每管冻存前 MNC 总数 × 100%。

1.4.2 台盼蓝试验 用生理盐水配成 4g/L 台盼蓝液，取 0.5mL 细胞悬液放入 EP 管中，加入 100 μl 台盼蓝染液，混合 2min 后制片镜检，计数 200 个 MNC，用百分比表示，计算出台盼蓝的拒染率。

1.4.3 CD34+ 细胞计数 细胞悬液调整为 5×10^6 个/mL，在 100ul 中加入 FITC-抗人 CD34 抗体 10ul，室温孵育 20min 后 PBS 洗涤 2~3 次，置倒置荧光显微镜下照相观察，计数每视野内的细胞总数和荧光细胞总数，计算 CD34+ 细胞占细胞总数百分比。

1.4.4 造血祖细胞集落分析 采用甲基纤维素半固体培养基，以 105/ml 每孔接种于 24 孔板中，每孔终体积 1ml，每标本设 3 复孔。置 100% 湿度、37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养 14 天，计数 CFU 数目。

1.5 统计学处理 采用 mean values ± SE 表示, 应用 EXCEL 软件, 组间比较使用 t 检验, P<0.01 为有统计学差异。

2 结果

本实验共复苏了 34 份在液氮中冻存了 16 年的脐血 MNC 样本, 集落培养未见污染。通过比较冻存前后数据, MNC 回收率达到 79%, 台盼蓝拒染率即活细胞率在复苏后比较冻存前有显著下降, 其中活细胞占 82%, P<0.1。CD34+ 细胞占 1.3% (见图 1)。复苏后的脐血造血细胞可形成 CFU-GM、BFU-E 和 CFU-GEM 集落, 4~5d 就有集落形成, 14d 形成数目见表 1, 集落举例照片见图 2。

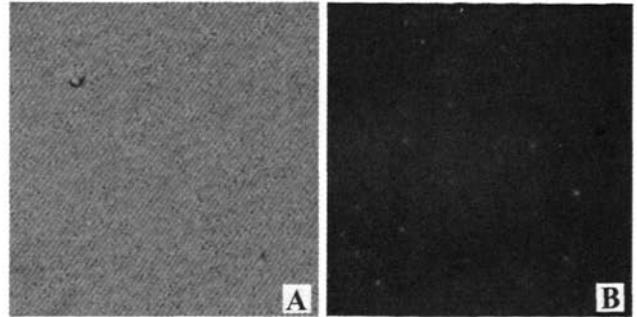


图 1 利用免疫荧光技术计算 CD34 阳性细胞比例 (100 ×)

表 1 冻存对脐血造血细胞活性的影响

	MNC 回收率	台盼蓝拒染率	CD34+ 细胞占 MNC(%)	CFU (在 10 ⁵ 个 MNC 中)
冻存前	——	96% ± 2%	——	——
冻存 16 年后	79% ± 6%	82% ± 11%*	1.3% ± 0.6%	33.1 ± 30.6
mean values ± SE; n=34; *P<0.1				

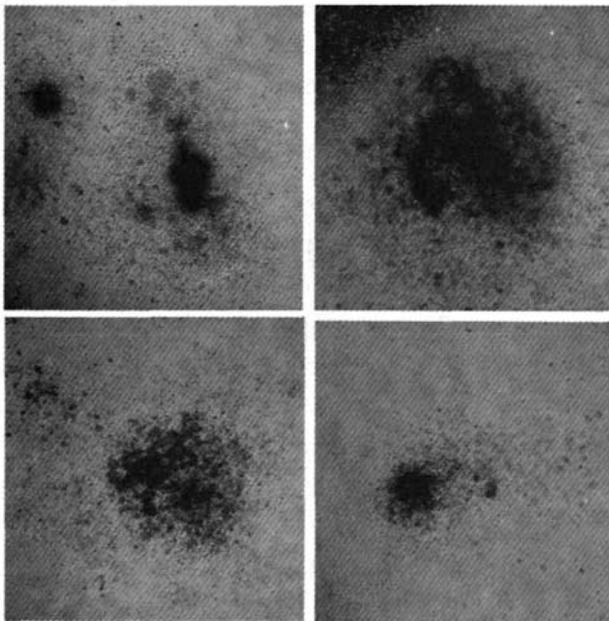


图 2 各种集落形成 (100 ×)

