

# 非程控-80℃冷冻保存自体外周血干细胞移植的临床研究

马庆 范华骅 范慧珠 郑滨 袁纪军(上海市血液中心,上海 200051)

**关键词:** 外周血干细胞 冷冻保存 移植

**中图分类号:** R331.1<sup>+</sup>4 R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2001)02-0094-02

外周血干细胞(PBSC)大容量单采和非程控-80℃冷冻保存是一种简便、实用的造血干细胞采集和保存方法,国外自 90 年代以来开始有这方面的报道<sup>[1~3]</sup>,笔者用-80℃冷冻保存的自体 PBSC 进行移植治疗恶性血液病和实体瘤 29 例获得成功,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 病例** 29 名患者来自上海友谊医院、上海长征医院、上海市第一人民医院,男性 11 例,女性 18 例,其中成人 27 例,儿童 2 例,平均年龄 43 岁(6~66 岁),其中乳腺癌 12 例,肺癌 6 例,结肠癌、胃癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤各 2 例,神经母细胞瘤、恶性淋巴瘤、急性粒单细胞性白血病各 1 例。

**1.2 PBSC 动员和采集** ①动员方案 联合化疗+rhGM-CSF(Schering-plough 公司产品) 300μg/d 皮下注射,于化疗停药第 10~14 天开始,共连续注射 6~7d;联合化疗+rhG-CSF(Kirin 公司产品) 300μg/d 皮下注射,于化疗停药第 6~7 天开始共连续注射 7~9d。当外周血 WBC>1.0×10<sup>9</sup>/L,CD34<sup>+</sup>细胞>1%时,开始采集外周血;②PBSC 采集 27 名成人用 CS3000 plus 血细胞分离机(Baxter 美国),2 例儿童用 Haemonetic MCS-3P 血细胞分离机(美国),为防止儿童产生失血反应,在采集 PBSC 前,预先用 2U 浓缩红细胞悬液(150ml/U)充满分离管道。

**1.3 预处理方案** 见附表

附表 患者预处理方案

诊断	预处理方案(化疗)
多发性骨髓瘤	马法兰 200mg/m <sup>2</sup> ×1, VP16 300mg×3
非霍奇金淋巴瘤	CTX 40mg/kg×3, VP16 1000mg×1, Ara-C 300mg×2, CCNU 200mg×1
急性粒单细胞性白血病	CTX 50mg/kg×2, TBI
恶性淋巴瘤	CTX 50mg/kg×3, VP16 300mg×1, Ara-C 300mg×2
神经母细胞瘤*	美法仑 70mg×1, VP16 70mg×2, DDP20mg×3
肺癌	CTX 40mg/kg×3, VP16 300mg×3, DDP80mg×3
胃癌	CTX 40mg/kg×3, VP16 300mg×3, DDP80mg×3
结肠癌	VP16 300mg×3, DDP80mg×3, 5-FU 700mg/m <sup>2</sup> ×5, CF 400mg×5
乳腺癌	CTX 40mg/kg×3, VP16 300mg×3, DDP80mg×3

\* 患者为儿童,6 岁,体重 18kg,体表面积 0.73m<sup>2</sup>

**1.4 PBSC-80℃冷冻保存及复温** ①保存 取每个病人已采集的 PBSC 样品在冰水浴中加入 4 倍体积的-80℃低温保护剂(CP80 低温保护剂),其中含 7.5%右旋糖酐, 0.25%L-谷氨酰胺, 6.25%白蛋白, 6.25%DMSO, 80%TCE(上海市血液中心研制)<sup>[4]</sup>,混匀后分装,置-80℃冰箱保存;②复温 从-80℃冰箱中取出 PBSC,立即放入 40℃水浴中快速解冻,解冻过程在 1min 内完成。

