

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0285-04

4 500 份脐带血造血干细胞保存研究

韩俊领^{1,2}, 李 茜^{1,2}, 杨丛林^{1,2}, 陆 敏^{1,2}, 韩忠朝^{1,2}, 邱录贵^{1,2} (1. 天津市脐带血造血干细胞库, 天津 300384; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院, 天津 300384)

[摘要] 目的: 制备和保存满足临床造血干细胞移植要求的脐带血造血干细胞。方法: 按标准操作规程(SOP)进行脐带血的采集、分离、冷冻保存和检测。结果: 在采集的 6 232 份脐带血中, 采集的净血量、TNC、CD34⁺ 细胞百分率和 CFU-C 产率均值分别为 90.7 ± 22.2 ml, $10.5 \pm 3.4 \times 10^8$, $0.24 \pm 0.15\%$, $78.9 \pm 44.14/10^5$ NC。已保存符合标准的脐带血 4 500 份; 分离后 TNC 回收率超过 80%, 而 CD34⁺ 细胞、CFU-C 回收率则超过 90%, 细胞活率无明显改变; 冻存融化后细胞回收率 80% ~ 110%, 细胞活率 > 90%。在接受 569 例无血缘关系患者查询中, 93% 患者可查找到 ≥ 4 个 HLA-A, B 和 DRB1 位点相合的脐带血。结论: 可为临床造血干细胞移植提供合格的脐带血造血干细胞。

[关键词] 造血干细胞; 脐带血; 造血干细胞移植; 标准操作规程

[中图分类号] R73-33; R318.12

[文献标识码] A

Studies of 4 500 Umbilical Cord Blood Units Banking

HAN Jun-ling^{1,2}, LI Qian^{1,2}, YANG Cong-lin^{1,2}, LU Min^{1,2}, HAN Zhong-chao^{1,2}, QIU Lu-gui^{1,2} (1. Tianjin Cord Blood Bank, 2. Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin, 300384, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and cryopreserve umbilical cord blood (UCB) units for clinical hematopoietic stem cell transplantation. **Methods:** HSC of UCB units that met our standards were collected, separated cryopreserved and tested. **Results:** 4 500 (72.2%) of 6 232 cord blood units were suitable for preservation. Average net volume, numbers of total nucleated cells, percentage of CD34⁺ cells and CFU-C of the UCB units were 90.7 ± 22.2 ml, $10.5 \pm 3.4 \times 10^8$, $0.24 \pm 0.15\%$, $78.9 \pm 44.14/10^5$ NC, respectively. After separation, the cell recovery of nucleated cells, CD34⁺ cells and CFU-C were $82.1 \pm 6.52\%$, $92.5 \pm 6.15\%$ and $90 \pm 9.67\%$, respectively. The cell viability after separating was over 95%. After thawing, the recovery of nucleated cells, CD34⁺ cells and CFU-C were $84.2 \pm 10.1\%$, $96.5 \pm 21.8\%$ and $115.1 \pm 23.3\%$, respectively. The cell viability was $93.8 \pm 4.4\%$. Among the 569 searching cases, 532 (93%) cases could found 4/6 of HLA-A, B and DR loci matched UCB units in our bank, including 39 (6.58%) found 6 loci matched and 237 (41.65%) found 5 loci matched. **Conclusion:** These results indicated that we can supply high quality cord blood HSC for clinical transplantation.

[Key words] hematopoietic stem cells; umbilical cord blood; hematopoietic stem cell transplantation; standard operation procedures (SOP)

十余年的临床移植实践证明脐带血是重要的造血干细胞来源^[1,2], 对于已进入独生子女占优势的我国, 建立脐带血造血干细胞库是解决广大患者所面临的造血干细胞供者危机的可行途径。我们按照卫生部颁布的《脐带血造血干细胞库基本标准》和《脐带血造血干细胞库技术规范》, 参照国际脐带血组织 (NETCord) 制定的国际脐带血库标准和规范, 采集、处理脐带血^[3]。自 2001 年 2 月至 2004 年 7 月, 天津市脐带血造血干细胞库共保存公众捐献合格脐带血 4 500 份。

