

深低温冻存脐血复苏后输注临床移植相关护理的研究进展

黄璐 综述 吴云 宋瑰琦 审校

【摘要】 脐血造血干细胞移植是治疗血液系统恶性及非恶性疾病的一种有效方法,其作为一种安全、可靠和有效的移植方式已被广泛认可。脐血冻存在 -196°C 液氮中,移植时需要快速复温、及时回输给患者并确保安全。本文就脐血的复温、输注等相关技术和护理对策,综述如下。

【关键词】 冻存; 脐血移植; 护理

1988 年 Gluckman 等^[1]应用同胞人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)相合脐血造血干细胞移植治疗 1 例 Faconi 贫血患儿取得成功,开创了脐血移植临床应用的新纪元。至今,世界范围内运用非血缘脐血移植(unrelated cord blood transplantation, UCBT)治疗恶性和非恶性疾病已超过 2 万例^[2]。脐血以其独特的特点:来源丰富、采集方便;脐血受病毒感染率低;脐血的免疫源性较弱,可耐受 1~2/6 个 HLA 不合位点的移植,几乎所有患者都能找到至少 1 份 HLA 4/6 相合的脐血;移植后移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)发生率低且程度轻,而移植物抗白血病(graft-versus-leukemia, GVL)作用不下降等,脐血已成为造血干细胞的重要来源。但是单份脐血含造血干/祖细胞数量有限,较骨髓移植,植入率较低、造血重建延迟,以致移植相关并发症高^[2-6]。本文就冻存脐血回输技术及其相关的护理对策,综述如下。

1 脐血的采集

脐血采集是脐血研究和脐血库建立的基础,因此,如何采集并保证所采集脐血的质量至关重要。

1.1 采集对象^[7-8]

产妇方面:产妇年龄小于 35 岁、妊娠 36~42 周、发育和营养正常;无恶性肿瘤、无各种遗传性疾病及家族史、无乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋等传染病;妊娠期无严重合并症;分娩顺利。

胎儿方面:胎儿正常,体重超过 2 500 g,无畸形。

1.2 采集方法^[8]

1.2.1 脐静脉穿刺法 胎儿娩出后,剪断脐带,在产妇侧脐带的一端选择粗大而显露的脐静脉,75%乙醇消毒后,用采血袋采血。

1.2.2 自然滴流法 胎儿娩出后、胎盘娩出前,剪断脐带,利用子宫阵发性收缩让胎盘血自然流入无菌采血袋中。

1.3 采集时机

胎儿娩出后 5 min 内采集最佳。在此期间,脐带/胎盘的血流较为丰富,此时采集可增加采血量^[8]。

采集后 4°C 冰箱保存,18 h 内运输至脐血库^[9]。

2 脐血的冻存

脐血的冻存是保存造血干细胞活性的一种方法,但冻存及复温程序会减少细胞数、降低细胞活力。因此,低温保存效果的优劣直接影响着脐血造血细胞的数量和质量,是决定移植成功与否的重要因素之一^[9-10]。其冻存主要包括脐血冻存前后的质量检测,冻存温度、冻存保护剂的选择及冻存年限等问题。

2.1 脐血的检测^[11-13]

冻存前脐血需经病原微生物检测,其乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(hepatitis B virus surface antibody, HBsAb)、丙型肝炎抗体(hepatitis C virus antibody, HCV-Ab)、单纯疱疹病毒及巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)的 IgM 和 IgG 均呈阴性,培养无细菌和真菌生长。检测 HLA, ABO 血型,冻存前及复温后检测总有核细胞数(total nucleated cell, TNC)、 CD_{34}^{+} 细胞数、细胞成活率及造血祖细胞的增殖能力,以保证脐血干细胞的质量。

2.2 冻存温度

脐血采集后,应在 -196°C 的液氮中保存,才能保证细胞活力基本不变^[3]。但有研究表明,脐血经非程序控制降温后,直接放入 -80°C 冰箱的方法,与程序控

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2011.02.013

基金项目:安徽省卫生厅医学科研重点项目(2010A005)资助

作者单位:230001 安徽合肥,安徽医科大学护理学院,安徽医科大学附属省立医院血液科

通信作者:宋瑰琦,Email:songguiqi66@sina.com

制降温后转至 -196°C 液氮罐保存的方法,在6个月内具有相同的低温回收率,而且省时省力,降低成本,为脐血库大规模冷冻脐血创造了条件,因此,短期造血干细胞的冻存可以在 -80°C 低温冰箱内进行^[9,14]。

