



参考文献

- 1 Fontan F, Choussat A, Deville C, et al. Aortic valve homo-grafts in surgical treatment of complex cardiac malformations[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1984, 87: 694.
- 2 桂龙升, 刘迎龙, 萧明第, 等. 深低温液氮保存的新生儿同种带瓣主动脉、肺动脉在治疗婴幼儿复杂先天性心脏病中的应用[J]. 中国循环杂志, 1996, 3(11): 148.
- 3 崔向东, 荣佑宝, 刘金刚, 等. 活性生物瓣膜和血管冻贮技术的初步研究[J]. 青岛医学院学报, 1993, 29(2): 93.
- 4 Angell WW, Oury J H, Lamberti JJ, et al. Durability of the viable aortic allografts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1989, 98(1): 48.
- 5 Born CH, Roon AJ, More WS. Maintenance of viable arterial allografts by cryopreservation[J]. Surgery, 1978, 83(4): 382.
- 6 Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, et al. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993, 106(5): 912.
- 7 Hoekstra F, Knoop C, Aghai Z, et al. Stimulation of immune-competent cells in vitro by human cardiac valve-derived endothelial cells[J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60(Suppl 2): S131.
- 8 Mulligan MS, Tsai TT, Kneebone JM, et al. Effects of preservation techniques on in vivo expression of adhesion molecules by aortic valve allografts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 107(3): 717.

深低温冻存对脐血单个核细胞 免疫特性影响的研究

孟凡会 田青武 曹永献 刘忠强 孙波 赵洪国

青岛大学医学院附属医院 266003

摘要: 目的 研究冻存过程对脐血造血细胞免疫表型和细胞因子分泌量的影响, 为脐血临床移植提供实验依据。方法 18例脐血标本分离液分出单个核细胞(MNC)后, 分成三组, 即新鲜标本对照组、DMSO对照组及低温冻存组。低温冻存组加二甲亚砜(终浓度为10%), 经程控降温后放-196℃液氮保存, 冻存30天后在40℃的水浴中快速复苏。复苏后和其它两组一样进行细胞计数、台盼蓝拒染率检测以及流式细胞仪单克隆抗体检测单个核细胞中CD4⁺、CD8⁺细胞亚群的比例; 并经PHA刺激, 培养72小时, 用ELISA法检测培养上清液中白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、 γ -干扰素(IFN- γ)及粒-巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)的含量。结果 台盼蓝拒染率比新鲜标本对照组有所下降($t=7.55, P<0.01$)。细胞亚群CD4⁺细胞比例明显升高($t=-2.83 \sim -2.73, P<0.05$)。IL-2、IL-6及IFN- γ 三种细胞因子检测结果, 除IL-6与新鲜标本对照组比较差别不具统计学意义外, 其它均有所上升($t=-7.91 \sim -2.60, P<0.01$ 或 $P<0.05$)。GM-CSF与DMSO对照组无差别, 与新鲜标本对照组比较有明显的下降($t=7.74, P<0.01$)。结论 冻存可以使淋巴细胞亚群及细胞因子分泌量发生改变, 此冻存过程可以提高脐血造血细胞的免疫功能。在脐血移植后, 这可能有利于机体早期免疫机能的重建, 提高抗感染、抗肿瘤的能力。

关键词: 细胞因子; 白细胞分化抗原4(CD4); 白细胞分化抗原8(CD8); 深低温; 脐血单个核细胞



Experimental study on the effect of cryopreservation on cord immuno-characteristic of cord blood mononuclear cells

Abstract: Objective To observe the effects of cryopreservation on cord blood mononuclear cells (CBMC), and to provide evidences for placental-blood transplant. Methods The CBMC were separated from 18 cord bloods, and were divided into three groups: fresh sample control, fresh sample to contain 10% DMSO control and cryopreservation group. After cryopreserved to the CBMC of cryopreservation group in -196°C liquid nitrogen for 30 days and thawed at 40°C , the cell viability of CBMC and the CD4+ and CD8+ T lymphocyte were analysed by Typan blue exclusion and with monoclonal antibody technique and flow cytometry in cord blood mononuclear cells of three groups. After stimulated to CBMC with phytohemagglutinin(PHA), and cultured for 72 hours in vitro, the levels of Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-2 (IL-2), granulocyte-macrophage-cology-stimulating factor (GM-CSF) and Interferon- γ (IFN- γ) in the supernatants of CBMC were detected by ELISA respectively. Results First, the CD4+ cells percentage, IFN- γ and IL-2 of cryopreservation group were higher than that of two controls ($t=2.83 \sim 2.73$, $P<0.05$ and $t=7.91 \sim 2.60$, $P<0.01$ or $P<0.05$). Second, IL-6 of cryopreservation group was significantly higher than that of fresh sample to contain 10% DMSO control ($t=4.29$, $P<0.01$), but that was no difference to fresh sample control ($t=1.78$, $P>0.05$). The last, the level of GM-CSF in the supernatants of cryopreservation group was decreased significantly than that of the fresh control ($t=7.74$, $P<0.01$), but that was no significant change to contain 10% DMSO control ($t=4.45$, $P>0.05$). Conclusions After cryopreservation, the ratio of CD4+ cell and the levels of cytokines were increased. This indicates that cryopreservation raised the immuno-activitis of CBMC, and that maybe accelerated the early immune reconstitution which would advance resistance against infectious agents and tumor cells in recipient undergoing cord blood stem cell transplantation(CBSCT).