1 材料与方法

1.1 脐带血的采集

[基金项目] 美国纽约中华医学基金 (CMB) (1-748); 天津市社会发展计划重大项目 (003119811)

[作者简介] 韩俊领 (1962-), 男, 天津市人, 副主任技师, 主要从事实验血液学研究工作。

[通讯作者] 邱录贵, E-mail: drqiu99@medmail.com.cn

脐带血采集的对象为经筛选合格且自愿捐献的足月正常分娩者。在胎盘娩出前或胎盘娩出后(剖腹产)清洁状态下迅速进行采集。

1.2 脐带血造血细胞的富集和冷冻保存

按 Rubinstein 等方法^[4], 依照本脐血库已验证的冷冻程序将储存盒放入程控速率冷冻箱(Forma Scientific, Cryomed Model 1011)中降温, 待温度降至 -80°C 时, 将储存盒转移置于 -196°C 的液氮中保存。

1.3 脐带血样本的实验检测

1.3.1 脐带血和母体血标本的病原微生物的检测

用常规方法检测脐带血和母体血标本 HBsAg, HBcAb, HCVAb, HIV-1/IIAb, HTLVAb, CMV-IgM Ab 和梅毒螺旋体等病原微生物。需氧菌和厌氧菌检测采用美国 Organon Teknika 公司血培养瓶和血培养箱(阿克苏公司 BacT/Alert240) 37°C , 培养 7 d。

1.3.2 造血干/祖细胞含量检测

用低渗 NH_4Cl 溶液溶解 RBC, 洗涤后收集 NC。用 ProCount 试剂盒或 ISHAGE 双标法标记、流式细胞仪(FACSCalibur™ Becton Dickinson Immunocytometry Systems)和相应的软件测出脐带血中的 $\text{CD}34^{+}$ 细胞的百分率, 并计算出每份脐带血 $\text{CD}34^{+}$ 细胞绝对数。用 Methocult™ GF H4434 培养基(Stem Cell Technologies, Canada)测定每份脐带血中 CFU-GM, BFU-E 和 CFU-GEMM 产率和造血祖细胞集落总数。

1.3.3 脐带血的 HLA 分型

先用 PCR-序列特异性寡核苷酸探针反向杂交(SSOP, Dynal 公司 RELI™ SSO-HLA-A, B, DR)和/或 PCR-序列特异性引物(SSP, Biotest 或 one-λ 公司)方法进行 HLA-A, B, DR 位点中低分辨分型, 作为初筛。实验方法按试剂盒说明进行。患者找到相合脐带血后, 取冻存脐带血标本与患者的血标本同时用 SSP 法做 HLA-A, B 位点中低分辨分型, DR 位点高分辨分型。

1.4 无关供者脐带血查询和移植

脐血库接受来自移植中心或患者的查询后, 通过数据库系统查询与患者 HLA 4 个或 4 个以上位点相合脐带血。对移植医院所选的脐带血与患者血样同时进行 HLA 配型(A, B 抗原中低分辨, DRB1 抗原高分辨), 并对脐带血有关指标进行复查和审核, 得到移植中心确认申请后, 发放该脐带血。

1.5 统计学分析

结果用平均数(标准差及百分率表示, 采用 SSPS 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 采集脐带血的基本情况

2001 年 2 月到 2004 年 7 月底, 本脐带血库共采集自愿捐献脐带血 6 232 份, 因不符合接收标准、有核细胞总数不足及微生物检测阳性等原因废弃 1 732 份, 质量合格而保存的脐带血 4 500 份, 采集脐带血的合格率为 72.2%。接收的脐带血的净血量、有核细胞总数(TNC)、红细胞总数和血红蛋白浓度见表(1)。采集的净脐带血量与有核细胞总数间呈正相关。

表 1 采集脐带血的基本情况

Tab. 1 Characteristics of the collected umbilical cord blood

	Mean $\pm$ SD or cases	Range or percentage
Collected cases	6 232	
Stored cases	4 500	72.2%
Volume (ml)	90.7 $\pm$ 22.2	60 ~ 209
TNC $\times 10^8$	10.5 $\pm$ 3.4	4.3 ~ 31.8
TRBC $\times 10^{11}$	39.5 $\pm$ 9.95	9.9 ~ 95.0
Hb (g/l)	120.7 $\pm$ 14.14	75 ~ 242