2.3 冻存保护剂的选择与浓度

在造血干细胞冷冻保存过程中,为了防止细胞内冰晶形成、渗透压改变、细胞结构紊乱等,导致细胞损伤,冷冻保护剂的使用是必要的^[15]。二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)具有渗透性,可渗入细胞内使水分大量溢出细胞,提高细胞内离子浓度,降低冰点、延缓冷冻过程,减少胞内冰晶形成从而减少细胞损伤。因此,DMSO已成为最常用的造血干细胞冷冻保护剂^[15]。单用DMSO有较好的保存效果但用量大,而且DMSO常温下对细胞有毒性作用,应尽可能减少其用量,另外大量使用DMSO成本较高^[16]。而羟乙基淀粉(hydroxyethylstarch, HES)、右旋糖酐(Dextran)等能够减少结晶物产生,利于解冻,为此有学者使用DMSO联合HES, Dextran等非渗透性试剂冻存造血干细胞,取得了良好的效果,证明合用两类保护剂是可行的,而且效果等同于甚至优于单用DMSO。联合使用低温保护剂简单易行、省时省力,适合脐血库大批量冻存脐血^[9-10,15-18]。

终浓度为10%的DMSO是保存造血干细胞的标准浓度^[19-20],但DMSO随着造血干细胞输入体内引起严重不良反应^[21-22],如恶心、呕吐、过敏反应、剧烈头痛、血压急剧升高、心率缓慢、呼吸极度困难或发生急性肾衰,甚至意识丧失全身抽搐等,引起了广大学者的注意。为此,很多学者尝试使用终浓度为5%的DMSO进行冷冻,并获得了较好的效果,与终浓度为10%的DMSO比较,造血干细胞的生物学特性没有差异^[10,23-24]。

因此,低浓度的DMSO联合非渗透性试剂保存造血干细胞在临床上值得推广。

2.4 冻存的年限

Broxmeyer等^[25]的研究显示,脐血经冷冻保存的年限为10年,与保存数周的造血干细胞培养集落数无明显差异。五年之后,Broxmeyer等^[20]的研究表明,脐血冻存后可保存15年之久,而且仍有90%可保持其生物学特性。

3 脐血的复温

由于常温下DMSO的毒性作用,复温均采用快速复温法。冻存的脐血取出后快速放入 37°C 盛有无菌盐水或水的恒温水浴箱中进行复温,用手揉搓加速解冻,一般在2~3 min解冻完毕,以免重结晶对细胞的

损坏^[26-27]。在国内,复温的温度采用的标准不一致, $37\sim 42^{\circ}\text{C}$ 不等;水浴或盐水浴复温;解冻时间在2 min内完成,与国外文献相似^[17,28-29]。另外,复温后需要从脐血袋中抽取0.3 mL脐血检测其TNC及活率等,另外抽取0.2 mL,检测祖细胞集落的产率^[27]。

4 脐血的输注

4.1 脐血输注的适应证

所有适合UCBT的病人,如各种类型的白血病、恶性淋巴系统肿瘤、非恶性疾病(如重症免疫缺陷症、地中海贫血、重型再生障碍性贫血和先天性代谢性疾病等)^[2,30]。

4.2 输注时间

常温下DMSO有细胞毒性作用,脐血经快速复温后,应尽快输入患者体内,但快速输注脐血后可能出现血压升高、头痛、心动过速、心率减慢、室性早搏、II度、III度房室传导阻滞等不良反应^[21]。文献报道的输注的时间长短不一:孙自敏等^[28]研究表明,输注时间为3~5 min;而马秀峰等^[31]认为在5~10 min内输注完毕,较为安全;也有文献报道,输注时间控制在15 min内较宜^[32]。

4.3 输注方式的选择^[32-34]

输注方式有静脉滴注、静脉推注及骨髓腔内注射。传统的造血干细胞输注途径为外周静脉输注,但经此途径输注后,绝大部分造血干细胞滞留于肺部,而仅有少量造血干细胞能到达并定居于骨髓腔,完成进一步增殖、分化和造血重建。因此,经外周静脉输注,明显影响了脐血植入效率。目前,已有大量动物实验证明了骨髓腔内注射脐血可有效地提高植入率,降低GVHD的发生率,临床应用发现患者无明显的全身不良反应,但有可能增加病人的局部疼痛及感染的机会。该方法的临床应用价值还值得进一步的探讨。

5 脐血输注的不良反应及护理

5.1 脐血输注的不良反应

不良反应的原因是多方面的:脐血是血制品,是异源性蛋白,易导致溶血反应等,特别是ABO血型不合的脐血移植^[35]。有学者认为,DMSO是输注时产生不良反应的主要原因,应用DMSO做冻存剂的细胞输注时可能发生的不良反应有,呼吸有大蒜味,恶心、呕吐、头痛、呼吸困难、胸部紧缩感及腹部不适,甚至出现心动过缓、血压升高、血生化改变等^[20-21]。经静脉快速输注冻存脐血的不良反应,主要以严重的全身反应为主,如溶血、过敏反应、剧烈头痛、血压急剧升高、心率缓慢、呼吸极度困难或发生急性肾衰,甚至意识丧失全身