Key words: cytokine; CD4; CD8; cryopreservation; cord blood mononuclear cells(CBMC)

随着低温生物医学研究的不断深入,目前许多细胞、组织能够在超低温(-196°C)中长期贮存而不丧失其活力,这为临床上各种各类的移植提供了便利条件。移植手术不仅要求组织细胞具有细胞活性,而且对保存组织的免疫原性有较高的要求。低温免疫研究是低温生物学应用基础研究的前沿,有关低温保存对组织细胞免疫原性的影响,近几年引起国内外低温生物学者和临床移植学家的高度重视。

文献中对冻存组织移植后产生低温免疫现象的报道较多。Bisito DV 等^[1]的研究表明:冻存可使皮肤 Langerhans 细胞表面抗原的表达减弱,可以延长同种植皮的存活时间。Flesch BK 等^[2]观察到大鼠冻存后的胰岛 MHC-II 抗原阳性细胞明显减少,进行同种移植后,存活时间较新鲜胰岛移植明显延长。Venkataraman 等^[3]的实验观察到人外周血单个核细胞冻存后,细胞因子 IL-6 和 TNF- α 分泌明显增加。Andreoletti 等^[4]报道深低温保存猪肝细胞可使细胞膜蛋白中 α 螺旋增加,并导致移植细胞的免疫反应原性降低,复温后的肝细胞进行移植可提高急性肝衰的治愈率。马骥等^[5-7]研究了超低温冻存前后外周血淋巴细胞(LC)的转化活性改变,发现冻存后 TLC 转化中的母细胞型和分裂型百分比率下降明显,前者由 38.23%减至 23.48%,后者由 1.29%减至 0.36%,说明超低温冻存可影响 TLC 内蛋白质和核酸合成,但对 B 淋巴细胞(BLC)影响不明显;同时研究发现深低温冻存后 TLC 约发生 15%坏死性改变,35%变性性改变,而 70-80%的 BLC 结构保持良好,超低温损伤的主要的细胞器是线粒体,其次是细胞膜,指出超低温选择性的损伤 TLC,而对 BLC 的损伤较小,认为冻存移植有利于受者体液免疫功能的恢复与重建;应用流式细胞术和单克隆抗体检测技术,对超低温冻存前后 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞及其亚群百分率和荧光强度进行分析,结果发现冻存后 CD8+细胞百分率由 35.7%降至 33.4%,平均荧光强度由 202.1%减至 162.4%,而 CD3+、CD4+细胞值无改变。雷从民等^[8]以白细胞介素 2(IL-2)依赖细胞株 CTL2 细胞系为工具研究了冷冻保存对人骨髓细胞产生 IL-2 能力的影响,发现经 -196°C 冷冻保存过程处理的骨髓细胞产生 IL-2



能力增加,在适当稀释度下可增加到 10 倍以上,这一增加与在液氮低温下保存的时间长短无关。杨晶等^[9]探讨了冷冻保存对骨髓单个核细胞分泌 IL-1 和 IL-6 的影响,冻存后细胞经有丝分裂原(LPS)刺激后培养上清中的 IL-1 和 IL-6 的含量均显著高于新鲜细胞,细胞表面 IL-1 和 IL-6 抗体平均荧光强度表达冻后细胞明显高于新鲜细胞,提出冷冻对抑制性单核细胞的灭活促进了细胞 IL-1 和 IL-6 的分泌,认为冻后细胞的这一状态有利于机体免疫功能的重建。

现在形成共识的是:组织细胞或肿瘤组织冷冻后活力可以产生变化,同时还将形成一种特异性抗原,此抗原可以引起机体产生对该组织细胞或肿瘤组织发生反应的特殊抗体,这一现象称之为低温免疫反应。1996 和 1998 年第 32 届和 33 届国际低温生物学大会上,与会专家学者一致指出全世界的低温生物学工作者应对低温免疫这一特殊现象投入更大的精力进行系统和深入地研究。

脐血移植有众多优点,已跨越了实验性治疗阶段,正日益广泛用于临床。然而脐血移植也暴露出一些困扰临床医生的严重问题。如脐血移植后 GVHD 的发生率及严重程度虽不如骨髓移植,但脐血移植后恶性肿瘤的复发率较高,儿童恶性血液病脐血移植后 2 年复发率>60%^[10]。还有脐血移植后最常见的并发症是早期并发严重感染,占脐血移植全部死亡患者的 50%以上^[11]。根据骨髓移植的经验,这此都与移植后早期免疫功能的重建相关,而早期免疫功能的重建与脐血中的免疫活性细胞(尤其是 T 淋巴细胞)、造血因子及细胞因子等关系密切,可见在脐血移植时免疫活性细胞功能作用的重要性。目前以脐血免疫活性细胞为对象实验研究很少,而对脐血免疫活性细胞低温免疫反应的研究也不多^[12-14]。由于移植免疫与脐血免疫活性细胞(尤其是 T 淋巴细胞)具有重要的关系,本文将脐带血单个核细胞为研究对象,进行一些与低温保存有关的免疫特性方面的研究,主要包括对淋巴细胞亚群及细胞因子的影响。

材料与方法

1 主要药物与试剂

二甲亚砜(DMSO),Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液,RPMI-1640 细胞培养基,植物血凝素(PHA),胎牛血清, L-谷氨酰胺, FITC-抗 CD4/cd8 双标记抗人单抗试剂盒,白细胞介素 2(IL-2)测定试剂盒,白细胞介素 6(IL-6)测定试剂盒,粒巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)测定试剂盒, γ 干扰素(IFN- γ)测定试剂盒等。

