

脐带血造血干细胞的分离和冷冻保存研究

韩俊领, 赵英新, 武文杰, 伍盛举, 杨俊晔, 邱录贵

摘要: 目的 探讨为临床移植有效地分离和冷冻保存无关供者脐带血中的造血干细胞的方法。方法 将由普通或改进的两种不同采集袋采集的脐带血, 用两步离心法分离、浓缩脐带血中的有核细胞, 用 BioArchive System(生物档案系统)或常规的程控降温系统将之冷冻, 保存在 -196°C 液氮中。用流式细胞术和细胞培养法检测脐带血中的 $\text{CD}34^{+}$ 细胞和造血祖细胞含量。结果 脐带血用改进的采集袋分离后, 有核细胞和红细胞的回收率分别为 $86.4\% \pm 4.6\%$ 和 $44.2\% \pm 9.6\%$, 而普通采集袋的回收率为 $78.4\% \pm 7.9\%$ 和 $49.8\% \pm 11.7\%$; 将富含核细胞悬液的体积浓缩到 20 ml 时, 有核细胞和红细胞的回收率分别为 $74.62\% \pm 9.3\%$ 和 $34.9\% \pm 19.1\%$, 浓缩体积为 32 ml 回收率为 $86.4\% \pm 4.6\%$ 和 $45.1\% \pm 7.8\%$, 但两者的 $\text{CD}34^{+}$ 细胞和造血祖细胞的回收率无统计学意义; 冷冻脐带血融化后有核细胞、 $\text{CD}34^{+}$ 细胞和 CFU-C 回收率分别为 $84.2\% \pm 10.1\%$ 、 $96.0\% \pm 21.8\%$ 和 $115.1\% \pm 23.3\%$ 。苔盼蓝拒染率 $93.8\% \pm 4.4\%$ 。结论 改进的采集袋能够明显提高有核细胞回收率。采用两步离心法和两种冻存方法能够有效地富集和冻存脐带血中的造血干细胞。

关键词: 脐带血; 造血干细胞; 分离; 冷冻保存

中图分类号: R318.12

文献标识码: A

文章编号: 1009-7090(2005)05-0301-04

Separation and cryopreservation of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood units HAN Jun-ling, ZHAO Ying-xin, WU Wen-jie, WU Sheng-ju, YANG Jun-ye, QIU Lu-gui (Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences and Tianjin Cord Blood Hematopoietic Stem Cell Bank, Tianjin 300384, China)

Abstract: Objective To study the efficient approach of separation and cryopreservation of hematopoietic cells from cord blood units. **Methods** Umbilical cord blood (UCB) units were collected with two different collection bags. Nucleated cells (NC) in UCB were isolated and enriched with two step centrifugation and frozen with BioArchive System or routine programming controlled freezer, then stored in -196°C liquid nitrogen. The $\text{CD}34$ positive cells were measured with flow cytometry (FCM), and hematopoietic progenitor cells were assayed with cell culture. **Results** Isolation with advanced collection bags, the recovery rates of NC and red blood cells (RBC) in UCB were $86.4\% \pm 4.6\%$ and $44.2\% \pm 9.6\%$, respectively, and $78.4\% \pm 7.9\%$ and $49.8\% \pm 11.7\%$ respectively in isolation with common bags. When NCs were concentrated to 20 ml, the recovery rates of NC and RBC were $74.62\% \pm 9.3\%$ and $34.9\% \pm 19.1\%$, and $86.4\% \pm 4.6\%$ and $45.1\% \pm 7.8\%$ while concentrated to 32 ml. However, the recovery rates of $\text{CD}34^{+}$ cells and CFU-C had changed little. After thawed, the recovery rates of NC, $\text{CD}34^{+}$ cells, CFU-C and the NC viability were $84.2\% \pm 10.1\%$, $96.0\% \pm 21.8\%$, $115.1\% \pm 23.3\%$ and $93.8\% \pm 4.4\%$, respectively. **Conclusion** Recovery rate of nucleated cells can be obviously increased by using advanced collection bags. Moreover, hematopoietic cells in the UCB were effectively enriched by two step centrifugation and stored with two cryopreserved methods.