抽搐等,病情变化快且复杂,且不良反应的发生率及严重程度与脐血输注速度成正相关关系^[32]。既能最大限度的降低副作用,又能保证造血干细胞的活性的最佳输注速度,仍需深入研究。

5.2 脐血输注前的护理

向患者及家属介绍输注的过程,每个环节的注意事项,可能出现的不适和对症处理措施,以消除他们的紧张情绪,同时备齐抢救药品和器械,确保输注过程中静脉通道通畅。输注非血缘的脐血有可能出现过敏反应,输注前给予地塞米松 5~10 mg 静脉注射。暂停可能与输血有反应的其他药物的使用^[32]。

5.3 脐血输注时的护理

输注过程中,医护人员专人全程监护,嘱患者张口呼吸、放松心情,密切观察患者的反应及生命体征的变化,包括神志、面色、体温、脉搏、呼吸、血压、尿量、尿色、尿 pH 值等变化,给予心电监护和氧气吸入^[32]。若患者出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道不适时,症状轻者无需特殊处理,反应重者,遵医嘱给予解痉止吐处理。若患者出现呼吸困难、胸闷、胸痛、头痛、头晕等不适,并出现血压升高、心率减慢,给予加大吸氧流量,适当减慢输注速度,遵医嘱降压、脱水,及强迫利尿等,并严密监测血压。病人烦躁不安时,应注意安全防护。脐血输注后,患者会出现短暂性血红蛋白尿,这是由于输注物中含有较多的破碎红细胞及其他死亡细胞所致^[36],给予充分的碱化水及利尿处理,在输注后 2~4 次小便色会逐渐变清。

6 展望

随着 UCBT 技术的改进和疗效的提高,UCBT 的适应证不断扩大。目前,在欧美国家和日本 UCBT 已作为无非血缘 HLA 相合骨髓供者的选择。在我国,由于缺乏同胞供者且非血缘造血干细胞捐献者资料库志愿者有限,造血干细胞供者明显不足,因此,UCBT 将有广阔的临床应用前景。但在深低温冻存脐血输注技术上如何选择最佳输注时间、输注速度以保证有限数量的脐血发生最小毒性作用和保持最大存活率是今后需要进一步探讨的课题。

7 参考文献

- [1] Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 1989,321(17):1174-1178.
- [2] Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica*, 2009,94(4): 4451-4454.
- [3] 洁莹,黄以宁,廖灿.美国血液与骨髓移植学会(ASBMT)有关自体脐血的采集和保存的论点. *中国实验血液学杂志*, 2008,16(4):984-988.
- [4] Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 2000,28(11):1197-1205.
- [5] 徐世侠,汤先华,唐湘凤.非血缘脐血及骨髓移植治疗儿童血液病的 meta 分析. *临床儿科杂志*, 2008,26(3):246-249.
- [6] Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol*, 2002,14(2):160-164.
- [7] 许遵鹏,廖灿,陈劲松,等.标准化脐血筛选方法在脐血库中的应用. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2006,11(1):1-6.
- [8] 罗伟琼,陈惠珍,黄春柳,等.脐血采集方法、影响因素分析及注意事项. *临床和实验医学杂志*, 2007,6(1):63-64.
- [9] 刘开彦,董文川,王逸兰,等.二甲基亚砷联合羟乙基淀粉的非程控降温法冻存脐血造血干细胞研究. *中国实验血液学杂志*, 2004,12(5):670-673.
- [10] Hayakawa J, Joyal EG, Gildner JF, et al. 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO. *Transfusion*, 2010,50(10): 2158-2166.
- [11] 刘颖,周淑芸,黄国栋,等.广东省胎盘脐带血库的质检分析. *中国输血杂志*, 2004,17(6):430-433.
- [12] 唐湘凤,栾佐,徐世侠,等.非血缘相关脐血移植治疗儿童高危白血病的临床观察. *中国当代儿科杂志*, 2008,10(1):5-8.
- [13] 李杰平,曾东风,孔佩艳,等.同胞间脐血移植成功治疗儿童难治性急性髓系白血病. *重庆医学*, 2008,37(15):1690-1691.
- [14] 徐群,武正炎.造血干细胞采集、分离与冻存的研究. *南京医科大学学报*, 2001,21(3):255-257.
- [15] 李罡灿,宋艳萍,杜明珠,等.不同冻存条件对造血干细胞保存效果的影响. *第四军医大学学报*, 2006,27(15):1438-1440.
- [16] 刘斌,廖灿,辜少玲,等.采用二甲基亚砷和右旋糖酐冻存脐血造血细胞的研究. *中华儿科杂志*, 2000,38(10):635-636.
- [17] 许遵鹏,廖灿,刘斌,等.二甲基亚砷和右旋糖酐应用于脐血造血细胞的低温保存. *中国小儿血液*, 2000,5(2):61-64.
- [18] Zhang XB, Li K, Yau KH, et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. *Transfusion*, 2003,43(2):265-272.
- [19] Campos L, Roubi N, Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. *Cryobiology*, 1995,32(6):511-515.
- [20] Broxmeyer HE, Srouf EF, Hangoc G, et al. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100(2):645-650.
- [21] Horacek JM, Jebavy L, Jakl M, et al. Cardiovascular changes associated with infusion of hematopoietic cell grafts in oncohematological patients-impact of cryopreservation with dimethylsulfoxide. *Exp Oncol*, 2009,31(2):121-122.
- [22] Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res*, 1998,18(6B):4705-4708.