2 主要仪器器材

超净工作台,液氮保存罐,程控降温仪,低温高速离心机, XE-2100 型五分类血细胞分析仪, EPICSELITE 型流式细胞分析仪, CO₂ 培养箱, CODA 型全自动酶免分析仪, -86℃ 低温冰箱等。

3 研究方法

3.1 主要试剂配制

(1)台盼蓝染色液的配制

称取台盼蓝 4g,加入少量三蒸水研磨,加水至 100ml,用滤纸过滤,配成 4%的台盼蓝母液, 4℃ 保存。使用时将母液用 PBS 稀释成 0.4% 台盼蓝工作液。

(2)RPMI-1640 培养液的配制

[1]洗涤用 RPMI-1640 培养液

取一袋 10.3g RPMI-1640 细胞培养基粉溶于 800ml 新鲜双蒸水中,并用三蒸水冲洗包装袋 2-3 次,冲洗液一并加入培养基中,加入 2.0g NaHCO₃,充分搅拌至粉剂全部溶解。加入 300mg/l 谷氨酰胺 10ml,加三蒸水至 950ml 摇匀,然后用一个当量的盐酸及 NaOH 调 PH 到 7.2 左右,加三蒸水到 1000ml。在超净工作台内,用已经消毒好的蔡式滤器将配制好的培养液除菌过滤,分装于 250ml 已经消毒好的玻璃瓶中,加入青霉素及链霉素(终浓度为青霉素 100 单位/ml,链霉素 100 μ g/ml),



放 4℃或-20℃保存备用。

[2]低温保存用 RPMI-1640 培养液

将上述洗涤用 RPMI-1640 培养液, 加入已灭活的胎牛血清(终浓度为 10%)。

[3]培养用 RPMI-1640 培养液

将低温保存用 RPMI-1640 培养液, 加入 PHA(终浓度为 200 μg/ml)。

3.2 脐带血采集

选择 18 例青岛大学医学院附属医院剖腹产的胎儿的脐带血。胎儿从母亲腹腔中取出后, 立即在距脐 5~7cm 处结扎脐带并切断。在胎盘未剥离前, 用 20ml 注射器经脐静脉抽取 20ml 脐血, 将取得的血液注入含肝素抗凝剂的无菌专用流式细胞检测标本管中, 混匀后供作分离单个核细胞之用。

3.3 脐带血单个核细胞(CBMC)的分离

(1)取得的脐血在超净工作台中, 立即加等量的 Hank's 液并混匀。

(2)将 5ml 比重为 1.077 的淋巴细胞分层液(聚蔗糖-泛影葡胺, Ficoll-Hypaque)加入 20ml 无菌离心管中, 将离心管稍倾斜, 用无菌吸管吸取 10ml 稀释脐血沿管壁缓缓加入到淋巴细胞分层液表面上(注意保持界面清晰), 将离心管加无菌胶塞置于试管架上, 一式四份。

(3)将四份标本置于 4℃低温水平离心机中, 以 2000r/min 离心 20 分钟, 取出标本后可见悬浮于血浆与分离液的呈白膜状的单个核细胞层, 用无菌吸管吸取界面的细胞层, 置于无菌试管中。

(4)将取出的单个核细胞, 加 5 倍的体积的洗涤用 RPMI-1640 培养液, 混匀后在 4℃下以 2000r/min 离心 10 分钟, 弃去大部上清液, 留 1ml 左右混匀沉淀细胞。

(5)将混匀上述的沉淀细胞再加 5ml 洗涤用 RPMI-1640 培养液, 再混匀后, 在 4℃以 1000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清液。

(6)将细胞重悬于 10ml 低温保存用 RPMI-1640 细胞培养液中使成细胞悬液, 留作备用。

3.4 研究分组

将留作备用的 10ml 细胞悬液分成 3 份, 每份 3ml 分别标明新鲜标本对照组、DMSO 对照组及低温冻存组。

(1)新鲜标本对照组

取 0.5ml 细胞悬液进行细胞计数; 0.2ml 用于台盼蓝染液染色, 计算细胞活率; 从其余标本中取 1ml 用 EPICS XL 型流式细胞分析仪进行 CD4 与 CD8 检测; 另取 1ml 进行细胞培养。

(2)DMSO 对照组

与新鲜标本对照组不同的是, 加 300 μl DMSO 于 3ml 细胞悬液中。其余过程完全同新鲜标本对照组。

(3)低温冻存组

与 DMSO 对照组不同的是, 将加入保护剂的细胞悬液分装于低温冻存管中, 每份 1ml。液氮冻存 30 天后, 取出 40℃水浴复温, 以后处理过程同两对照组。

3.5 脐血单个核细胞的冻存及复苏

(1)冻存

将细胞悬液保持一定强度的振荡, 用微量加样器吸取 300 μl DMSO, 缓慢加入 3ml 细胞悬液中, 整个过程保持 10 分钟左右。采用程控降温仪降温: (1)4℃平衡 10 分钟。(2)以 1℃/min 速度降到-40℃。(3)再以 5℃/min 速度降到-80℃, 最后取出立即转移至液氮罐内-196℃保存。

