

供者 HLA-A、B、DRB1基因和单倍型研究. 中国实验血液学杂志, 2007, 15 (2): 357-363.

- [4] 李维, 唐荣才, 余梅贵, 等. 江苏骨髓分库汉族造血干细胞捐献志愿者 HLA-A、B、DRB1基因多态性和单倍型研究. 中国输血杂志, 2007, 20 (4): 276-281.
- [5] 彭清深. 西北汉族兰州支系的形成及人文特征. 甘肃教育学院学报 (社会科学版), 2003, 19 (1): 53-57.
- [6] 邓少丽, 陈伟, 夏季, 等. 重庆地区汉族人群 HLA-A、B、DRB1、

DQB1等位基因多态性的研究. 重庆医学, 2009, 38 (14): 1712-1714.

- [7] 王振雷, 何路军, 刘艳平, 等. 36 380名河北汉族 HLA供者基因多态性及其分布特征. 中国输血杂志, 2008, 21 (3): 169-172.
- (2009-12-31收稿, 2010-02-24修回)

本文编辑: 李弘武 尚云

• 实验研究 •

不同冻存保护剂对外周血单个核细胞的影响

王桂喜¹ 董磊² 李春红²

(1 铜陵市中心血站, 安徽 铜陵 244000; 2 安徽医科大学 过敏与免疫研究中心及免疫学教研室)

摘要:目的 观察不同冻存保护剂对外周血单个核细胞 (PBMC) 冻存后生物学特性的影响。方法 新鲜血液分离和液氮冻存后 1、7、30 d 用 MTT 法检测单个核细胞活性, 同时用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测冻存后其在脂多糖 (LPS) 和刀豆蛋白 (ConA) 刺激下分泌 γ 干扰素 ($\text{INF-}\gamma$), 比较 DMSO 10% + FBS 90%、DMSO 10% + Dextran-40 10% + FBS 80%、DMSO 10% + HES 6% + FBS 84%、FBS 不同冻存保护剂对 PBMC 的保护作用。结果 不同低温保护剂冻存对 PBMC 存活率的影响: 二甲亚砜 (DMSO) + 小牛血清 (FBS); DMSO + FBS + 右旋糖苷-40 (Dextran-40); DMSO + 羟已基淀粉 (HES) + FBS; FBS 分别为 65.3 ± 2.5 、 79.7 ± 1.5 、 71 ± 2.6 、 29.7 ± 0.58 ; 30 d 细胞增殖活性的影响 (OD 值) 分别为 0.21 ± 0.19 、 0.28 ± 0.15 、 0.23 ± 0.13 、 0.10 ± 0.17 。冻存的 PBMC 对 LPS 刺激产生 $\text{INF-}\gamma$ 的量不同, 而对 ConA 刺激产生 $\text{INF-}\gamma$ 量的变化不明显。结论 DMSO + FBS + Dextran-40 联合使用是一种较理想的外周血单个核细胞低温保护方法, 并对其生物学特性产生一定影响。

关键词: 外周血单个核细胞; 低温冻存; 冻存保护剂

中图分类号: R457.1⁺2 R331.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2010)05-0384-03

近年来对脐血干细胞、骨髓干细胞冷冻保存的研究颇多, 而对外周血单个核细胞 (PBMC) 冷冻保存的研究较少。对于细胞冻存研究的经典理论认为, 深低温 (-196°C) 能抑制细胞内酶的活性, 细胞代谢十分缓慢, 甚至停止, 从而避免细胞遗传性状的改变^[1]。但冷冻产生冰晶将造成细胞内损伤, 主要因素有冷冻速度、融解速度及冷冻保护剂种类。前两者受到工艺条件限制, 短期无法取得较大进展。因此, 冷冻保护剂的选择成了决定冷冻效果的最关键因素。我们通过冷冻技术对 PBMC 冷冻保存, 探讨不同冻存剂保护下外周血单个核细胞的存活率以及生物学特性 (分泌 $\text{INF-}\gamma$ 的量) 的变化, 从而评价 4 种冻存剂的不同组合对外周血单个核细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 1) 标本: 取自安徽铜陵市中心血站无偿献血者血液, 二甲亚砜 (DMSO, Sigma 公司), 羟已基淀粉 (HES Dupont 公司), 右旋糖酐-40 (Dextran-40, Baxter 公司), MTT 试剂盒 (Dupont 公司), $\text{INF-}\gamma$ 试剂盒 (上海森雄科技实业公司), RPM 11640 培养液 (GIBCO BRL 公司), 脂多糖 (LPS) (华美公司), Ficoll 分离液 (Cedarlane 公司), 水平离心机, 细