Key words: umbilical cord blood; hematopoietic cells; separation; cryopreservation

目前,在全球范围内已成功进行了数千例脐带血造血干细胞的移植,其效果令人鼓舞^[1]。进行无关供者脐带血干细胞移植的前提是需建立具有一定保存规模的脐带血库,并有效地分离和保存脐带血中的造血

细胞。若对采集的脐带血不进行分离而直接冻存,会明显增加存储空间和存储成本,而且融化后过多红细胞溶解产物和冷冻保护剂二甲基亚砜(DMSO)会在输注时对患者的健康造成损害。为了有效地富集和保存脐带血中的造血细胞,节约储存空间和成本,参照他人的经验^[2,3],建立了天津市脐带血造血干细胞库的脐带血分离和冷冻保存方法。

1 资料与方法

1.1 脐带血标本

作者单位: 中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所,天津市脐带血造血干细胞库,天津 300384

收稿日期: 2005-05-10; 修回日期: 2005-05-30

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

基金项目: 美国纽约中华医学基金(批号: 1-748); 天津市社会发展重点项目(批号: 003119811)

符合天津市脐带血库接收标准的脐带血 4 918 份。采集袋为二联采集袋或自行设计单袋,每只采集袋内含 28 ml CPDA 抗凝剂(山东威海威高集团)。

1.2 方法

脐带血的分离和浓缩:基本按 Rubinstein 等方法进行分离和浓缩^[2]。

1.2.1 取样

首先在洁净百级的条件下将脐带血混匀,无菌取样 3 ~ 4 ml 测试样品,用于 HLA、ABO 血型、干/祖细胞培养、细胞计数和 CD34⁺细胞等检测。

1.2.2 制备富含白细胞的血浆

根据采集的脐带血量(包含抗凝剂)向脐带血中按 5:1(含抗凝剂脐带血体积:HES 体积)加入质量浓度 6 % 羟乙基淀粉氯化钠注射液(HES, Braun Medical re-order code L6511, USA),充分混匀 10 min。然后 50 g,离心 7 min(Cytofuge 6000i, Heraeus)。收集富含白细胞血浆部分,并根据加入的 HES 量,再收集 17 ~ 30 g 红细胞。

1.2.3 去除过量的血浆

将富含白细胞血浆的转移袋垂直置入离心杯中。747g,离心 13 min。除去过量的上层血浆。常规程控降温系统保留 32 ml 左右的富含白细胞血浆,生物档案系统保留 20 ml 左右。

1.3 脐带血细胞的冷冻保存

向浓缩细胞中加入已预冷的含有二甲基亚砷(DMSO, Edwards Lifesciences, Research Inc. Irvine, CA USA)和右旋糖酐 40 (Dextran 40 B. Braun Medical Inc. Irvine, CA USA)的冷冻保护液,二者的终质量浓度分别为 10 %、1 %。

常规程控降温系统(Cryomed Model 1061, Forma Scientific, Inc)降温:将储存盒放入程控速率冷冻箱,启动冷冻程序,冷冻速率 4 °C 至 -40 °C, 1 °C/min ~ 2 °C/min; -40 °C 至 -80 °C, 10 °C/min; 当样品的温度下降至 -80 °C 后,立即将其从冷冻箱内取出,置于 -196 °C 液氮中(Cryo400, Forma Scientific, Inc)。

生物档案系统冷冻脐带血按其制造商提供的操作规程进行,生物档案系统自动进行样品的降温和液氮储存。

1.4 脐带血的融化

从脐带血储存容器中取出冷冻的脐带血,立即将冷冻盒放入 37 °C ~ 40 °C 水浴中。待冷冻脐带血完全融化后,无菌取样,做脐带血冷冻保存质量的检测。

1.5 脐带血分离和冷冻效果检测

分离前后和冷冻前后的脐带血进行有核细胞计

数、CD34⁺细胞检测、集落培养和苔盼蓝拒染等实验。

1.5.1 细胞计数

应用血液分析仪 KX-21 (Sysmex, Japan)计数有核细胞和红细胞。

1.5.2 脐带血 CD34⁺细胞

流式细胞术(FCM)检测脐带血的 CD34⁺细胞。用 ProCount 试剂盒或双标法标记 CD34⁺细胞,流式细胞仪(FACSCalibur™ Becton Dickinson Immunocytometry Systems)和相应的软件测得脐带血中的 CD34⁺细胞的百分率,并计算出每份脐带血 CD34⁺细胞总数。

1.5.3 集落形成试验

用 Methocult GF H4434 培养基(StemCell technologies, Canada),测定每份脐带血中集落总数。将适量的脐带血用低渗氯化铵(质量浓度 0.83 % NH₄Cl)溶解红细胞,洗涤 2 次。按终浓度 0.5 ~ 1 × 10⁵/ml 接种到 Methocult™ GF H4434 培养基中。在 37 °C、体积分数 5 % CO₂ 和全湿条件下,培养 14 ~ 16 d,倒置显微镜下计数 CFU-GM、CFU-GEMM 和 BFU-E 集落,求得每份脐带血中的祖细胞总数。

