DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.019
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1293-03

论著

F68及其联合DMSO对脐血造血细胞的低温保护作用

蔡永国,张翼军 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 研究普鲁兰尼克(F68)及其联合DMSO在-80℃条件下对脐血造血干细胞的低温保护作用,为临床应用提供依据。方法 脐血造血细胞冻存30、60、90 d后复苏,应用台盼蓝拒染率、集落形成试验、^{3}H-TdR掺入率等,测定经F68保护体系冻存的脐血活力,并与目前通用的冷冻保护剂二甲亚砜及CP-1进行了对比研究。结果 在-80℃条件下,F68对脐血造血细胞具有明显的冷冻保护作用,并与DMSO具有协同保护效果,联合F68及DMSO的保护体系可使MNC、CFU-GM的平均回收率及台盼蓝拒染率在第90天时分别达到(83.4±6.3)%,(68.8±7.9)%,(92.5±5.1)%,优于目前通用的细胞冻害保护液CP-1及DMSO。90 d的冻存期内,脐血细胞活力无明显下降。结论 F68及其与DMSO组成的冻存方案对脐血造血干细胞具有良好的冻存保护效果。

关键词:普鲁兰尼克;脐血造血细胞;低温冻存;^{3}H-TdR掺入率
中图法分类号:R457.12;R954 文献标识码:A

Effect of F68 and its combination with dimethyl sulfoxide on cryopreserved hematopoietic stem cell from umbilical cord blood

CAI Yong-guo, ZHANG Yi-jun (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of F68 and combined with DMSO on cryopreservation of hematopoietic stem cell in cord blood under -80℃ and for farther clinical usage. Methods Separated by density gradients of 1.080 Percoll, the MNCs were divided into four groups on the basis of different cryoprotectants: CP-1, F68 combined with DMSO, F68 alone, and DMSO alone. Each group was stored in -80℃ freezer for 90 days. At 30th, 60th, 90th day, cells were thawed and cell viability was tested by Typan blue, clonogenic potential and ^{3}H-TdR incorporation. Results F68 alone had cryoprotective effect but the new cryoprotectant containing 5% F68, 5% DMSO and 4% albumin had better cryoprotective effect compared to the counterparts of 10% DMSO and CP-1. After cryopreservation and thawing, MNC recovery rate reached(83.4±6.3)%, CFU-GM recovery rate reached(68.8±7.9)% and viability tested by Typan blue was (92.5±5.1)% at the 90th day. Within 90 days of cryopreserving period, no significant decline of cell viability was found. Conclusion F68 combined with DMSO is of better cryoprotective effect than CP-1 and DMSO on hematopoietic stem cell in cord blood.

Key words: F68; hematopoietic stem cell in cord blood; cryopreservation; ^{3}H-TdR incorporation

脐血造血细胞的冻存是脐血移植的关键环节,研究表明,不同的冻存方案对脐血造血细胞的活力有不同影响,进一步探索无毒高效的保护剂,以及联合应用不同的冻存保护剂,以促使造血干细胞的低温保护研究向简便,低费用,高质量和规范化发展具有重要的意义。F68具有无毒,无抗原性,无溶血性,可静脉应用等优点,本研究拟通过观察普鲁兰尼克(F68)及其与二甲亚砜(DMSO)合用后对脐血造血细胞的低温保护作用,开发符合临床应用要求的低温保护剂。

1 材料和方法

1.1 脐血来源

所有脐血来源于西南医院妇产科。脐血收集适应证参考Thierry等[1]介绍的标准,有以下情况者不收血:妊娠不足32周;胎盘剥离距分娩时间超过12 h;产妇HBSAg阳性或分娩时发热及证实有明确感染者;羊水内有胎粪;产妇贫血;胎儿窘迫综合征;红细胞致敏;分娩前经羊水细胞或胎盘绒毛活检等证实有遗传病、先天性疾病或娩出新生儿明显畸形。

作者简介:蔡永国(1970-),男,山东省沂水县人,硕士,主治医师,主要从事造血干细胞移植方面的研究。电话:(023)68754000-725220

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-10-11

1.2 主要试剂及仪器

DMSO及F68购自Sigma公司;CP-1系日本极东制药工业株式会社产品,Kirin公司惠赠;粒-单集落刺激因子(GM-CSF)及促红细胞生长素(Epo)由Kirin公司惠赠。^{3}H-TdR购自中国原子能研究所产品;低温冰箱(Sanyo);电子显微镜(JEM-100SX型,Japan);双道液体闪烁计数器(LKB-1217, Finland)。

1.3 方法

1.3.1 冻存保护体系的组成

实验组1(CP-2组):含F68、DMSO及白蛋白(终浓度分别为5%,5%,4%);实验组2(F68组):含F68及白蛋白(终浓度分别为10%及4%);对照组1(CP-1组):含羟乙基淀粉、DMSO及白蛋白(终浓度分别为6%,5%,4%);对照组2(DMSO组):含DMSO及白蛋白(终浓度分别为10%及4%)。