胞计数盘, anthos h² 酶标仪。2) 保护剂: 1 组: DMSO (10%) + FBS (90%), 2 组: DMSO (10%) + Dextran-40 (10%) + FBS (80%), 3 组: DMSO (10%) + HES (6%) + FBS (84%), 4 组: FBS。

1.2 PBMC 的分离 将新鲜采集的无偿献血者的血液 4°C 垂直离心, 把含有少量血浆和红细胞的白膜层 (buffy coat) 用压浆板挤入四联血袋的备用袋内, 然后把白膜层按 1:2 用 PBS 稀释后慢慢贴壁加入到 Ficoll 分离液中分离 PBMC。

1.3 PBMC 的计数 用 RPM 11640 培养液稀释分离的 PBMC, 通过计数调节浓度使其为 2×10^6 个 / ml。

1.4 PBMC 冻存 分别取 PBMC 悬液 1 ml 离心去除 RPM 11640 培养液, 分别加入 1 ml 冻存保护剂, 放入无菌冻存管中, 每组冻存 160 支, 然后将无菌冻存管快速放入 -80°C 冰柜中, 24 h 后转入液氮罐, 然后于 1、7、30 d 每种随机抽取 3 支进行台盼蓝试验和 MTT 试验, 随机抽取 2 支进行生物学功能研究。

1.5 冻存细胞试验 分别取含有 4 种冻存剂的上述冻存管 3 支, 放入 37°C 蒸馏水大烧杯中快速解冻, 洗涤后加入到 8 ml 含有 10% 小牛血清的 RPM 11640 培养液中, 置饱和湿度、5% CO_2 培养箱 37°C 培养 24 h 后, 离心去除 RPM 11640 培养

液,分别加入 5 ml含有 10%小牛血清 RPM I1640培养液,与未冻存的 PBMC同时做下述试验:1)台盼蓝试验:计数 200个细胞的拒染率。2)MTT试验^[2]:计算细胞存活率。3)INF- γ 的测定:把 PBMC悬液各取 3 ml放入细胞培养板中,置饱和湿度、5% CO₂培养箱 37℃培养 24 h后,在培养液中分别加入 LPS(终浓度为 0.625 μ g/ml)和 ConA(终浓度为 0.1 μ g/ml)^[3],同时设溶媒对照,再在饱和湿度、5% CO₂培养箱 37℃培养 48 h后,收集上清液,根据试剂盒说明书绘制标准曲线检测其 INF- γ 的含量。

1.6 统计方法 采用区间组差异性比较采用方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冻存剂对 PBMC存活率的影响 DMSO +Dextran-40 +FBS保护剂保存的 PBMC的存活率较高,在单独 FBS冻存的情况下 PBMC的存活较低。同一种保护剂在不同时间对 PBMC存活率的影响无统计学意义,见表 1。

2.2 4种冻存剂对 PBMC增殖活性的影响 为了进一步证实不同低温保护剂对 PBMC存活的影响,我们做了 MTT试验。通过对 3个不同时间段比较无统计学意义。因此认为不同时间段对细胞存活率没有影响。结果发现 DMSO +Dextran-40 +FBS保护剂吸光值较高(表 2),该结果提示 DMSO +Dextran-40 +FBS保存的细胞活性较高,而以单独 FBS保存效果较差。

表 1 不同冻存保护剂在不同时间 对 PBMC存活的影响 (%)				
	DMSO +FBS	DMSO +Dextran-40 +FBS	DMSO +HES +FBS	FBS
1 d	65.2±1.4	81.3±3.2	73.6±1.8	30.2±0.9
7 d	68.1±2.1	80.2±1.9	70.2±3.2	29.6±1.2
30 d	62.7±2.0	77.7±2.7	69.5±1.7	29.4±0.8

注:不同保护剂比较 F=522.46, P<0.01

表 2 不同冻存保护剂对 PBMC在不同时间 对细胞增殖活性的影响 (OD值)				
	DMSO +FBS	DMSO +Dextran-40 FBS	DMSO +HES +FBS	FBS
1 d(n=3)	0.22±0.015	0.28±0.016	0.23±0.016	0.11±0.020
7 d(n=3)	0.23±0.013	0.27±0.021	0.24±0.011	0.10±0.019
30 d(n=3)	0.21±0.019	0.28±0.015	0.23±0.013	0.10±0.017