2.2 脐带血造血细胞分离浓缩结果

脐带血经两步法分离浓缩前后的体积和造血细胞数的变化见表(2)。分离浓缩后脐带血的体积平均为 32 ml, 为分离前的 35.2%, 体积减少了近 2/3; 分离后 RBC, TNC, $\text{CD}34^{+}$ 细胞和 CFU-C 回收率分别为 44.3%, 82%, 92.5% 和 90%; 分离浓缩前后细胞活率无明显改变。

2.3 脐带血融化检测结果

为了评价脐带血冷冻保存的效果和质量, 选择了 36 份保存 3 ~ 18 个月细胞数偏低的脐带血进行了冻融实验, 结果见表(3)。融化后 TNC, $\text{CD}34^{+}$ 细胞和 CFU-C 回收率分别为 84.2%, 96.5% 和 115.1%, 有核细胞的存活率为 93.8%。

2.4 脐带血和母血样本的微生物免疫检测结果

在 4 918 例份样本检测中, 脐带血样本细菌、真菌培养阳性率(108 例)为 2.2%, 以厌氧菌污染为主, 占 84.2%。检测的母血样本 HBsAg, HBcAb, HCVAb, CMV-IgM 的阳性检出率分别为(66 例)1.34%、(185 例)3.76%、(18 例)0.37% 和(113 例)2.30%, 而脐带血分别为(1 例)0.02%、(149 例)3.03%、(15 例)0.31% 和(2 例)0.04%, 仅 1 份母血和相应的脐血 HTLV-Ab 阳性。未检测出梅毒螺旋体和 HIV-1/II Ab 阳性标本。

表 2 脐带血细胞分离前后造血细胞数比较($n=4\ 500$)

Tab. 2 Blood cell recovery rate after UBC separation

	Pre-separation	Post-separation	Recovery rate(%)
Volume (ml)	90.70 $\pm$ 22.2	32.0 $\pm$ 1.8 (41.4 $\pm$ 2.0)	35.2 $\pm$ 11.2
RBC($\times 10^{12}$)	3.95 $\pm$ 0.99	1.68 $\pm$ 0.29	44.3 $\pm$ 7.33
NC($\times 10^8$)	9.90 $\pm$ 3.6	8.11 $\pm$ 3.03	82.1 $\pm$ 6.52
CD34 ⁺ ($\times 10^6$)	2.18 $\pm$ 1.32	1.91 $\pm$ 1.56	92.5 $\pm$ 6.15 ($n=30$)
CFU-C($\times 10^6$)	1.20 $\pm$ 0.85	1.09 $\pm$ 0.90	90.0 $\pm$ 9.67 ($n=30$)
Viable NC (%)	98.30 $\pm$ 0.7	97.9 $\pm$ 0.8	

表 3 脐带血冻存效果检测($n=36$)

Tab. 3 Recovery rate of hematopoietic cell after thawed

Cell types	Pre-freezing	Post-thawed	Recovery rate(%)
TNC($\times 10^8$)	7.91 $\pm$ 3.14	6.16 $\pm$ 2.87	84.2 $\pm$ 10.1
CD34 ⁺ ($\times 10^6$)	2.18 $\pm$ 1.60	1.90 $\pm$ 1.86	96.5 $\pm$ 21.8
CFU-C($\times 10^6$)	1.06 $\pm$ 0.06	1.22 $\pm$ 0.18	115.1 $\pm$ 23.3
Viable NC (%)	97.7 $\pm$ 0.97	93.8 $\pm$ 4.4	

2.5 造血干/祖细胞检测结果

2.5.1 CD34⁺细胞计数

检测的 3 500 份脐血样本的 CD34⁺细胞阳性率为 0.24 $\pm$ 0.15%。其中以 ISHAGE 双标法方法测定的 1 700 份脐血标本的 CD34 阳性率为 0.18 $\pm$ 0.14%，而 ProCount 法测定的 1 800 份的 CD34 阳性率为 0.28 $\pm$ 0.16%。ProCount 检测的 CD34 阳性率明显高于 ISHAGE 双标法。