(2)复苏

将冻存的标本从液氮中取出时, 在液氮气相中平衡 15 分钟, 立即放入 40℃恒温水浴箱中, 并轻轻振荡液氮保存管, 使管内标本充分解冻复苏, 复苏时间控制在 2 分钟以内。



3.6 脐血单个核细胞的培养

(1)取各研究组细胞悬液 1ml 放入 5ml 细胞培养瓶中,立即加 4ml 培养用 RPMI-1640 细胞培养液(含终浓度为 10%的胎牛血清、200 μ g/ml 的 PHA、青霉素 100 单位/ml 及链霉素 100 μ g/ml)。

(2)将细胞培养瓶放入 37℃ 饱和湿度, 5%CO₂ 的 CO₂ 培养箱中培养 72 小时。

(3)培养 72 小时后,以 2000r/min 离心 5 分钟,收取上清液于 -70℃ 保存待测细胞因子(IL-2、IL-6、GM-CSF 及 IFN- γ)。

3.7 研究检测

3.7.1 细胞计数及活率的检测

各研究组细胞悬液分别取 0.5ml 标本,用 XE-2100 型五分类血细胞分析仪进行细胞分类计数;同取 20ul 细胞悬液加入 160ul PBS 中,然后加入 0.4% 台盼蓝工作液 20ul,使台盼蓝染液的终浓度为 0.04%,充分混匀后染 3 分钟,计数 200 个细胞,凡胞浆染成蓝色者为死细胞,而活细胞则拒染。

3.7.2 CD4 与 CD8 的检测

(1)取 2 个检测管,1 号管加入 HLA-CD4FITC/HLA-CD8PE 双标记荧光抗体 20 μ l,2 号管加入 IgG1FITC/IgG1PE 双标记荧光抗体。两管均加入细胞悬液 100 μ l,室温避光孵育 20min 后,置 Coulter Q-PREP 工作站溶解红细胞,静止 10min 后,2000r/min 离心 10min,弃上清,最后以 0.5ml PBS 悬浮细胞,摇匀待测细胞,上流式细胞仪检测。

(2)光源 448nm 的氩离子激光, FITC 收激发后发出绿色荧光, PE 发出红色荧光。流式细胞仪检测每次样本前用 Flowcheck 进行光路与流路的校正,使其变异系数在 2% 以内。根据细胞的 FCS(前向角散射)和 SSC(侧向角散射)特点设置淋巴细胞门。标本上机后记数 5000 个淋巴细胞,荧光强度以对数放大,光散射数据存盘,测试完后由计算机进行数据分析。流式细胞仪分析图像如图 1、2、3 所示。

3.7.3 细胞因子(IL-2、GM-CSF、IFN- γ 和 IL-6)的测定

(1)吸取 100 μ l 标准稀释液到抗体酶标板的标准孔 B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1、E2、F1、F2 中。

(2)加 200 μ l 标准液到 A1 与 A2 孔中,从 A1 与 A2 孔中转移 100 μ l 到 B1 与 B2 孔中,通过吹吸混匀(注意小心不要刮了测量孔内表面)。

(3)重复这样的过程,从 B1 与 B2 孔到 C1 与 C2 孔、C1 与 C2 孔到 D1 与 D2 孔中等等,用于创建两条并行的 IL-2 标准线(浓度从 31.25-1000pg/ml),从最后的微孔(即 F1 与 F2 孔中)丢弃 100 μ l 液体。