注:新鲜分离血液细胞增殖活性为 0.32±0.012,不同保护剂 F=329.3, P<0.01,不同时间比较 P>0.05

2.3 冻存保护剂对 PBMC功能的影响 LPS刺激后,新鲜和冻存的 PBMC分泌 INF- γ 的量都明增加,冻存的 PBMC分泌量(除保护剂 4)均超过新鲜分离的 PBMC。PBMC对 0.1 μ g/ml ConA 刺激反应不明显,虽然新鲜和冻存 PBMC分泌 INF- γ 的量都增加,但增量都不及 LPS刺激增量。同样,不同冻存时间对 ConA 的刺激效果也不明显,对 2组(DMSO +Dextran-40 +FBS)保护剂冻存的细胞,ConA 刺激的 INF- γ 量明显高于其它组。结果见表 3。

表 3 新鲜血液及 4组保护剂下 PBMC在不同刺激剂作用后分泌 INF- γ 的结果 ($\bar{x}\pm s$ pg/ml)									
	未刺激			LPS			ConA		
	1 d	7 d	30 d	1 d	7 d	30 d	1 d	7 d	30 d
1组 (n=15)	0.37±0.05	0.34±0.04	0.39±0.05	121±17	128±13	124±16	7.0±0.8	6.4±0.8	7.3±1.0
2组 (n=15)	0.46±0.05	0.47±0.05	0.43±0.05	152±16	143±17	157±20	11.4±1.4	14.6±1.3	13.8±1.5
3组 (n=15)	0.36±0.04	0.36±0.05	0.38±0.05	121±16	133±14	131±14	7.1±0.9	8.0±1.0	7.6±1.0
4组 (n=15)	0.16±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02	41±6	55±7	50±7	3.6±0.5	3.8±0.6	4.0±0.5

注:新鲜分离血液细胞分泌 INF- γ 未刺激 0.6±0.050, LPS 84±10, ConA23±2.0,不同保护剂:未刺激 F=124.69, P<0.01, LPS F=178.37, P<0.01, ConA F=66.43, P<0.01

3 讨论

PBMC在人体中含量丰富,在人体生命活动中起着重要作用。目前它的长期保存为深低温冻存(-196℃),冻存剂以 DMSO为主,然后加 FBS或人血清(HAS)。本实验组采用在 DMSO的基础上加其它保护剂,通过对 4种冻存剂冻存后 PBMC生物学特性的比较,证实了 DMSO +Dextran-40 +FBS为 4种深低温冻存 PBMC中最佳保护剂,与陈汝光等^[4]报道的冻存脐血造血干细胞的条件一致。保存时间在 1个月内,细胞存活率可达 78%。Dextran-40为无色无味的白色粉末,小分子物质,易溶于水,微溶于酒精。在细胞冻存保护上 DMSO起主要作用,Dextran-40可能协助 DMSO渗透到有核细胞中,降低胞内冰晶对细胞的损害,具体机理不详,亦未见相关报道,有待进一步研究。

细胞冻存后对其生物学特性的影响,许多学者很早就进行了探讨。Kleeberger等^[5]对 PBMC进行 12年深低温冻存

研究后指出, PBMC冻存 12年后仍可进行细胞免疫表型分析和抗病毒研究,细胞活性不低于 90%。Sleaman等^[6]以 DMSO +FCS为冻存剂对 PBMC研究发现, PBMC长期冻存后仍能稳定表达不同抗原,细胞存活率>95%,可以进行传染病、移植、癌症和其它慢性病治疗。Weinberg等^[7]研究认为, PBMC功能与其存活率呈相关性,要求细胞活性>70%。Ausello等^[8]对 48个月大小的孩子的 PBMC进行百日咳抗原应答研究表明,新鲜和冰冻的 PBMC没有明显的区别。

Kleeberger等^[5]指出, PBMC总体是脆弱的,在冻存和溶解过程中的粗糙处理可破坏 PBMC的功能。其实细胞冻存后,由于表面超微结构的变化以及酶冻存溶解后构型可能发生一些变化,或者冷冻过程使某些对冷冻敏感的 T淋巴细胞(主要是抑制性 T淋巴细胞即 CD8⁺细胞)功能不可逆地丧失,而其它亚型的免疫活性细胞功能相对增强,产生大量的白细胞介素和细胞因子,因此对外来刺激因子的应答也可能发生微妙变化。本实验组仅对 LPS和 ConA进行试验,研

究发现:培养冻存后的 PBMC在 LPS刺激下比新鲜分离 PBMC同样条件下的产出 IFN- γ 高;但对于 ConA 刺激则不太明显,可能由于刺激浓度不足或本身 PBMC冻存后对 ConA 不敏感,有待与进一步探讨。Sleasman等^[6]对 3个健康人的 PBMC用 PHA作刺激剂研究认为,PHA对冻存 PBMC的增殖影响小。