2.5.2 造血祖细胞集落

脐带血中的集落产率为 78.9 $\pm$ 44.14/ 1×10^5 有核细胞,其中 CFU-GM, BFU-E 和 CFU-GEMM 产率分别为 28.0 $\pm$ 17.13, 49.5 $\pm$ 30.84 和 1.5 $\pm$ 1.69。从集落的组成比例上看, CFU-GM 占 37%, BFU-E 占 61%。在该培养体系中 BFU-E 集落具生长优势。脐血标本的造血祖细胞集落产率与 CD34 阳性细胞率间呈正相关。

2.6 HLA 分型结果

已进行 HLA-A, B, 和 DRB1 中低分辨分型的脐带血 4 500 份。其中 3 500 份脐带血 HLA 主要抗原的分布频率如表 4 所示,与文献报告的汉族特别是北方汉族人群的 HLA 主要抗原的分布相一致,这与我们脐带血的绝大部分来源于天津地区的汉族产妇相符。

2.7 无血缘关系脐带血查询结果

自 2002 年 2 月至 2004 年 7 月底共接受来自全国各地移植中心医生或患者和 ASIACORD 的无关供者脐

带血查询 569 例次。在我们 4 500 份脐带血库容的情况下, 93% 以上的患者(全部为汉族)可以从中寻找 ≥ 4 个 HLA-A, B 和 DR 位点相合的无关供者脐带血, 其中 39 位患者检索到 6 个位点相合脐带血, 相合率为 6.85%; 5 个位点相合 237 例, 相合率为 41.65%; 4 个位点相合 256 例, 相合率为 44.99%。

表 4 3 500 份脐带血主要 HLA-A, B 和 DR 抗原分布频率

Tab. 4 Distribution HLA-A, B and DRB1 antigen frequencies in 3 500 UCBs

Specify	Frequency	Specify	Frequency	Specify	Frequency
A1	0.087	B07	0.0617	DRB1 * 01	0.0411
A2	0.5534	B13	0.2174	DRB1 * 03	0.1233
A3	0.0862	B15	0.2506	DRB1 * 04	0.1921
A11	0.2901	B27	0.0372	DRB1 * 07	0.2221
A24	0.2767	B35	0.0906	DRB1 * 08	0.1154
A26	0.0656	B38	0.0443	DRB1 * 09	0.2656
A30	0.1462	B40	0.2522	DRB1 * 10	0.0387
A31	0.0846	B44	0.1014	DRB1 * 11	0.1383
A32	0.0364	B46	0.1375	DRB1 * 12	0.2213
A33	0.1273	B48	0.0696	DRB1 * 13	0.1106
A68	0.0229	B51	0.1194	DRB1 * 14	0.0925
		B52	0.0506	DRB1 * 15	0.3036
		B58	0.0775	DRB1 * 16	0.0559

2.8 无关供者脐带血临床移植试验结果

2001 年 11 月至 2003 年 4 月为 8 例高危或晚期急性白血病患者发放 10 份脐带血进行临床移植。8 例患者的中位年龄 8 岁(4 ~ 32 岁), 中位体重 32 kg(20 ~ 52 kg)。晚期儿童 ALL 4 例, 高危儿童 AML 1 例, 儿童

CML 1 例, 儿童 SAA 1 例, 高危成人 AML 1 例。HLA 配型 6 位点相合 3 例, 5 位点相合 5 例。移植结果: 2 例不能评价, 其中 1 例于移植后 10 d 死于预处理相关性, 1 例于移植后 20 d 因严重感染而回输自体骨髓; 4 例(包括 1 例成人高危 AML 患者)完全造血功能重建(植活), 中位粒系植活时间 32 d(18 d~8 d), 血小板植活时间 48 d(36 d~90 d)。1 例儿童 SAA 患者经非清髓性预处理移植后 24 d 三系血象恢复正常, 植入检测提示供受者嵌合, 6 个月时复发, 检测提示为完全受者造血。1 例儿童晚期 ALL 患者移植 5 位点相合脐带血第 30 天无植入迹象, 31 d 时再回输 5 位点相合脐带血 2 份, 于 36 d 时死于严重感染。