1.5.4 苔盼蓝拒染实验

加 360 μl PBS(磷酸盐)缓冲液、20 μl 血细胞悬液和 20 μl 体积分数 2 % 的苔盼蓝溶液于试管中。充分混合后,孵育 2 min。混匀后吸出 10 μl 于细胞计数盘,上覆盖玻片。待细胞沉降后,计数 100 个细胞,评价活细胞和死细胞的比例。

1.6 统计学分析

应用 *t* 检验进行组内均数比较,组间的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 脐带血分离结果

2.1.1 不同采集袋对脐带血回收率的影响

最先使用的采集袋为血库用于外周血采集的普通二联采血袋,由于采血袋的形状、大小和设计不利于脐带血造血细胞的分离和富集,为此自行设计了脐带血采集袋,并由专业厂家生产。试验结果见表 1。改进采集袋前后有核细胞和红细胞的回收率均有显著的统计学意义,改进后的采集袋有核细胞回收率为 86.4 %,明显高于($P < 0.01$)普通采血袋;而红细胞的去除率为 55.8 %,高于普通采血袋($P < 0.05$)。

2.1.2 脐带血的浓缩体积对有核细胞回收率的影响

生物档案系统的干细胞保存袋的容量为 25 ml,浓缩的脐带血体积限定为 20 ml。而用常规的程控降温系统和储存系统可选择不同规格的冷冻袋,选用的

表 1 改进后采集袋与普通采血袋细胞回收率的比较

采集袋	分离前		分离后			
	TNC × 10 ⁸	TRBC × 10 ¹⁰	TNC × 10 ⁸	NC 回收率/%	TRBC × 10 ¹⁰	RBC 回收率/%
采集袋 1(n = 264)	10.7 ± 3.8	39.1 ± 10.6	9.2 ± 3.3	86.4 ± 4.6	16.5 ± 2.6	44.2 ± 9.6
采集袋 2(n = 234)	10.2 ± 3.2	39.5 ± 9.9	7.9 ± 2.6	78.4 ± 7.9	18.7 ± 1.9	49.8 ± 11.7
				P < 0.01		P < 0.05

注:采集袋 1 为改进后的采集袋,采集袋 2 为普通采血袋。TNC:总有核细胞数;NC:有核细胞;TRBC:总红细胞数;RBC:红细胞

冷冻袋的体积为 50 ml,浓缩的脐带血体积限定为 32 ml。浓缩体积对回收率的影响见表 2。从结果可以看出,浓缩体积影响 RBC 和 NC 的回收率,而对 CD34⁺和 CFU-C 无明显影响。

表 2 浓缩体积对细胞回收率的影响 %

浓缩体积	体积/ml	RBC	NC	CD34 ⁺	CFU-C
20 ml (n = 300)	18.3 ± 2.4	34.9 ± 19.1	74.6 ± 9.3	84.0 ± 14.0	97.4 ± 41.8
32 ml (n = 500)	32.1 ± 1.7	45.1 ± 7.78	86.4 ± 4.6	83.8 ± 8.0	101.8 ± 45.3
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05	> 0.05

2.1.3 4 918 份脐带血的分离效果

见表 3。脐带血分离前的平均体积 90.7 ml,离心浓缩后的平均体积为 32.4 ml, 体积下降了 65 %,红细胞的数量减少了 55.7 %; 虽然有核细胞的回收率为 82.1 %, 与分离前相比有所下降, 但单个核细胞(MNC)、CD34⁺细胞和祖细胞回收率分别为 108.5 %、92.5 %和 90 %,均无统计学意义(P > 0.05)。有核细胞活力在分离前后分别为 98.3 %和 97.9 %,无明显改变。

表 3 脐带血细胞分离前后各种细胞数比较

项目	分离前	冻存前	回收率/%	P 值
体积/ml	90.7 ± 22.2	32.4 ± 1.0	35.3 ± 11.20(n = 4500)	<0.05
RBC(×10 ¹⁰)	39.5 ± 9.9	16.8 ± 2.9	44.3 ± 8.4(n = 4500)	<0.05
TNC(×10 ⁸)	9.90 ± 3.60	8.10 ± 3.03	82.10 ± 6.52(n = 4500)	<0.05
MNC(×10 ⁸)	4.1 ± 1.0	4.3 ± 1.5	108.5 ± 25.0(n = 29)	>0.05
CD34 ⁺ (×10 ⁶)	2.18 ± 1.32	1.91 ± 1.50	92.50 ± 6.15(n = 29)	>0.05
CFU-C(×10 ⁶)	1.20 ± 0.85	1.09 ± 0.90	90.00 ± 9.67(n = 29)	>0.05
细胞活率/%	98.3 ± 0.7	97.9 ± 0.8 (n = 4500)		>0.05