(4)吸 100 μ l 标准稀释液到空白孔(G1 与 G2)。

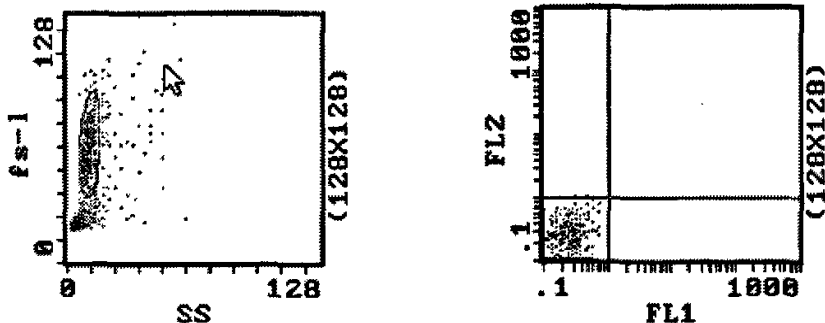


图 1

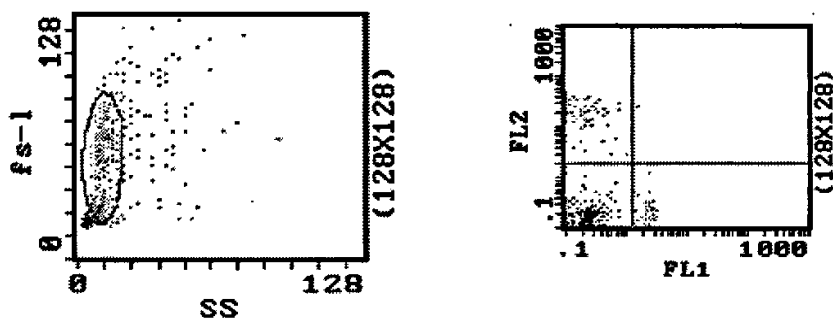


图 2

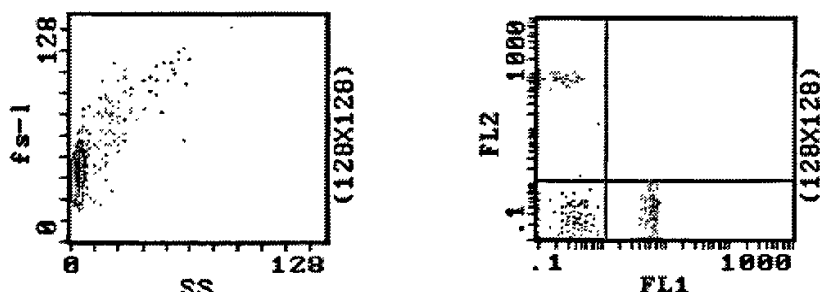


图 3

- (5)加 100 μ l 质控物到质控孔(H1 与 H2)
- (6)吸取 100 μ l 细胞培养的上清液到标本孔。
- (7)所有孔(包括空白孔)每孔加 50 μ l 稀释的生物素标记的抗体液。
- (8)将酶标板加盖在室温(18~25 $^{\circ}$ C)下孵育 1 小时。
- (9)移去盖,按下面方法冲洗:吸出每个孔中的液体后,每孔加 0.3 毫升冲洗液,再吸出每个孔中的液体,重复洗板 3 次。
- (10)所有孔(包括空白孔)每孔加 100 μ l 抗生蛋白链菌素-HRP 溶液。
- (11)加盖在室温(18~25 $^{\circ}$ C)下孵育 30 分钟。
- (12)去盖清空每个孔,按(9)洗板后,立即过渡到下一步。
- (13)所有孔加 100 μ l 底物液,在室温黑暗处(用铝箔包裹避光)孵育 15 分钟。
- (14)酶-底物反应 15 分钟后,迅速加入 100 μ l 硫酸终止反应,加入硫酸后立即于全自动酶标仪(以 450nm 作主波长,620nm 作为参考波长)读取各孔的吸光度,记录数据。

以上是以 IL-2 的检测操作为例,其余细胞因子的检测步骤与 IL-2 相同,只是所用试剂及标准液不同。

3.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。结果呈正态分布以均数 $\pm$ 标准差表示,采用配对 t 检验对结果进行分析, $P < 0.05$ 为差别具有显著性意义。

结果

1 细胞计数检测结果

各研究组脐血单个核细胞计数检测结果如表 1 所示。

表 1 脐血单个核细胞计数检测结果比较($\times 10^6/\text{ml}$, $\bar{x} \pm s$)

	n	CBMC
新鲜标本对照组	18	2.482 ± 0.744
DMSO 对照组	18	2.469 ± 0.738
低温冻存组	18	2.476 ± 0.737

通过以上结果可以看到,三个处理组单个核细胞计数结果虽有一定的差别,但差别无统计学意义($t=0.444 \sim 0.598$, $P>0.05$)。

2 细胞计数及活率的检测结果

各研究组脐血单个核细胞活率检测结果如表 2 所示。

表 2 脐血单个核细胞活率检测结果比较(% , $\bar{x} \pm s$)

	n	活率
新鲜标本对照组	18	96.03 ± 2.45
DMSO 对照组	18	$93.00 \pm 2.74^*$
低温冻存组	18	$92.36 \pm 2.64^*$

与新鲜标本对照组比较, $*t=6.62 \sim 7.55$, $P<0.01$

由以上结果可见,加了 DMSO 冷冻保护剂的两研究组,细胞的活率都有了一定程度的下降,与新鲜标本对照组比较差别极具有统计学意义($t=6.62 \sim 7.55$, $P<0.01$),而 DMSO 对照组与低温冻存组之间差别无统计学意义($t=1.35$, $P>0.05$)。

3 CD4+、CD8+细胞的检测结果

各研究组脐血单个核细胞 CD4+、CD8+检测结果如表 3。

表 3 脐血单个核细胞 CD4+、CD8+检测结果比较(% , $\bar{x} \pm s$)

	n	CD4	CD8
新鲜标本对照组	18	37.91 ± 17.92	13.93 ± 5.63
DMSO 对照组	18	37.83 ± 18.01	13.83 ± 5.75
低温冻存组	18	$42.01 \pm 18.31^*$	15.03 ± 6.09

与两对照组比较, $*t=-2.83 \sim -2.73$, $P<0.05$

由表 3 所示,可以看到 CD4+细胞群经过低温冷冻后,百分占有率上升,与两对照组比较差别具有显著性意义($t=-2.83 \sim -2.73$, $P<0.05$),而 DMSO 对照组与新鲜标本对照组差别无统计学意义($t=0.736$, $P>0.05$)。虽然 CD8+细胞群所占百分率也有所上升,但与其他两组比较差别显著性($t=0.266 \sim 0.495$, $P>0.05$)。

4 细胞因子的检测结果

各研究组脐血单个核细胞经 PHA 刺激后分泌的细胞因子(IL-2、GM-CSF、IFN- γ 及 IL-6)检测结果表 4 所示。

由表 4 数据看到, DMSO 对照组较新鲜标本对照组经 PHA 刺激后四种细胞因子的分泌量都有所下降,经统计学分析,差别均具有极显著性意义($t=7.24 \sim 7.75$, $P<0.01$)。相反低温冻存组 IL-2、IL-6 及 IFN- γ 三种细胞因子较两对照组均有所上升,经统计学分析,冻存组只有 IL-6 与新鲜标本对照组比较差别不具统计学意义($t=-1.78$, $P>0.05$),其它与两对照组差别均具有显著性($t=-7.91 \sim -2.60$, $P<0.01$ 或 $P<0.05$)。GM-CSF 低温冻存组与 DMSO 对照组无差别($t=4.45$, $P>0.05$),而两组与新鲜标本对照组比较差别具有极显著性意义($t=6.86 \sim 7.74$, $P<0.01$)。

