

· 研究报告 ·

脐血造血干细胞库建立及其临床应用

仇志根 范华群 陈亮 袁纪军 郑滨 唐瑞峰 马庆(上海市血液中心,上海 200051)

摘要:目的 建立脐血造血干细胞库,用于治疗白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血等疾病。方法 采集新生儿脐血,用 6% HES 离心法分离脐血有核细胞以缩小脐血体积,样本以 10% DMSO 保存,检测有核细胞数、 CD_{34}^{+} 、CFU-GM 及 HLA,并作病原学检测。结果 收集 590 份脐血,合格 230 份(合格率 39%),平均脐血体积(89 ± 20) ml,平均有核细胞数(1.48 ± 0.36) $\times 10^9$,分离后有核细胞数(1.25 ± 0.28) $\times 10^9$,有核细胞回收率(91 ± 7)%,脐血 CD_{34}^{+} 细胞的百分率为(0.37 ± 0.26)%,复苏后 CFU-GM 回收率为 84%,平均每份脐血含 CFU-GM (0.9 ± 0.4) $\times 10^6$ 个集落,14% 的样本 CMV 抗体阳性。73 人查询,HLA 4 个抗原以上相合率为 95.7%。至 2001 年 7 月,提供 3 份脐血用于非亲缘脐血移植,1 份用于亲缘脐血移植,3 例植入,1 例排斥。结论 建立脐血库有良好的应用前景。

关键词:血库/脐血 造血干细胞/移植

中图分类号:R457.1+2 R55

文献标识码:A

文章编号:1004-549X(2003)03-0168-02

脐血中因含有丰富的具有高度增殖潜力的造血干/祖细胞^[1,2],目前已经成为造血干细胞移植的重要来源^[3]。一项无关供者脐血移植的统计结果显示,脐血移植可以治疗白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血等难治性疾病,并且移植后发生急(慢)性 GVHD 反应也较弱^[3]。由于脐血移植有如此多的优点,使得脐血库在世界范围内建立发展起来,笔者现将上海脐血库的建立及其完成的 4 例脐血移植的初步情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 脐血采集 在知情同意的原则下,产妇应妊娠 >35 周,无乙肝、丙肝、艾滋、梅毒等传染病,无遗传性疾病,无妇科并发症。脐血在第 3 产程,断脐后,通过脐静脉采集,脐血标本 4℃ 贮存, <24h 处理。

1.2 处理及保存 加入 1/4 体积的 6% 羟乙基淀粉(HES B Braun Medical, Inc)于脐血样本中,混匀,10℃ 低温倒置离心,600r/min,6min(Hitachi 6RP),去除下层红细胞,再正置离心,1000r/min,10min,去除上层血浆;收集底部富含核细胞及造血干/祖的部分,终体积约为 48ml,加入 DMSO(Tera Pharmaceuticals, Inc)使其终浓度为 10%,混匀, -80℃ 冰箱放置 2h 逐步降温,然后放入液氮中冷冻保存。

1.3 脐血复苏 将脐血自液氮中取出,迅速放入 38℃ 温水中快速复温,直至溶化,记录复温时间。

1.4 HLA 分型 A,B 位点分型采用新鲜的脐血标本,血清学方法(试剂为 One Lamda 公司产品);DR

位点采用低分辨率的 PCR-SSP 的方法。

1.5 CFU-GM 检测 甲基纤维素法,培养体系中含 0.9% 甲基纤维素,30% 胎牛血清, 10^{-4} mol/L 2-Me, 10μg/L rhGM-CSF, 10μg/L rhFL-3, 50μg/L rhSCF 等细胞因子。

1.6 ABO 血型检测 采用聚凝胺法。

1.7 病原体、传染病检测 HBsAg、抗-HCV、抗 HIV、CMV-IgG、CMV-IgM 等采用 ELISA 法;需氧菌和厌氧性杂菌采用硫乙醇酸盐培养基,检查霉菌和腐生菌采用改良马丁培养基,分别置于 30~35℃ 和 20~25℃ 培养箱中培养 14d,无菌生长的样本为合格。

1.8 CD_{34}^{+} 细胞检测 采用 CD_{45} -FITC、 CD_{34} -PE (Immunotech)同时标记脐血有核细胞,设计 CD_{45} -FITC, IgG1-PE (Immunotech) 对照, FCM (Coulter EPICS Elite Esp)检测。

1.9 细胞活力检测 苔酚兰试验。

2 结果

2.1 脐血库数据资料 共采集脐血样本 590 份,其中有效保存了 230 份脐血样本(表 1,其余 360 份样本中,40 份未达到有效采集量 40ml,278 份不符合筛选标准,14 份 HLA 分型不明确,28 份操作失误)。有核细胞及 CD_{34}^{+} 细胞的回收率分别为(91 ± 7)% 和 (86 ± 22)%。脐血样本冻存 4 周后复苏,CFU-GM 计数由 89 ± 24 集落/ 1×10^5 NCs 下降到 75 ± 26.8 集落/ 1×10^5 NCs,回收率为 84%。