**1.5 PBSC 回输** 完成预处理,48h 后,通过中心静脉用输血管器快速回输自体 PBSC。

**1.6 PBSC 质量检测方法** ①细胞计数:用 Coulter T540 细胞计数仪计数有核细胞;②粒-巨噬细胞集落(CFU-GM)培养;改良的微量甲基纤维素单层半固体法<sup>[5]</sup>;③ CD34<sup>+</sup>细胞的检测:采用 Coulter 公司 EPICS Elite ESP 分析分选系统,所有单抗由 Coulter Immunotech 公司提供;④细胞活率测定:台盼蓝拒染法检测细胞活率。

## 2 结果

**2.1 PBSC 保存 15~45d 复温后,有核细胞回收率为 95.9%±5.5%,CFU-GM 回收率为 81.2%±14.9%,台盼蓝拒染率为 88.8%±7.4%。**

**2.2 预处理后,患者中性粒细胞最低为(0.06±0.07)×10<sup>9</sup>/L(0~0.29×10<sup>9</sup>/L),血小板最低为(19.97±8.75)×10<sup>9</sup>/L(7.0×10<sup>9</sup>/L~47.00×10<sup>9</sup>/L);患者平均输入 MNC(5.05±3.11)×10<sup>8</sup>/kg,CFU-GM(15.77±33.73)×10<sup>4</sup>/kg,CD34<sup>+</sup>细胞(7.15±5.73)×10<sup>6</sup>/kg;自体 PBSC 移植后(8.56±3.11)d 中性粒细胞上升至 0.5×10<sup>9</sup>/L,(9.83±2.84)d 血小板上升至 30×10<sup>9</sup>/L,(10.86±3.51)d 血小板上升至 50×10<sup>9</sup>/L。**

**2.3 经治疗后,29 例患者中,13 例达到完全缓解(CR),12 例达到部分缓解(PR),2 例结肠癌对化疗不敏感,肿块未缩小 50%以上,基本无效;1 例多发性骨髓瘤和 1 例非霍奇金淋巴瘤 PBSC 移植半年后复发。**

## 3 讨论

外周血造血干细胞移植(PBSCT)以重建造血迅速等优点正逐渐受到重视,已经成为迄今为止各种恶性血液病、肿瘤、遗传性疾病、重度放射病及重症联合免疫缺陷等症的最有效的疗法<sup>[6]</sup>。本文 29 例患者经预处理(联合化疗+rhG-CSF 或 rhGM-CSF)后,中性粒细胞恢复至 0.5×10<sup>9</sup>/L,平

均为  $8.56 \pm 3.11d$ , 血小板恢复至  $30 \times 10^9/L$ , 平均为  $9.83 \pm 2.84d$ , 比自体骨髓移植(BMT)快<sup>[7]</sup>。

采用化疗药物和 rhG-CSF (或 rhGM-CSF) 联合动员时, 在外周血细胞降至最低点后再使用 rhG-CSF (或 rhGM-CSF), 当外周血 WBC  $> 1.0 \times 10^9/L$ , CD34<sup>+</sup> 细胞  $> 1.0\%$  时, 开始采集外周血, 平均采集  $2.18 \pm 0.82$  次(1~4 次)即可获得移植所需的 MNC、CD34<sup>+</sup> 细胞、CFU-GM 的量<sup>[8]</sup>。采用 Haemonetic MCS-3P 血细胞分离机和 CS 3000plus 血细胞分离机采集 PBSC 都可以获得满意的结果。