总之,由于各个实验室条件、检测人员水平、处理方式以及检测 PBMC表面分子或因子不同,得出结果不尽一致。DMSO渗透到细胞内,对细胞的结构和酶的功能有一定的损伤,因此联合保护剂应为 PBMC有效冰冻保存的方向,减少单一成分的副作用。使 DMSO既能发挥其保护细胞的作用,又能降低其细胞毒性作用。徐振波等^[1]从南极鱼类研究发现的抗冻蛋白对细胞冻存研究开辟了新领域,在低温冻存中能非连续地降低液体冰点,这将成为冻存剂研究的热点。

参 考 文 献

[1] 徐振波,李彦媚.新型冷冻保护剂在细胞低温冻存中的选择.制冷,2004,23(4):19-24.
[2] 莉霞,侯青青.细胞活性测定方法研究进展.重庆工商大学学报(自然科学版),2006,23(6):564-567.

[3] 程晓霞,陈少莺.小鼠脾淋巴细胞转化试验最佳条件的测定.福建畜牧兽医,2003,25(4):7.
[4] 陈汝光,朱美玲.不同冻存剂对脐造血干细胞生物学特性的影响.中华血液学杂志,2000,21(8):412-417.
[5] Kleeberger CA, Lyles RH, Margolick JB, et al. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. Clin Diagn Lab Immunol 1999, 6(1): 14-19.
[6] Sleasman JW, Leon BHL, Aleixo LF, et al. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. Clin Diagn Lab Immunol 1997, 4(6): 653-658.
[7] Weinberg A, Zhang L, Brown D, et al. Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. Clin Diagn Lab Immunol 2000, 7(4): 714-716.
[8] Ausiello CM, Lande L. Cell mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines. Infect Immun 1999, 67(8): 4064-4071.

(2010-01-12收稿,04-03修回)

本文编辑:刘晓明

• 实验研究 •

深圳市 RhD 阴性血液临床供应新模式的应用与探讨

张艳艳 卢亮 莫冰 林创松 刘露 (深圳市血液中心,广东 深圳 518035)

摘要:目的 探讨深圳市 RhD 阴性血液供应新模式,即“RhD 阴性红细胞悬液动态库存法”的有效性和可行性。**方法** 将实施“RhD 阴性红细胞悬液动态库存法”前 1 年临床用量设定为对照组,实施后 1 年的临床用量设定为实验组,分别对 2 组数据进行统计分析。**结果** RhD 阴性血液的紧急用量与急诊采集量在 2 组之间的差异具统计学意义($\chi^2=96.59$, $P<0.01$),而总用量和非紧急用量之间的差异不具统计学意义($\chi^2=1.63$, $P>0.05$)。**结论** 2008 年后,深圳市 RhD 阴性血液临床用量比 2008 年前大幅度增长,“RhD 阴性红细胞悬液动态库存法”对于保证临床紧急用血需求是有效且可行的。

关键词: RhD 阴性血液;临床供血;新模式
中图分类号: R457.1 R193.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1004-549X(2010)05-0386-02

人类 Rh 血型是除 ABO 血型之外临床意义最大的 1 个血型系统,也是较复杂的血型系统之一,因其高免疫性,可导致溶血性输血反应而倍受重视^[1]。在我国汉族人群中,RhD 阴性的比例为 2‰-4‰,属于稀有血型。RhD 阴性患者在急救时常常遇到血源无法及时得到保障的困境,其血液供应一直是困扰临床输血界的难题。近年来,本市的 RhD 阴性血液用量呈逐年增加趋势,使得本中心 RhD 阴性血液储备和应急保障工作面临着巨大挑战。本市 RhD 阴性血液传统的供应模式是建立 RhD 阴性献血者信息资料库,同时对随机采集的 RhD 阴性血液库存备用与冰冻保存。在临床紧急用血而常规库存又不能满足需求时,则进行紧急采集招

募。但即便这样,从献血者的招募到血液采集,再到血液的安全检验或对冰冻红细胞进行解冻洗涤,最少需要 2-4 h,为保证在最短的时间内提供患者所需的 RhD 阴性血液,并且减少不必要的反复冻融操作、节约人力资源和试剂成本,本中心从 2008 年 7 月起,在传统模式的基础上,首次采用 RhD 阴性血液供血新模式——“RhD 阴性红细胞悬液动态库存法”来保障临床供给。新模式主要是对不同血型的 RhD 阴性血液分别设置最低、最佳、最高库存标准,并按此标准进行主动采集及动态库存管理。我们通过比较新模式启用前后的作用与效果来分析其有效性与可行性。现报道如下。