表4 脐血单个核细胞细胞因子检测结果的比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

	n	IL-2	IL-6	IFN- γ	GM-CSF
新鲜标本对照组	18	175.44 $\pm$ 105.46	107.86 $\pm$ 53.30	55.85 $\pm$ 35.15	285.23 $\pm$ 111.7
DMSO 对照组	18	139.28 $\pm$ 90.05*	97.72 $\pm$ 50.91*	42.83 $\pm$ 29.55*	242.07 $\pm$ 90.55*
低温冻存组	18	211.48 $\pm$ 148.97***	114.61 $\pm$ 59.89**	75.49 $\pm$ 46.87**	240.86 $\pm$ 91.14*

与新鲜标本对照组比较, * $t=6.86 \sim 7.75$; $P<0.01$; 与 DMSO 对照组比较, ** $t=-4.87 \sim -4.29$, $P<0.01$; 与新鲜标本对照组比较, * $t=-2.61$, $P<0.05$; 与两对照组比较, ** $t=-7.91$, $P<0.01$

讨论

本文就脐血造血细胞为对象进行了深低温对其免疫原性及活性方面研究, 发现如下结果, 并分别加以讨论。

1 脐血单个核细胞以 10% 的 DMSO/胎牛血清为保护剂, 经程控降温于液氮保存 30 天后, 细胞的活率达 92.36%, 这与以往的研究相近。辜少玲等[15]进行了在液氮和气氮中保存脐血的实验, 发现在液氮中保存半年和一年的脐血细胞存活率分别为 96.5% 和 95.7%, 而保存在气氮中(-125 ~ -150℃)保存半年和一年的脐血细胞存活率分别为 92.9% 和 87.8%。吴燕锋等[16]以 DMSO/羟乙基淀粉/人体白蛋白为低温保护剂保存脐血, 用程控降温至-120℃, 放入液氮中保存一至四年, 60 例脐血冻存后细胞存活率为 96.39%, 冻存时间基本无影响。

2 脐血 T 细胞亚群中 CD4⁺细胞比例明显升高, 由冻前的 37.83% 上升到 42.01%, 差别具有明显意义; 而 CD8⁺细胞群虽有一定升高, 由 13.83% 升到 15.03%, 但差别不具统计学意义。这与以前研究低温对外周血淋巴细胞亚群造成的影响有所不同^[6, 18-19]。这可能是由于采用的研究对象不同的原因, 因为脐血淋巴细胞与外周血淋巴细胞在表面结构上有一定的不同: 脐血中的 CD4⁺T 细胞高于成人外周血, 而且大部分脐血 T 细胞为 CD4⁺CD45RA⁺细胞(占总淋巴细胞的 51%, 占总 CD4⁺细胞的 88%), 而成人外周血以 CD4⁺CD45RO⁺为主(占总淋巴细胞的 41%)^[20, 21]。由于 CD4⁺T 细胞是主要的辅助 T 细胞, 能够促进 B 细胞、T 细胞和其它免疫活性细胞的增殖与分化, 协调免疫细胞的相互作用, 在免疫应答中起重要的作用^[22]。而本研究表明 CD4⁺T 细胞经过深低温作用后所占比例上升, 在理论上提高了细胞免疫应答能力, 对脐血移植后机体免疫功能的早恢复具有好处。

3 脐血单个核细胞分泌的 IL-6 有明显的上升, 这与杨晶等^[9]以骨髓单个核细胞为研究对象, 发现经低温处理后 IL-6 分泌量提高有相同之处, 只是升高幅度及浓度含量差别较大, 这可能是由于研究对象及所采用的刺激物不同的原因。人 IL-6 分子由 212 个氨基酸组成, 其基因定位于 7 号染色体。是一种多功能细胞因子, 作用相当广泛, 具有多种重要的生物学效应, 它可刺激 B 细胞分化, 促进胸腺 T 细胞增生及细胞毒性 T 细胞分化, 加强细胞免疫和体液免疫水平^[23, 24]。它不仅具有免疫调节和抗肿瘤作用, 而且具有显著的造血调控作用: (1)在造血中起调节作用, 与 IL-3 协同, 促进正常造血干细胞形成集落, 并可通过缩短 G0 期来保障造血干细胞的活跃增殖; (2)刺激 T 细胞、B 细胞、杂交瘤细胞和干细胞增殖; (3)促进 B 细胞 Ig 产生; (4)促进干细胞、巨噬细胞、CTL 和 NK 细胞分化^[25]; IL-6 能刺激小鼠骨髓、脾脏的粒细胞、巨核细胞的增殖、分化和成熟, 使外周的血小板和中性粒细胞上升。因而本研究认为冻存后脐血单个核细胞 IL-6 分泌量的增加, 不论对造血功能还是对免疫功能的加强都具有很好的作用。