表 1 采集保存 230 份脐血样本结果

	$\bar{x} \pm s$	范围
采集脐血		
采集体积(ml)	89 ± 20	40~159
有核细胞($\times 10^9$)	1.48 ± 0.3	0.9~2.2
CD ₃₄ ⁺ ($\times 10^6$)	5.3 ± 3.8	1.3~13
CFU-GM($\times 10^6$)	0.9 ± 0.4	0.84~19.1
储存脐血		
储存体积(ml)	60	
CD ₃₄ ⁺ ($\times 10^6$)	4.5 ± 3.0	1.12~11.8
有核细胞($\times 10^9$)	1.25 ± 0.28	(0.7~2.1) $\times 10^9$
细胞活力(%)	98 ± 1*	
HBsAg(%)	0	
抗-HCV(%)	0	
抗-HIV(%)	0	
抗-CMV(%)	14	
细菌污染(%)	0	
真菌污染	0	

* n = 10

2.2 检索结果 230 份样本共接受 73 名患者的查询登记,其中 HLA 6 个位点完全匹配的 1 例(1.3%), 5 个位点匹配的 30 例(41%), 4 个位点匹配的 39 例(53.4%), 3 位点匹配的 3 例(1.3%), 4 个位点以上相匹率达 95.7%。

2.3 移植结果 共提供 4 份脐血用于移植,植入 3 例,排斥 1 例(表 2,3)。

表 2 病人特征

病例	性	年龄(岁)	体重(kg)	诊断	疾病状态	供受体血型	脐血来源	HLA 匹配	输入脐血体积(ml)
1	女	8	30	NHL	CR2	A/O	非亲缘	5/6	52
2	男	5	15	ANL	CR1	O/B	非亲缘	5/6	62
3	男	12	30	AA	进展期	A/O	非亲缘	5/6	62
4	男	3	13	H-ALL	CR1	O/B	亲缘	6/6	45

表 3 移植结果

病例	输入 NC 剂量($\times 10^7/\text{kg}$)	ANC > 0.5 $\times 10^9/\text{L}(\text{d})$	Plt > 20 $\times 10^9/\text{L}(\text{d})$	aGVHD	植入状态	存活时间
1	4.7	23	27	0	植入	>35 个月
2	7.7	11	36	II	植入	出院后 93 d 死于间质性肺炎持续缓解 >22 个月
3	4.1	20	79	0	排斥	
4	8.3	14	50	II	植入	>15 个月

3 讨论

自 1988 年首次采用脐血移植成功地治疗 1 例范可尼贫血^[4]以来,至 2000 年全世界已有近 2000

例脐血移植,成功率高达 80%,并且移植后长期存活率与骨髓移植相比没有显著差异^[5]。目前,我国尚未颁布脐血造血干细胞库技术规范,笔者参照国外脐血库标准,结合实际情况,从脐血采集、分离保存到移植等制订了上海脐血库操作标准和质量标准。自 1999 年起共采集脐血 590 份,因不符合筛选标准、操作失误、脐血量不足、HLA 分型不明确等原因,仅有 230 份脐血合格,合格率 39%。有核细胞是脐血质量的关键性指标,上海脐血库将 $>0.9 \times 10^9$ 定为合格,经 HES 分离后,有核细胞回收率为 91%,与美国纽约血液中心脐血库一致^[6]。平均保存有核细胞为 $(1.25 + 0.28) \times 10^9$,若按移植 NC 为 $2 \times 10^7/\text{kg}$ 标准计算^[7],脐血库脐血可供体重 60kg 的成人使用。目前,上海脐血库共提供了 4 份脐血给 4 个病人移植,病人分别患有 VI 期 NHL、ANL、AA 和 H-ALL,平均输入 $6.2 \times 10^7/\text{kg}$ 有核细胞,3 例植活,1 例排斥。除 1 例 M2a(ANL)病人出院后发生间质性肺炎死亡外,另 3 例病人全部存活(表 3)。

(感谢南京空军 454 医院血液科,浙江省中医院血液科,上海复旦大学中山医院血液科,上海儿童医学中心血液科给予的支持和合作!)

参考文献

- Knudtson S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 1974, 43(1):357
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(3):3828
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Eng J Med*, 1998, 339(22):1565
- Gluckman E, Broxmeyer HE, 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 Eng J Med*, 1989, 321(19):1174
- Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *N Eng J Med*, 2000, 342(25):1846
- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield KE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: (10) 10119

(2002-05-16 收稿, 2003-06-02 修回)

本文编辑:蔡 辉