

骨髓、脐血、外周血干细胞-80℃保存研究

200051 上海市血液中心 范华骅 马 庆 柏乃庆

造血干细胞的体外长期保存一般采用 10% 二甲基亚砷低温保护剂, 程序降温后贮存在液氮中^[1~3], 这种方法需要程序降温仪、液氮罐等价格昂贵的低温保存设备, 且比较复杂、费时。自 80 年代后国外开始尝试用新型的联合低温保护剂保存造血干细胞^[4,5], 笔者采用二甲基亚砷/羟乙基淀粉低温保护剂和 CP80 低温保护剂作造血干细胞低温保存实验, 并观察了有关指标, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 低温保护剂

1.1.1 二甲基亚砷/羟乙基淀粉低温保护剂

10% 二甲基亚砷 (E·Merk), 12% 羟乙基淀粉 (常熟制药厂), 5% AB 血清, 0.4% L-谷氨酰胺 (E·Merk 进口分装), 70% TCE 骨髓保存液 (含 0.2% EDTA-Na₂ 的 TC199 培养液)^[6]。

1.1.2 CP80 低温保护剂 7.5% 右旋糖酐, 6.25% 二甲基亚砷, 6.25% 白蛋白, 0.25% L-谷氨酰胺, 80% TCE 骨髓保存液。

1.2 -80℃保存

1.2.1 骨髓细胞 采自急性脑衰竭死亡者髂前上脊, 用淋巴细胞分离液分离出骨髓单个核细胞 (MNC), 并用 TCE 骨髓保存液洗涤 2 次, 最后将分离所得的骨髓 MNC 悬浮于适量的 TCE 骨髓保存液中, 调节细胞浓度 $< 10 \times 10^7 / \text{ml}$, 在冰水浴中按 1:1 体积比例缓慢加入 4℃ 冰箱中取出的二甲基亚砷/羟乙基淀粉低温保护剂, 混匀后分装入普通医用塑料袋中, 将样品袋直接放入 -80℃ 冰箱保存。

1.2.2 脐血 离心后去除富血小板血浆, 1 体积脐血 (含有核细胞和红细胞) 在冰水浴中加 4 体积 CP80 低温保护剂, 有核细胞终浓度 $< 5 \times 10^7 / \text{ml}$, 分装后置 -80℃ 冰箱保存。

1.2.3 外周血干细胞 用 Haemonetic MCS-3P 血细胞分离机或 CS3000plus 血细胞分离机采集, 1 体积采集产品在冰水浴中加 4 体积的 CP80 低温保护剂, 有核细胞浓度 $< 10 \times 10^7 / \text{ml}$, 分装后置 -80℃ 冰箱保存。

1.3 解冻 骨髓、脐血、外周血干细胞样品从 -80℃ 冰箱中取出后, 立即放入 40℃ 水浴中复温, 解冻过程在 1 分钟内完毕。

1.4 骨髓、脐血、外周血干细胞质量检测方法

1.4.1 细胞计数 用常规白细胞计数法^[7]计数有核细胞。

1.4.2 细胞活率测定 台盼蓝拒染法测定细胞活率。

1.4.3 造血干细胞体外培养方法 改良的微量甲基纤维素单层 CFU-GM、CFU-E、BFU-E 培养^[8], 用植物血凝素-淋巴细胞条件培养液 (PHA-LCM) 作为核-巨噬系集落刺激因子。

1.4.4 脐血冰冻前和解冻后淋巴细胞亚群比例 采用 Coulter 公司 EPICS-XL 型流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 骨髓 MNC 保存半年和一年效果如表 1 所示。

表 1 骨髓 MNC 保存半年和一年部分指标结果

保存期	细胞回收率 (%)	细胞活率 (%)	CFU-GM (%)	BFU-E (%)	CFU-E (%)
半年	86.8±6.1	86.3±6.9	88.2±3.5	85.3±26.6	76.5±10.3
一年	92.4±4.5	80.3±6.7	83.9±11.1	86.4±24.5	88.3±15.3

2.2 脐带血保存一年后有核细胞回收率为 (92.4±6.6)%, CFU-GM 回收率为 (86.1±4.1)%, 活率为 (83.1±4.4)%。外周血干细胞保存 3 个月后有核细胞回收率为 (93.2±3.8)%, CFU-GM 回收率为 (82.3±3.7)%, 活