1.3.2 脐血单个核细胞(Mononucleor cell, MNC)的分离

参考张林生[2]介绍的方法。用比重为1.080的Percoll分离液分离单个核细胞,分离后的细胞用IMDM培养液洗涤2遍,制成含MNC(2~4)×10^7/ml的细胞悬液。

1.3.3 细胞计数及台盼蓝拒染率

采用实验室常规方法计数冻存前后脐血的有核细胞数。台盼蓝拒染率参考司徒镇强[3]介绍的方法。细胞悬液20 μl加入160 μl PBS中混匀后加入台盼蓝工作液20 μl,终浓度为0.04%,混匀后做活细胞和死细胞计数,凡胞浆染成蓝色者为死细胞,而活细胞拒染。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$活细胞率(\%)=\frac{活细胞总数}{活细胞总数+死细胞总数}\times 100\%$$

1.3.4 脐血的冻存及复苏 在冰水浴中，脐血 MNC 悬液中加入等体积的冷冻保护液，混匀，分装于 2 ml 的冻存管内，直接放于－80℃冰箱内保存，冻存脐血造血细胞的终浓度 2×10^6/L。样品分别于冻存后第 30、60、90 天复苏。复苏程序为：脐血自－80℃冰箱取出后立即放入 37℃水浴中振荡复温，之后用 IMDM 稀释 10 倍，1 000 r/min 离心 10 min 去除冷冻保护剂后进行各项细胞活力测定。

1.3.5 集落培养 培养体系中含马血清 30%、甲基纤维素 0.9%、脐血单个核细胞 2×10^5/ml、GM-CSF 20 ng/ml、Epo 2 U/ml、谷氨酰胺 2 mmol/L、2-巯基乙醇 5×10^5 mol/L、青霉素及链霉素各 100 U/ml。种于 24 孔板中，每孔 0.5 ml，复种 3 孔。5% CO_2，饱合湿度条件下培养。于第 10 天在倒置显微镜下计数 CFU-GM。分别计数冻存前后的 CFU-GM 产率。

$$脐血复苏后集落回收率(\%)=\frac{复苏后集落总数}{冷冻前的集落总数}\times 100\%$$

1.3.6 ^{3}H-TdR 掺入率试验 参照张洪泉等[3]介绍的方法有所改动，每个实验组分成 3 份，每份含细胞数 1×10^6，小牛血清 20%，在 37℃，5% CO_2，饱合湿度条件下培养 24 h，然后加入 ^{3}H-TdR 37 kBq(比放性 777GBq)，继续培养 10 h，加入 4℃冷盐水停止掺入，然后用多头细胞收集器将细胞收集在红光 49 型玻璃纤维滤纸上，用生理盐水洗涤 3 遍，经 50g/L 的三氯乙酸，无水乙醇脱水脱色，取下滤纸片烘干，置闪烁瓶内，加入 5 ml 闪烁液(含 PPO 5 g，POPOP 0.5 g，二甲苯 1 000 ml)暗化 4～6 h，最后在双道闪烁计数器中测定其放射性，以每分钟脉冲数(CPM)表示。细胞活力用实验管平均 CPM－对照管 CPM 来表示。

1.4 统计学分析

所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及均数间两两比较。

2 结果

2.1 脐血采集量，密度梯度分离前后脐血有核细胞数

10 例脐血标本，脐血采集量为(35～120)(75±23.5)ml。有核细胞计数为(0.61～2.42)(1.46±0.66)$\times 10^7$/ml，有核细胞总数为(0.45～2.2)(1.07±0.59)$\times 10^9$。经比重为 1.080 的 Percoll 分离液离心分层后的有核细胞回收率为(29.8±9.6)%。

2.2 四种冻存方案对脐血 MNC 回收率的影响

见表 1。

表 1 不同冻存方案对脐血 MNC 回收率的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of different cryoprotectants on cord blood MNC recovery rate(%，$\bar{x}\pm s$)

Group	n	30 d	60 d	90 d
CP-1	10	75.0±8.8	73.9±7.3	75.5±7.3
CP-2	10	82.6±6.1 *	81.7±6.4 *	83.4±6.3 *
F68	10	60.6±9.4 **△△	62.3±7.3 **△△	61.3±8.9 **△△
DMSO	10	71.1±6.6△☆	69.7±6.6△☆	70.9±7.0△☆

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* CP-1；△：$P<0.05$；△△：$P<0.01$ *vs* CP-2；☆：$P<0.05$ *vs* F68

脐血经四种不同冻存方案冻存/复苏后，方差分析显示不同分组间的脐血 MNC 回收率的差异具有显著性，不同时相间的差异不具显著性。脐血 MNC 回收率以 CP-2 组为最高，与其余三组比较差异具有显著性，CP-1 组与 DMSO 组相比，差异不显著，单用 F68 组的 MNC 回收率最低，与其余各组比较差异均具有显著性。

2.3 四种冻存方案对脐血 MNC 台盼蓝拒染率的影响

脐血 MNC 经冻存/复苏后的台盼蓝拒染率，结果见表 2。方差分析显示不同分组间的差异具有显著性，不同时相间的差异不具有显著性。同一时相不同组间的均数两两比较显示 CP-1、CP-2 及 DMSO 组间差异不具显著性，3 组均较 F68 组的细胞活力高，差异具有显著性。