2.2 脐带血冷冻与融化结果

可采用为脐带血冷冻保存专门设计的生物档案系统,进行程控降温 and 储存,亦可采用常规的程控降温系统降温后,再放入-196 ℃的液氮中储存。实验采用了上述两种方法冷冻保存脐带血。在生物档案系统中,通过优化降温程序,可以克服样品在相变点的升温,降温速率保持均一。常规的程控降温系统通过控

制样品在相变点的升温高度和平台期持续的时间,也能获得良好的冻存效果。笔者对 36 例冷冻脐带血进行融化实验,结果见表 4。融化后的有核细胞回收率为 84.2 %,与冷冻前相比有所降低;CD34 阳性细胞和祖细胞回收率分别为 96 %和 115 %, 与冷冻前相比无明显降低。此外,两种冷冻方法的冷冻效果无统计学意义(结果未列出)。

表 4 脐带血冻存效果检测(n = 36)

项目	冷冻前	融化后	回收率/%	P 值
TNC(×10 ⁸)	7.91 ± 3.14	6.16 ± 2.87	84.2 ± 10.1	< 0.05
CD34 ⁺ (×10 ⁶)	2.18 ± 1.60	1.90 ± 1.86	96.0 ± 21.8	> 0.05
CFU-C(×10 ⁶)	1.06 ± 0.06	1.22 ± 0.18	115.1 ± 23.3	> 0.05
细胞活率/%	97.70 ± 0.97	93.80 ± 4.40		> 0.05

3 讨论

有效地分离和浓缩脐带血中的造血细胞,可更好地满足临床移植需要, 并降低脐带血储存空间和费用。对此,国外学者做了各种尝试^[4,5]。用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,能够去除脐带血中成熟的中性细胞,明显减少脐带血的保存体积,但因分离液具细胞毒性,收集的细胞经洗涤后才能保存,程序较为繁琐,容易造成造血干细胞的丢失和污染。而一步离心制备白膜,虽然操作简单,但有核细胞的回收率一般低于 70 %。实验采用国际上通用的,也是最经济的两步离心法能够有效地去除脐带血中红细胞和过量的血浆,浓缩后体积约为原来的 1/3。而浓缩脐带血中的造血干细胞含量无明显减少。

分离造血干细胞的回收率受诸多因素影响。实验分别对采集袋和浓缩体积是否影响造血干细胞回收率进行了分析。比较两种大小和形状不同采集袋的分离效果,表明二联采血袋较宽,不利于脐带血的分离和富集;而采用改进的单采集袋,不仅给操作带来更大的便利,而且能够有效地提高脐带血中的有核细胞回收率,从而降低分离过程中造血干细胞的丢失。另

外,实验结果表明 32 ml 浓缩体积的 RBC 和 NC 的回收率高于 20 ml,但 CD34⁺和 CFU-C 的回收率无明显差别。也就是说无论采用 BioArchive 系统冷冻袋,还是常规程控降温系统冷冻袋,造血干/祖细胞的回收率无明显差别。

程控降温是脐带血造血干细胞冷冻最常采用的方法。程控降温方法又可分为 BioArchive 系统和常规程控降温系统。在 BioArchive 系统中,经过对冷冻程序的反复摸索和验证,克服了样品在相变点升温,在 4℃~ -40℃的降温过程中,温度下降速率保持为 1℃~ 2℃/min,是较为理想的降温过程^[6]。笔者对 36 例冷冻脐带血进行融化实验。结果显示融化后有核细胞的回收率和活率有所降低,但造血干细胞的回收率,如 CD34 阳性细胞和祖细胞的回收率均无明显地下降,其冷冻效果与国外脐带血库的报道相似^[7]。虽然两种冷冻方法的降温曲线不尽相同,但冷冻保存效果无明显区别。

参考文献:

[1] Vormoor J, Klingebiel T, Jurgens H. Current state of cord blood transplantation in childhood [J]. Klin Padiatr, 2002, 214(4):

195-200.
[2] Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(22): 10119-10122.
[3] 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.
[4] Dal Cortivo L, Robert I, Mangin C, et al. Cord blood banking: volume reduction using "Procord" Terumo filter[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(6): 885-890.
[5] M-Reboredo N, Diaz A, Castro A, et al. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(12): 1263-1270.
[6] Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood[J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 18(4): 725-731.
[7] 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(2): 645-650.