采用 CP-80℃ 低温保护剂保存 PBSC, MNC、CFU-GM 的回收率均达到较满意的效果。右旋糖酐是非穿透性保护剂, 它在冰冻过程中能使细胞脱水, 从而减少冷冻过程中胞内冰晶的形成。复温时, 还可以防止二甲基亚砜(DMSO)所致的细胞肿胀, 对细胞膜具有保护作用。传统的低温保护剂中 DMSO 终浓度为 10%, 笔者将 CP-80℃ 低温保护剂中的 DMSO 终浓度降为 5%, 可以减少 DMSO 对造血细胞的毒性, 获得更好的保存效果。目前, 用该方法已完成了单个核细胞一年保存期的实验, 细胞回收率达  $92.4\% \pm 4.5\%$ , 细胞活率达  $80.3\% \pm 6.7\%$ , CFU-GM 回收率达  $83.9\% \pm 11.1\%$ <sup>[4]</sup>, 说明该方法适用于中短期保存, 长期保存的效果还有待进一步实验。另外, PBSC 冷冻保存采用非程控-80℃ 保存方法, 缩短了保存时间, 使保存过程更简便, 易于推广应用。由于该方法是用-80℃ 冰箱保存自体 PBSC, 在保存期内(特别是夜间), 要防止停电情况的发生, 可以安排值班人员定时查看, 记录冰箱温度, 以保障冰箱正常运转。

## 参 考 文 献

- 1 Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with -80 degrees C mechanical freezer with demethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Leuk Lymphome*, 1995, 17(1-2):181
- 2 Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Transfusion*, 1996, 36(9):794
- 3 Hernandez-Navarro F, Ojeda E, Arrieta R, et al. Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES, with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath; results in 213 cases. *Bone Marrow Transplant*, 1998, 21(5):511
- 4 范华骅, 马庆. 骨髓、脐血、外周血干细胞-80℃ 保存研究. *中国输血杂志*, 1998, 11(1):8
- 5 唐佩弦, 杨天楹. 造血干细胞培养技术. 西安: 陕西科学出版社, 1985:105
- 6 奚永志, 唐佩弦. 深入开展脐血干细胞的基础与临床研究. *中华血液学杂志*, 1998, 20(8):397
- 7 崔钊, 牛亚明. 造血干细胞移植在非霍奇金淋巴瘤治疗中的应用. *国外医学肿瘤学分册*, 1998, (25)5:313
- 8 To LB, Haylock DN, Simmons PJ, et al. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, 1997, 89:2233

(致谢: 上海友谊医院、上海长征医院、上海市第一人民医院)

(2000-01-10 收稿, 12-01 修回)

本文编辑: 王良华

## 梅毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测初探

侯建华 陈林琴(江苏省高邮市人民医院中心血库, 江苏高邮 225600)

**关键词:** 梅毒 酶联免疫吸附试验 甲基胺红快速试验

**中图分类号:** R377<sup>+</sup>.1 R446.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2001)02-0095-02

在国内血站系统中梅毒血清学诊断国内主要应用非特异性试验如 RPR、TRUST<sup>[1]</sup> 等, 国外广泛应用的是特异性试验如 TPPA<sup>[1]</sup>、ELISA 等。笔者就国产梅毒双抗原 ELISA 试剂在献血者筛查中的应用作初步探讨。

### 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 1999 年 6~8 月个体献血者标本 1050 份, 无偿献血者标本 618 份, 皮肤性病门诊患者标本 53 份, 既往收集并-20℃ 保存已经被上级皮肤性病监测中心 TPHA 确诊的梅毒阳性标本 11 份, 总计 1732 人份。

**1.2 仪器** 美国 DRG-ELM 3000 型酶标仪; 美国 Multi-wash 洗板机。

**1.3 试剂** 梅毒双抗原 ELISA 试剂盒; 北京吉比爱生物

技术有限公司, 批号 990311; TRUST 试剂; 上海荣盛生物技术有限公司, 批号 990101, 990621。

**1.4 方法** 严格按试剂盒说明书操作, ELISA 和 TRUST 平行测定。ELISA 结果以酶标仪读数为准。

### 2 结 果 见附表。

共检测 1732 份标本, 阳性 16 份, 其中 1 份阳性 TRUST 未检出, 送上级性病监测中心 TPHA 确诊梅毒阳性。ELISA 法 16 份阳性全部检出和确诊试验结果一致, 特异性 100%。

### 3 讨 论

梅毒是一种危害较大的性传播疾病, 目前在我国的发