

• 论著 •

改良脐带血分离方法的质控样管复苏回顾研究

吴春燕 陈阳 李星洁 王自波 陈强 赖真阳

【摘要】 目的 对比改良脐带血分离方法（改良方法）与传统富浆法（传统方法）对于脐带血造血干细胞质量的影响。**方法** 根据不同体积段改良传统脐带血分离方法，对近年来复苏的脐带血质控样管进行回顾研究，对比方法改良前后一年，两种制备方法获得产品的各项质量参数。**结果** 使用改良方法后，分离后体积由传统方法的 (25.68 ± 2.03) mL下降至 (22.53 ± 4.24) mL ($P < 0.05$)。红细胞（RBC）去除率由 (75.87 ± 11.84) %上升至 (82.94 ± 8.68) % ($P < 0.001$)。复苏的质控样管在总有核细胞（TNC）回收、CD34⁺细胞回收、CD34⁺细胞活率等方面两组间无统计学差异。集落形成能力检测中，改良方法组的粒单核细胞系集落形成单位（CFU-GM）回收率为 (60.00 ± 32.52) %，较传统方法组的 (46.97 ± 28.12) %有提高，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 改良脐带血分离方法提高了RBC去除率，减小了冻存体积，复苏脐带血干细胞具有更好的CFU-GM形成能力。

【关键词】 脐带血 改良脐带血分离法 质控样管复苏

【中图分类号】 R-331 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587 (2023) 02-0239-04

A Retrospective Study on a Modified Cord Blood Separation Method Using QC Vial Thawing Data WU Chun-yan, CHEN Yang, LI Xing-jie, et al. *Sichuan Cord Blood Bank* 610000

【Abstract】 Objective To compare the impact on stem cell quality between using modified cord blood separation method (modified method) and using traditional cord blood separation method (traditional method). **Methods** We developed a modified method, in which different centrifugation parameters were used according to the samples' volume. We collected QC vials' thawing data, which were processed within one year before and after the modification. Test results were compared between these two methods. **Results** In modified method group, volume after separation decreased from (25.68 ± 2.03) mL to (22.53 ± 4.24) mL ($P < 0.05$). Red blood cells (RBC) removal rate rose from (75.87 ± 11.84) % to (82.94 ± 8.68) % ($P < 0.001$). No statistic difference was observed in total nucleated cells (TNC) recovery, CD34⁺ cell recovery and CD34⁺ cell viability after thawing. In colony formation test, colony forming unit-granulocyte monocyte (CFU-GM) recovery were (60.00 ± 32.52) % and (46.97 ± 28.12) % in modified method group and traditional method group, respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The modified cord blood separation method improved RBC removal rate and freezing product volume. After freezing, the stem cell showed higher potency in CFU-GM formation.

【Key words】 Cord blood Modified cord blood separation method QC vial thawing

脐带血作为除骨髓和外周血外一种重要的造血干细胞来源，广泛用于血液系统疾病治疗及再生医学领域。为了节约冻存空间，同时减少红细胞数量以降低复苏产品时产生的大量细胞碎片，提高复苏造血干细胞的质量，脐带血造血干细胞库通过离心去除红细胞和血浆，保留富含造血干细胞的有核细胞成分。笔者所在单位从2013年以来，根据不同脐带血体积采用不同的离心分离方法，本研究旨在对近年质控

（QC）样管复苏的数据进行回顾分析，对改良方法与传统方法进行比较。

材料与方 法

1 样品采集及分组 2013年10月本单位对脐带血分离方法进行了改良，本研究以此时间点的前后一年采集冻存的公共库脐带血作为研究对象，所有产妇均签署研究知情同意书。2012年10月~2014年9月两年间冻存的脐带血中，后续总共有164份在收到临床医疗机构出库申请后进行了质控样管复苏，其中2012年10月~2013年9月分离的脐带血104份（传统方法），2013年10月~2014年9月分离的脐带血60份（改良方法）。

2 主要试剂与仪器 6%羟乙基淀粉（HES）购自美国B.Braun公司；CD34-PE和CD45-FITC购自美国贝克曼库尔特有限公司；甲基纤维素购自加拿大Stem cell