率为(85.0±6.1) %。

2.3 脐血冻存前后淋巴细胞亚群比例的变化情况如表 2 所示,结果表明脐血经冻存后 T 辅助、诱导亚群(CD4⁺), 细胞毒 T 淋巴细胞(CD8⁺/CD28⁺), T 抑制细胞(CD8⁺/CD28⁻), HLA-DR 阳性细胞, NK 细胞均有不同程度的下降。

表 2 脐血冻存前后淋巴细胞亚群比例变化

	冻前	冻后	参考值*
CD4	52.2	38.7	37.53±8.91
CD29	28.5	26.3	59.45±12.49
CD4 ⁺ /CD29 ⁺	14.2	14.4	16.86±5.30
CD8	27.8	20.1	28.01±10.13
CD28	54.5	77.4	45.47±11.44
CD8 ⁺ /CD28 ⁺	15.5	12.1	11.73±3.44
CD8 ⁺ /CD28 ⁻	12.2	6.9	16.93±9.35
CD3	63	82.1	65.86±9.60
HLA-DR	5.8	3.8	
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺	0.6	0.5	
NK	3.9	3.2	16.27±8.50
CD34	3.0	3.8	

* 参考值由第二军医大学长征医院流式细胞仪室提供

3 讨论

羟乙基淀粉和右旋糖酐是一种非穿透性保护剂,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,羟乙基淀粉还可以防止二甲基亚砷所致的细胞肿胀,对细胞膜具有保护作用。另外,采用联合低温保护剂可以降低二甲基亚砷对细胞的毒性。据文献报道,即使是在 4℃ 下,骨髓细胞接触 10% 二甲基亚砷(骨髓细胞与低温保护剂混合后的终浓度) 5 分钟后,25% 的 CFU-GM 将损失,30 分钟后细胞损失可超过 75%。笔者研制的低温保护剂与样品混合后二甲基亚砷终浓度降为 5%,可以降低低温保护剂对造血干细胞的毒性,获得更好的保存效果。

由于羟乙基淀粉很难溶解,所以笔者在研制 CP80 低温保护剂过程中用右旋糖酐代替羟乙基淀粉,同样取得较好的保存效果。使用

CP80 低温保护剂-80℃ 保存外周血干细胞已成功地开展了 4 例自身外周血干细胞移植术,其中多发性骨髓瘤 2 例,淋巴瘤 1 例,神经母细胞瘤 1 例。病人经大剂量化疗后,输注冻存的自身外周血干细胞,造血功能在短期内恢复。

一般认为,脐血免疫细胞活性比成人血低,而低温冷冻过程可进一步降低淋巴细胞免疫活性。笔者在实验中也发现脐血中 NK 细胞比例低于成人血,脐血经冷冻后 T 辅助、诱导亚群(CD4⁺), 细胞毒 T 淋巴细胞(CD8⁺/CD28⁺), T 抑制细胞(CD8⁺/CD28⁻), HLA-DR 阳性细胞, NK 细胞均有不同程度的下降,提示脐血经低温保存后移植可减少 GVHD 反应。

参 考 文 献

1 Leff RS, et al. Phase II trial of high-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation for metastatic colon carcinoma. J Clin Oncol 1986;4 : 1586

2 Spitzer G, et al. High-dose intensification therapy with autologous bone marrow support for limited small cell bronchogenic carcinoma. J Clin Oncol 1986;4 : 4

3 Campos L, et al. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. Cryobiology 1995;32(6) : 511-5

4 Stiff PT, et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch. Cryobiology 1983;20 : 17

5 Stiff PT, et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. Blood 1987;70 : 974

6 陈厚初,等.骨髓细胞低温(4℃) 保存的实验研究和临床初步应用.上海医学 1983;6 : 331

7 朱忠勇,陈之航.临床医学检验.上海科学技术出版社,1978;15

8 唐佩弦,杨天楹.造血干细胞培养技术.西安:陕西科技出版社,1985;105

(1997-10-13 收稿;1998-02-23 修回)
(本文编辑:王良华 校对:尚云)