[23] Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 1996,18(4):725-31.

[24] Abrahamsen JF, Rusten L, Bakken AM, et al. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion*, 2004,44(5):785-789.

[25] Broxmeyer HE, Cooper S. High-efficiency recovery of immature hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp Immunol*, 1997,107(Suppl 1):45-53.

[26] Thyagarajan B, Berger M, Sumstad D, et al. Loss of integrity of umbilical cord blood unit freezing bags: description and consequences. *Transfusion*, 2008,48(6):1138-1142.

[27] Flores AI, McKenna DH, Montalbán MA, et al. Consistency of the initial cell acquisition procedure is critical to the standardization of CD34⁺ cell enumeration by flow cytometry: results of a pairwise analysis of umbilical cord blood units and cryopreserved aliquots. *Transfusion*, 2009,49(4):636-647.

[28] 孙自敏,方欣臣,刘会兰,等.非血缘脐血造血干细胞移植治疗恶性血液病 50 例临床观察. *中华器官移植杂志*,2010,31(2):84-88.

[29] 韩俊领,赵英新,武文杰,等.脐带造血干细胞的分离和冷冻保存研究. *生物医学工程与临床*,2005,9(5):301-304.

[30] 吴海江,朱德琳,韩忠朝.脐带血移植的应用进展及脐带血库建设. *生命科学*,2007,19(2):169-173.

[31] 马秀峰,王贵菊.脐血输注的护理. *实用护理杂志*,1997,13(7):386-387.

[32] 吴云,谯川南,程洁慧,等.深低温冻存脐血的回输及护理. *中国实用护理杂志*,2010,(9B):15-18.

[33] 先文静,金慧玉,韩文杰.脐血造血干细胞回输方法探讨. *中国实用护理杂志*,2007,23(8B):77.

[34] 蔡耘,黄绍良.骨髓腔内注射造血干细胞移植的研究和应用进展. *中国实验血液学杂志*,2006,14(1):179-182.

[35] 徐世侠,栾佐,吴南海,等.儿童脐血移植后血型及血型抗体的转变. *临床儿科杂志*,2005,23(2):92-94.

[36] 韩忠朝,韩明哲,主编.造血干细胞理论与移植技术.郑州:河南科学技术出版社,2000:78-96.

(收稿日期:2011-02-25)

(本文编辑:徐伟娟)

· 消息 ·

欢迎参加全国医学论文写作研修班

为提高广大作者的医学论文特别是英文医学论文的写作水平,中华医学会中华医学杂志英文版定于 2011 年 6 月在广州、7 月在银川分别举办两期“全国医学论文写作研修班”。研修班邀请国内有丰富审稿、投稿和英文写作经验的专家进行授课:

- 如何撰写易被杂志接受的中(英)文医学论文
- 如何报告临床随机对照试验
- 论文写作中的伦理学问题
- 医学研究和论文写作中的统计学问题
- 向国内外英文医学期刊投稿的注意事项
- 国际一流医学期刊的稿件处理程序
- 临床试验注册
- 临床工作中的科研选题
- 中华医学杂志英文版网上稿件处理系统简介

培训班授予国家级继续教育 I 类学分 8 分。有意参加此研修班的同志,请与中华医学杂志英文版编辑部孙静编辑联系,地址:北京市东城区东四西大街 42 号,邮编 100710。电话:010-85158320。传真:010-85158333。Email:sunj@ema.org.cn。详情请及时浏览中华医学杂志英文版网站 www.cmj.org。

中华医学杂志英文版编辑部

2011 年 3 月