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2023.02.016

作者单位：610000 四川成都，四川省脐带血造血干细胞库，四川新生命干细胞科技股份有限公司

作者简介：吴春燕，主要从事脐带血制备冻存方面的研究，（E-mail）303506684@qq.com。

通信作者：赖真阳，副研究员，主要从事干细胞方面的研究。（E-mail）lai.zhenyang@foxmail.com。

Technologies Inc; 冻存保护液购自德国WAK-chemie公司; 三联袋(1个200 mL空母袋, 2个200 mL空转移袋)购自四川南格尔生物科技有限公司; 生物安全柜购自新加坡艺思高科技有限公司(AC2-4S1); 大容量低温离心机SORVALL®购自美国Thermo Fisher公司(RC-3BP+); 血细胞分析仪购自日本SYSMEX公司(XN-1000); 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司(Beckman Coulter FC500); 分浆夹购自美国Fenwal公司(4R4414)。

3 传统分离方法 工作人员无菌操作下, 脐带血转入三联袋, 加入脐带血1/5体积的6% HES, 置摇床混匀5 min。轻离心: 混匀后的脐带血采用正向放置以100×g, 离心6 min, 刹车关。从离心机里取出将血袋放于分浆夹中挤压, 让上层白膜层与血浆缓慢流入一个空的转移袋。重离心: 将血袋竖直放入离心机内, 以400×g, 离心11 min, 含白膜层和血浆的血袋放入分浆夹, 将多余的血浆转入另一个空白转移袋中, 保留白膜层。

4 改良分离方法 在传统方法的基础上, 轻离心步骤按照不同体积分为以下三组:

a. 90 mL以下, 脐带血采用反向放置以90×g, 离心6 min, 刹车关。离心机里取出将血袋挂在分离架上, 让下层红细胞缓慢流入一个空转移袋中, 白膜层与血浆保留在原血袋中。

b. 90~129 mL, 脐带血采用正向放置以90×g, 离心6 min, 刹车关。离心机里取出将血袋放于分浆夹中挤压, 让上层白膜层与血浆缓慢流入一个空的转移袋。

c. 130 mL以上, 脐带血采用正向放置以120×g, 离心6 min, 刹车关。离心机里取出将血袋放于分浆夹中挤压, 让上层白膜层与血浆缓慢流入一个空的转移袋。

5 脐带血的冻存与复苏 分离后的脐带血加入占分离后体积25%的冻存保护液(55% w/v DMSO, 5% w/v Dextran), 分别留取0.3 mL样本装入两个质控样管中, 采用程控降温仪进行降温后, 放入液氮罐中冻存。复苏质控样管时, 将其放入37℃~42℃的水浴中迅速融化, 然后进行各项检测。

6 流式检测 标记流式管, 脐带血样本各50 μL加入实验管, 在实验管中加入10 μL CD45-FITC和10 μL CD34-PE荧光抗体, 再加入10 μL的7-AAD核酸染液混匀, 室温避光孵育15 min, 加入300 μL OptiLyse-C溶血素, 室温避光孵育10 min, 加入300 μL生理盐水终止反应, 随后加入50 μL flow count混匀后上机检测。

7 造血干祖细胞集落 (colony forming unit, CFU) 检测 对分离后的脐带血以及复苏的脐带血进行CFU检测。用甲基纤维素培养基, 按照有核细胞接种量 1.25×10^4 个/孔接种于24孔板中。将24孔板置于37℃, 5% CO₂饱和湿度下培养14 d。在倒置显微镜下根据各种集落形态差异, 对粒-巨噬细胞集落(CFU-GM)、红细胞集落(BFU-E)、粒细胞-红细胞-巨噬细胞-巨核细胞集落(CFU-GEMM)分别计数, 根据脐带血的细胞总数, 计算出每份脐带血的干祖细胞集落的数量。

8 统计学分析 计量资料采用均数±标准差的形式表示, 采用SPSS 21软件进行数据分析, 改良方法与传统方法的比较分析采用t检验, P<0.05表示差异有统计学意义。

结 果

1 两种方法分离效果比较 采用两种方法的脐带血分离效果的比较结果见表1。使用改良方法后, 分离后体积由传统方法的(25.68±2.03) mL下降至(22.53±4.24) mL (P<0.05)。RBC去除率由(75.87±11.84)%上升至(82.94±8.68)% (P<0.001)。而在分离前体积和TNC回收率两方面, 两组之间无统计学差异。