4 韩颖等^[12]深低温保存对脐血单个核细胞产生 IL-2、SIL-2R 及 TNF- α 影响的研究, 20 份脐血 MNC 冻存前和冻后 7 天、28 天和 56 天培养上清中 IL-2 的含量高于新鲜标本, 保存时间的长短对这些细胞因子含量变化影响不大, 认为可能是深低温冷冻改变了脐血淋巴细胞的活性所至。本研究也发现经过冻存后 IL-2 分泌量较冻前两组对照明显增加。IL-2 是一种作用较广泛的细胞因子, 其不仅能在干、祖细胞水平有效刺激粒-单系造血前体细胞的增殖、分化和成熟, 还能增强外



周血成熟粒细胞、单核及巨噬细胞的功能,是机体复杂的免疫系统网络中起调节作用重要的细胞因子之一^[26]。IL-2 在体外能刺激 LAK 细胞的产生,还能诱导 NK 细胞前体细胞生长、分化和成熟,增加患者的抗肿瘤和抗感染能力^[27-29]。IL-2 又是 Th1 效应细胞所产生的主要的细胞因子之一,而 Th1 细胞效应主要是激活巨噬细胞、诱导细胞毒性 T 淋巴细胞活化和杀伤胞内寄生菌,引起细胞免疫应答^[30]。因而本研究认为,低温造成了 IL-2 的升高,说明经过低温冷后,脐血免疫活性细胞的免疫反应性有所提高,细胞介导的免疫应答增强,有利于脐血移植后抗感染、抗复发的能力。

5 INF- γ 具有抗病毒的作用;通过抑制癌基因的表达等多方面抑制肿瘤细胞的生长和诱导多方面抗肿瘤的免疫应答;它能显著增加抗原递呈细胞表达 MHC-II 类抗原,增强抗原递呈细胞与 T 细胞的相互作用,进而增强 T 细胞辅助抗体产生和辅助细胞毒 T 细胞产生的能力;INF- γ 具有巨噬细胞因子的作用,能够引发巨噬细胞的杀肿瘤效应及销毁细胞内的微生物;能够增强细胞毒 T 细胞和 NK 细胞杀伤靶细胞的能力和诱导细胞表达 IL-2 受体,从而促进 T 细胞增殖,进一步扩大免疫应答^[31]。此外它也是 TH1 细胞主要分泌的细胞因子之一^[30]。因而本研究分现 INF- γ 经过冻存后分泌量的增加,这同样增强了细胞的免疫应答能力,增强了抗感染、抗肿瘤的能力。

6 与新鲜标本对照组比较 GM-CSF 虽然有所下降,但可能是 DMSO 造成细胞活率的下降的原因,扣除该因素后,低温对脐血细胞 GM-CSF 的分泌没有影响,因为研究组与 DMSO 对照组比较结果没有差异。GM-CSF 具有维持造血前体细胞和成熟血细胞的存活的作用,这在维持造血与调节宿主的炎症反应中具有重要意义;它也能增强中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬功能,诱导表达粘附分子和产生免疫活性物质,促进杀菌作用;此外还能增强巨噬细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用,对粒细胞和巨噬细胞有直接的趋化作用^[31]。因而本研究认为,低温对 GM-CSF 分泌量影响不大,这对维持脐血造血及免疫反应能力具有重要意义。

深低温冻存后造成的 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的变化,本研究认为深低冻存脐血单个核细胞后改变了脐血免疫活性,增强了细胞介导的和抗体介导的免疫应答功能,而对维持造血功能的因素影响不大。脐血造血细胞经深低温保存后进行移植,对机体早期免疫功能的重建,增强机体抗感染、抗复发方面具有一定作用,但另一方面也可能加重 GVHD 反应。这两方面的影响在临床应用中的意义究竟有多大,还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Belsito DV, Baer RL, Gigli I, et al. Effect of combined topical glucocorticoids and ultraviolet birradiation on epidermal Langerhans cells[J]. J Invest Dermatol, 1984, 83(5): 347-351.
- 2 Flesch BK, Entenmann H, Milde K, et al. Islet transplantation in Experimental diabetes of the rat: Cryopreservation reduces MHC class II but not class I antigens of rat pancreatic islets[J]. Horm Metab Res. 1991, 23(1): 1-6.
- 3 Venkataraman M. Effects of cryopreservation on immune responses: freezing induced enhancement of IL-6 production in human peripheral blood mononuclear cells[J]. Cryobiology, 1994, 31(5): 468-477.
- 4 Andreoletti M, Pages JC, Mahieu D, et al. Preclinical studies for cell transplantation, isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction[J]. Hum Gene Ther. 1997, 8(3): 267-274.
- 5 马骢, 汪声恒. 超低温对淋巴细胞转化的影响[J]. 海军总医院学报, 1996, 9(1): 17-19.
- 6 马骢, 汪声恒, 赵全. 液氮中冻存淋巴细胞亚群分布的变化[J]. 实验血液学杂志, 1996, 4(2): 177-182.