3 讨论

脐带血是继骨髓和外周血后的另一重要的造血干细胞来源。目前国际上已完成了 6 000 余例脐带血造血干细胞移植。为向临床移植提供合格的脐带血, 我们制定了本脐带血库标准操作规程(SOP)和标准。现已保存合格的捐献脐带血 4 500 余份。通过对供者进行严格筛查, 母亲血和脐血标本病毒阳性检出率远低于我国自然人群的检出率^[5]。而且, 采用国际上通用的两步法富集和程控降温冷冻脐带血造血细胞的方法, 分离和融化后 CD34⁺ 细胞和造血祖细胞集落的回收率与分离同冷冻前相比无明显变化, 这些结果与国外文献报告相一致^[6-7]。

目前, NETCORD 建议脐带血库采用 HLA DNA 基因分型取代血清学分型。我们采用 SSOP 和/或 SSP 方法对 4 500 份脐带血 HLA 分型, 结果分析显示, 我们所保存脐带血的 HLA 抗原分布频率符合北方汉族人群 HLA 抗原分布的特点, 这与我们接受捐献的脐带血来源绝大部分为天津地区汉族人群相一致。此外, 我们曾根据 HLA 抗原的分布频率, 推算出了汉族(特别是北方汉族)人群无关供体 HLA-A、B 和 DR 位点相合概率^[8]。当脐带血库保存的脐带血标本在 5 000 份左右时, 汉族患者找到 ≥ 5 个 HLA 位点相合的脐带血的机率是 31%。我们的查询结果较乐观, 在库存脐带血 4 500 份时, 约 93% 的患者可以寻找到 ≥ 4 个 HLA-A、B 和 DR 位点相合的无关供者脐带血, ≥ 5 个位点近 50%, 明显高于欧美国家的相关报道, 而且高于我们推算的近 20 个百分点。因此, 我们认为一个库脐带血的库存量在 5 000 份左右较为适宜。

临床移植是检验脐带血质量最直接和最重要的证

据。我们总结了为 8 例患者提供了 10 份 5 个或 6 个位点相合的脐带血进行移植的结果, 这 8 例患者 1 例为晚期(病史 3 年半, 接受过规范免疫抑制治疗)SAA, 其余 7 例为晚期或高危急性 AL, 4 例体重超过 35 kg(其中 1 例成人)。移植结果: 2 例患者不能进行植活评价, 在可评价的 6 例中, 完全植活 4 例, 部分嵌合 1 例, 排斥 1 例。这与文献报告的晚期或高危急性 AL 脐带血移植的结果相似。我们的初步结果也提示, CBT 的主要优势是: 短时间即可提供进行移植; GVHD 的发生风险及严重程度较低, 能容许较大程度的 HLA 不合, 使患者找到合适供者的机会显著增多。而其存在的主要问题为: 单份脐血所含造血干、祖细胞数目少, 且脐带血中淋巴细胞不成熟导致移植后造血重建延迟及移植失败, 移植相关死亡率高。

[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[J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(17): 1174-1178.
- [2] Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(6): 373-381.
- [3] Fraser JK, Cairo MS, Wanger EL, *et al.* Cord Blood transplantation study (COBLT): Cord blood bank standard operating procedures[J]. *J Hematother*, 1998, 7(6): 521-561.
- [4] Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(22): 10119-10122.
- [5] 陈汝光. 对无偿献血者进行 HBsAg 快速筛查的效果初评[J]. *中国输血杂志*, 1999, 1(12): 20-21
- [6] Regidor C, Posada M, Monteagudo D, *et al.* Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: Evaluation of cell separation and storage methods[J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(2): 380-385
- [7] Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, *et al.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(2): 645-650.
- [8] 仇红刚, 肖志坚, 杨丛林, 等. 中国汉族人群造血干细胞移植无关供体组织相容性抗原相合概率的研究[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(12): 917-918

[收稿日期] 2005-07-12

[修回日期] 2005-08-15

[本文编辑] 韩丹