2 两种方法样管复苏检测指标比较 改良方法组的TNC复苏回收率为(84.56±11.41)%, CD34⁺细胞复苏回收率为(68.29±17.28)%, CD34⁺细胞活率为(93.32±5.75)%, 几项指标与传统方法组比较均无统计学差异。在集落形成能力检测中, 改良方法组的CFU-GM回收率为(60.00±32.52)%, 较传统方法组的(46.97±28.12)%有提升, 且差异具有统计学意义(P<0.05), 但在CFU总数回收率方面, 二

表1 两种方法分离效果比较

	改良方法 (n=60)	传统方法 (n=104)	P
分离前体积 (mL)	128.00±31.60	125.39±24.05	0.789
分离后体积 (mL)	22.53±2.24	25.68±4.03	0.016
TNC回收率 (%)	87.40±6.95	87.71±6.34	0.085
RBC去除率 (%)	82.94±8.68	75.87±11.84	<0.001

表2 两种方法样管复苏检测指标比较

	改良方法 (n=60)	传统方法 (n=104)	P
冻存时间 (月)	58.74±24.56	64.65±24.40	0.095
TNC复苏回收率 (%)	84.56±11.41	84.34±13.62	0.935
CD34 ⁺ 细胞复苏回收率 (%)	68.29±17.28	70.72±19.80	0.181
CD34 ⁺ 细胞活率 (%)	93.32±5.75	92.85±3.83	0.640
CFU-GM回收率 (%)	60.00±32.52	46.97±28.12	0.045
CFU总数回收率 (%)	56.22±27.18	54.19±27.17	0.731

者无显著差异。

讨 论

自1988年第一例脐带血用于范可尼贫血的移植治疗以来^[1], 脐带血领域发展迅速。脐带血作为重要的造血干细胞来源, 相较于传统骨髓和外周血来源具有资源易获取, 采集对供者无损伤, 干细胞潜力更高, HLA配型要求低, 实物库保存等优势^[2]。早期脐带血主要运用在血液和免疫系统的移植治疗当中, 最近其在再生医学领域的应用越来越受到关注, 对于脑瘫、自闭症等神经系统疾病显示出良好的前景^[3]。

在去除血浆以及红细胞的同时, 最大限度地回收富含造血干细胞的有核细胞组分, 一直是脐带血分离的关键。目前, 各个脐带血库多采用纽约血液中心脐带血库建立的富浆法进行制备^[4]。加入6% HES后, 轻离心后利用分浆夹将白膜层和血浆层挤入空袋中, 从而去除红细胞。再通过一次重离心后, 分离去除血浆, 保留白膜层。其中轻离心后的红细胞去除为分离的关键步骤, 损失的有核细胞主要存在于红细胞层中。加拿大Alberta脐带血库的研究人员报道了不同脐带血体积相适应的最佳轻离心的时间^[5]。结合我单位实际情况, 我们在改良方法中对较大体积(130 mL以上)的脐带血增加了离心力。而针对较小体积(90 mL以下)的脐带血, 轻离心后有核细胞富集的白膜层离血袋底部较近, 所以我们采用反向离心, 然后在重力作用下将红细胞从血袋底部的导管流走。

TNC作为脐带血移植出库的重要指标, 其含量直接关系到移植成功的概率^[6]。在本研究中改良方法与传统方法的TNC回收率无明显差异($P < 0.05$), 而且也与近期报道的脐带血分离数据相当^[7-8]。但是与传统方法相比, 改良方法RBC去除率显著提升。造血干细胞终产品中RBC残留, 在输注过程中会出现不同程度的溶血反应。同时, VANEGAS^[9]等人也报道了RBC的残留量与复苏后造血干细胞(CD34⁺细胞)的活性呈负相关。在本复苏研究中, 我们没有观察到两个方法之间在CD34⁺细胞复苏回收率和CD34⁺