- 7 马骢, 汪声恒, 官颖鹏.超低温对淋巴细胞超微结构的影响[J].中华血液学杂志, 1995, 16(10): 539-540.
- 8 雷从民.人骨髓细胞冷冻保存后产生白细胞介素-2 (IL-2)能力的变化[J].中华血液学杂志, 1988, 9(10): 596~598.
- 9 杨晶, 刘作斌, 汪月增.冷冻保存对骨髓单个核细胞 IL-1 和 IL-6 分泌的影响[J].实验血液学杂志, 1997, 5(3): 269-273.
- 10 Krampera M, Tavecchia L, Benedetti F, et al. Intracellular cytokine profile of cord blood T and NK cells and monocytes[J]. Haematologica, 2000, 85(9): 675.
- 11 Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults[J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 27(1): 1.
- 12 韩颖, 谭汉君, 刘作斌. 深低温保存对脐血单个核细胞产生 IL-2、SIL-2R 及 TNF- α 的影响[J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(4): 206-207.
- 13 韩颖, 谭汉君, 刘作斌等. 低温对人脐血淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 实验血液学杂志, 1995, 3(2): 210.
- 14 孙成文, 韩颖, 孔繁华. 低温冻存对人脐血淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(10): 541.
- 15 辜少玲 廖灿 刘斌等. 不同保存温度对脐血造血细胞的影响[J]. 临床血液学杂志, 2000, 13(2): 62-63.
- 16 吴燕锋 方建培 黄绍良等. 联合低温保护剂对脐血造血干细胞长期低温保存的作用[J]. 广东医学, 2001, 22 (8): 665-666.
- 17 刘开彦. -80℃低温冷冻保存外周血干细胞[J]. 新疆医学院学报, 1995, 18(2): 102-104.
- 18 Fujiwara S. Cryopreservation of human lymphocytes for assessment of lymphocyte subsets and natural killer cytotoxicity[J]. J Immunol Methods, 1986, 9: 265.
- 19 Tollerud DJ. Cryopreservation and long-term liquid nitrogen storage of peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry analysis effects on cell subsets proportions and fluorescence intensity[J]. J clin lab Anal, 1991, 5: 255.
- 20 Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults[J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 27(1): 1.
- 21 沈志坚, 谭映霞, 吴建波等. 比较脐血与成人外周血中 T 淋巴细胞亚群分布及其因子产生的差异[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(6).
- 22 邢同京, 章廉. 极化群体的基础与临床[M]. 军事医学科学出版社, 2002, 8.
- 23 Van Snick J. Interleukin-6: an overview[J]. Annu immunol, 1990, 8: 253.
- 24 Houssiau FA. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides[J]. Arthritis Rheum, 1988, 31: 784.
- 25 Rosnet O, Biffiring HJ, Marchetto S, et al. Human FLT3/flk2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells[J]. Leukemia, 1996, 10: 238~248.
- 26 Abdel-Wahab Z, Li WP, Osanto S, et al. Transduction of human melanoma cells with interleukin-2 gene reduce tumorigenicity and enhance host antitumor immunity: a nude mouse model[J]. Cellular Immunology, 1994, 159(1): 26-39.
- 27 Teichmann JV, Ludnig WD, Thiel E. Cytotoxicity of inter leukin-2-induced lymphokine-



- activated killer (LAK) cells against human leukemia and augmentation of killing by interferons and tumor necrosis factor[J]. Leuk Res, 1992, 16: 187.
- 28 Agah R, Malloy B, Kerner M, et al. Generation and characterization of IL-2 activated bone marrow cells as a potent graft vs leukemia effector in transplantation[J]. J Immunol, 1989, 143: 3093.
- 29 Meehan KR, Verma UN, Mazwinder A, et al. Interleukin-2-activated hematopoietic stem cell for breast cancer: investigation of dose level with clinical correlates[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20(8): 643-651.
- 30 Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more[J]. Immunol Today, 1991, 12, 256.
- 31 孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学[M]. 人民卫生出版社, 1999, 572-574.

二甲亚砜与第二信使效应剂对深低温 保存血小板超微结构的影响

孟凡会 孙青刚 刘竹珍 谭金山 刘金兰

青岛大学医学院附属医院 青岛 266003

摘要: 目的 观察体积分数 0.02 二甲亚砜 (DMSO) 联合第二信使效应剂 (ThromboSol) 对深低温保存浓缩血小板超微结构的影响。方法 分别应用 3 种不同的方法 (体积分数 0.02DMSO、体积分数 0.06DMSO、体积分数 0.02DMSO+ThromboSol) 在 -196℃ 冷冻保存浓缩血小板, 并在冻存后 1、6 个月时分别取出复温, 采用扫描和透射电镜观察血小板超微结构变化。结果 体积分数 0.02DMSO+ThromboSol 组血小板能保持完整结构, 部分血小板出现激活迹象, 冷冻保存 1 个月和 6 个月的血小板超微结构无明显差异。结论 体积分数 0.02DMSO+ThromboSol 能够有效地保护血小板超微结构, 其 6 个月内的保存效果稳定。

关键词: 血小板; 二甲亚砜; 低温保存; 第二信使效应剂; 超微结构

The effects on platelet ultrastructure after cryopreservation by low concentration dimethyl sulfoxide and second-messenger effectors

Meng Fanhui, Sun Qinggang, Wang tao, et al.

Medical School Hospital of Qingdao University, 266003

Abstract: Objective To observe the effect on platelet ultrastructure after cryopreservation using 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) plus ThromboSol, a mixture of second-messenger effectors. Methods Platelet concentrates were treated with 2% DMSO, 0.06% DMSO and 2% DMSO plus ThromboSol, then placed in liquid nitrogen. After frozen for 1 month and 6 months, samples were thawed and their ultrastructure was observed by SEM and TEM. Results The results of SEM and TEM showed that the platelets cryopreserved by 2% DMSO plus ThromboSol could retain good ultrastructure relatively and that a part of platelets was in active statue. There was no significantly differences between 1 month group and 6 month group. Conclusion 2% DMSO plus ThromboSol might protect effectively the platelet