3 讨论

移植所用造血干细胞来源于外周血、骨髓或脐带血, 已经广泛的应用于临床治疗。由于采集和应用经

常相隔很长时间, 所以开发细胞冻存技术, 以提供良好质量的细胞就成为临床移植工作的首要要求。脐带血干细胞移植是近十年来干细胞移植领域的最重大进展之一, 欧美日等发达国家相继建成了规模不等的脐血库^[5-6]。几十年来, 冻存条件不断改进, 从最初的只知道液氮中慢冻速融, 到加入 15% 甘油, 并且加入一些多羟醇、糖类、脯氨酸和其它有机组分, 都是为了保护细胞不受冻融的损害, 并利用是否能重建受致死照射(900 r)的小鼠造血来评估冻存骨髓细胞的活力^[7]。后来又发现 DMSO 可使哺乳动物细胞复苏成活率达 86%^[8]。目前最常用的冻存细胞保护剂就是 DMSO, 但由于常温下其对细胞具有毒性, 加入后必须立即冻存, 在单人同时处理多份样品时更应该注意这一点, 可设置助手完成冻存工作。

由于低温冻存和复苏过程对造血细胞的活力有一定的损伤, 进行计数 CD34+ 细胞、克隆形成率和 LTC-LC 分析, 是临床应用前检验造血干祖细胞活性公认敏感方法。已经证明外周血细胞可在液氮中冻存 10 年保持干细胞活力^[9]。CD34+ 细胞是造血干/祖细胞的一个重要表面标志。CD34+ 细胞含量及总有核细胞数常用于反映脐血的质量。为了更好地了解低温冻存后脐

血的质量,我们采用免疫荧光技术分析了复苏后脐血 CD34+ 细胞所占百分比为 1.3%,证明其具有较高的造血干/祖细胞活性。之所以未使用流式细胞术,是因为存在死细胞,复苏后细胞有少量团块存在,影响流式细胞仪使用。有文献^[10]指出,要想获得较好的 CD34+ 细胞收率,首先要保证在脐血采集的 48h 内进行分离和冻存。

检测集落形成能力是对 CD34 指标的重要补充,因为集落形成和移植的目的重建造血密切相关,是评价造血干细胞扩增潜能的重要指标,尤其是 CFU-GM 的形成能力。我们考察了 14 天中各种集落的形成能力,发现可形成 CFU-GM、BFU-E 等各种集落,我们观察到复苏冻存 16 年的脐血后第 3 天后有小集簇形

成,第 5~6 天集落数量和数目逐渐增多,其组成多为单核、巨噬细胞,CFU-GEM 由粒、单核、红细胞组成。表明我们冻存的脐血具有很强的增殖和分化能力。

本实验所采用的冻存技术是 1991 年进行的,当时还未购置程序冷冻仪,现在脐血冻存所采用的技术应该能获得更好的结果。也有文献^[11]比较了程序冷冻和非程序冷冻的脐血干细胞效果,其在总有核细胞数、总 CD34+ 细胞数和集落形成率上未有明显差异,在集落形成率上程序降温冷冻法稍高。我们的实验进一步证明,采用合适的细胞保护剂,采用 -80℃ 直接到液氮的简便方法也可以很好的长期保存脐血造血细胞,冻存 16 年后的脐带血造血细胞具有很强的生物学活性。

参 考 文 献

1. Gluckman E, Rocha V, Chammard BA, et al. Outcome of cord blood transplantation form related and unrelated donors. *N Engl J Med*, 1997, 337(6):373-381.
2. 奚永志 唐佩弦 深入开展脐血干细胞的基础与临床研究 *中华血液学杂志* 1999, 20 (8): 397-8
3. Kobylka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*. 1998 May 15;65(9):1275-8.
4. Broxmeyer HE, Cooper S. High-efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp Immunol*. 1997 Jan;107 Suppl 1:45-53.
5. 沈柏均 脐血库语脐血移植发展现状 *中华血液学杂志* 2003: 24 (3): 113-4
6. 崔砚 高桥恒夫 日本脐血库和脐血移植的现状 *中华血液学杂志* 2006: 27 (8): 571-2
7. Bender MA, Tran PT, Smith LH. Preservation of viable bone marrow cells by freezing. *J Appl Physiol*. 1960 May;15:520-4.
8. Brown BL, Nagle SC. Preservation of Mammalian Cells in a Chemically Defined Medium and Dimethylsulfoxide *Science* 1965 Vol. 149. no. 3689, pp. 1266 1267
9. Denz U, Wider D, Mueller A, et al., High Efficiency Recovery of Hematopoietic Progenitors from Peripheral Blood Harvests after Short- and Long-Term Cryopreservation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005 106: Abstract 5275
10. Moldenhauer A, Wolf J, Habermann G, et al. Optimum Storage Condition of Cord Blood before Cryopreservation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005 106: Abstract 1902
11. Mrowiec ZR, Fernandez-DeLeon M, Marchioni M et al. Comparison of Controlled vs Non-Controlled Rate Freezing of Umbilical Cord Blood Units. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004 104: Abstract 5011.