细胞活率方面有差异, 或许是因为Vanegas是比较去除RBC和不去除RBC两种方法之间的差异, 而本研究中两组之间的RBC残留量的差异不足以造成CD34⁺细胞活率差异。然而, 在CFU-GM回收率方面, 改良方法组优于传统方法组, 而且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。SOLVES^[10]等人以前报道过RBC残余量与CFU-GM回收率呈负相关这一现象, 但未进行深入的探讨。笔者认为, 由于脐带血的冻存及复苏条件主要针对包括干细胞在内的有核细胞, 红细胞复苏后大量破裂死亡所释放的细胞碎片和信号分子, 将影响干细胞增殖活力。CFU检测在体外模拟造血干细胞的增殖分化过程, 被认为是造血干细胞生物学活性及功能的重要检测手段。CFU-GM反应了造血干细胞粒单系增值分化的能力, 多个研究组的结果表明该指标与脐带血的成功植入与是否有密切的关系^[11-12]。CFU-GM高的脐带血在输注后, 能够有更快的中性粒细胞和血小板的植入。在本研究中, 虽然通过7AAD染色后流式检测, 两个实验组CD34⁺细胞活性没有差别, 但是CFU-GM回收率的差异正体现了两组干细胞产品之间增殖活力的差别。因此改良方法制备的脐带血具备更好的干细胞活性及功能。

同时, 由于在RBC去除方面的提升, 改良方法脐带血分离后体积从(25.68±2.03) mL降低至(22.53±4.24) mL。在冻存前需加入占干细胞体积25%的冻存保护液, 通常为DMSO-右旋糖酐预混液。而目前各脐带血库采用的主流50 mL细胞冻存袋, 如美天旋Freezing bag 50和Origen CS50等, 推荐的最大容纳体积为30 mL。传统方法组有部分脐带血由于体积过大, 需要分两袋进行冻存, 而采用改良方法后可以节约部分冻存袋耗材的使用。随着工作人员技术娴熟, 在不影响TNC回收率的情况下, 分离后体积可以进一步降低。

综上所述, 改良脐带血分离方法根据不同体积的脐带血, 分段采用不同的处理方式。该方法在保证TNC回收率的同时, 可以增大红细胞的去除水平, 并且分离后脐带血的体积可以得到很好的控制。通过回

顾性的样本复苏研究,改良脐带血分离方法组的样本获得了更好的CFU-GM回收率,提示该方法分离的脐带血具有更好的质量。脐带血是个性化的产品,是否脐带血还可以根据体积或者其他特性参数进行进一步分类处理,在不影响脐带血库批量生产效率的同时,提高产品质量,值得进行深入探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] GLUCKMAN E, BROXMEYER H A, AUERBACH A D, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's Anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling[J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(17):1174-1178.
- [2] BALLEEN K K, GLUCKMAN E, BROXMEYER H E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond[J]. *Blood*, 2013, 122(4):491-498.
- [3] KURTZBERG J. A history of cord blood banking and transplantation[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(5):1309-1311.
- [4] RUBINSTEIN P, DOBRILA L, ROSENFELD R E, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(22):10119-10122.
- [5] YANG H Y, LOUTFY M R, MAYERHOFER S, et al. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation[J]. *Transfusion*, 2011, 51(2):284-292.
- [6] DEHN J, SPELLMAN S, HURLEY C K, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR[J]. *Blood*, 2019, 134(12):924-934.
- [7] 吴洁莹, 陈劲松, 吴韶清, 等. 三联袋转移法在脐带血制备中的应用效果[J]. *中国当代医药*, 2021, 28(15):166-169.
- [8] 赵清刚, 雒猛, 高峰, 等. 不加羟乙基淀粉(HES)分离脐血造血干细胞的方法探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(S01):125-128.
- [9] VANEGAS D, GALINDO C C, PÁEZ-GUTIÉRREZ I A, et al. Human leukocyte antigen and red blood cells impact umbilical cord blood CD34+ cell viability after thawing[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4875.
- [10] SOLVES P, MIRABET V, PLANELLES D, et al. Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: a comparative study[J]. *Transfusion*, 2005, 45(6):867-873.
- [11] PAGE K M, ZHANG L J, MENDIZABAL A, et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(9):1362-1374.
- [12] HUSSEIN E, DEFOR T, WAGNER J E, et al. Evaluation of post-thaw CFU-GM: clinical utility and role in quality assessment of umbilical cord blood in patients receiving single unit transplant[J]. *Transfusion*, 2020, 60(1):144-154.

(收稿日期: 2022-11-18)

(本文编辑: 刘磊)