表 2 不同冻存方案对脐血 MNC 台盼蓝拒染率的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of different cryoprotectants on cord blood MNC typan blue exclusion(%，$\bar{x}\pm s$)

Group	n	30 d	60 d	90 d
CP-1	10	91.0±7.1	91.9±6.1	91.6±5.7
CP-2	10	93.1±8.1	92.8±5.8	92.5±5.1
F68	10	67.7±10.9 **△△	68.3±11.5 **△△	69.8±13.4 **△△
DMSO	10	88.7±5.9☆☆	89.6±5.5☆☆	88.4±7.2☆☆

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* CP-1；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* CP-2；☆：$P<0.05$，☆☆：$P<0.01$ *vs* F68

2.4 四种冻存方案对脐血不同集落回收率的影响

脐血 MNC 经冻存/复苏后的各种集落的回收率，结果见表 3。方差分析显示不同分组间的差异具有显著性，不同时相间的差异不具有显著性。CFU-GM 回收率以 CP-2 组为最高，与其余三组之间差异具有显著性。CP-1 与 DMSO 组间差异不具显著性。F68 组的 CFU-GM 回收率最低。对于 BFU-E 回收率，CP-1 组与 CP-2 两组的差异不显著，CP-2 组与 DMSO 两组间的差异具有显著性，DMSO 组与 CP-1 组间的差异不具显著性，与 F68 组间差异具有显著性。90 d 内，同一种保护方案、不同时相间的脐血 CFU-GM 回收率、BFU-E 回收率的差异不具显著性。

表 3 不同冻存方案对脐血 CFU-GM 及 BFU-E 回收率的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of different cryoprotectants on cord blood CFU-GM and BFU-E recovery rate(%，$\bar{x}\pm s$)

Group	n	30 d	60 d	90 d
CP-1	CFU-GM	60.8±10.1	60.3±9.9	61.6±10.1
	BFU-E	63.5±9.4	65.5±11.9	64.6±11.3
CP-2	CFU-GM	68.7±5.1 *	67.4±8.4	68.8±7.9 *
	BFU-E	72.2±10.9	73.4±7.9	70.9±7.3
F68	CFU-GM	45.4±7.2 **△△	45.7±7.9 **△△	44.5±8.3 **△△
	BFU-E	47.1±11.0 *△△	47.4±11.2 *△△	49.9±8.4 *△△
DMSO	CFU-GM	56.0±8.8△☆	55.2±7.3△☆	54.8±8.8△☆
	BFU-E	59.7±11.7△☆	60±12.8△☆	60.1±9.1△☆

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* CP-1；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* CP-2；☆：$P<0.05$ *vs* F68

2.5 四种冻存方案对脐血 ^{3}H-TdR 掺入率的影响

表 4 示脐血造血细胞经冻存/复苏后的 ^{3}H-TdR 掺入率变化。经方差分析表明，CP-2 组较 CP-1 组的 ^{3}H-TdR 掺入率高，除第 30 天外，差异具有显著性。CP-2 组较 F68 及 DMSO 组的 ^{3}H-TdR 掺入率高，差异具有显著性。DMSO 组较 F68 组的 ^{3}H-TdR 掺入率高，差异具有显著性。CP-1 与 DMO 组之间的差异不具显著性。在 90 d 内，同一种保护方案、不同时相间的 ^{3}H-TdR 掺入率差别不显著。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 4　不同冻存方案对脐血 MNC ^{3}H-TdR 掺入率的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of different cryoprotectants on cord blood MNC ^{3}H-TdR incorporation(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	30 d	60 d	90 d
CP-1	5	3 268.0±655.5	2 933.6±422.9	2 716.1±337.3
CP-2	5	3 874.8±426.8	3 604.5±362.8 *	3 528.3±448.1 *
F68	5	1 362.8±250.7 **△	1 413.4±166.1 **△△	1 393.9±412.4 **△△
DMSO	5	2 842.9±826.1△☆	2 581.1±615.6△☆☆	2 588.5±633.9△☆

*: $P<0.05$.　**: $P<0.01$ *vs* CP-1; △: $P<0.05$; △△: $P<0.01$ *vs* CP-2; ☆: $P<0.05$. ☆☆: $P<0.01$ *vs* F68

3　讨论

造血干细胞冻存是脐血库存的的重要环节之一。近年来造血细胞的低温保存研究方兴未艾, 冻存保护剂的研究是其中的热点。造血干细胞冻存的关键主要在于选择合适的冻存保护剂, 合适的冻存方法, 及适宜的冻存温度。此外, 冻存时间、冻存容器、冻存细胞的浓度等对于造血细胞的回收率亦有不同程度的影响[4]。尽管目前已建立了较好的造血干细胞的冻存方法, 但不同来源的造血干细胞对冻存的条件可能具有差异, 要求进一步改进冻存方法, 以提高冻存质量, 获得最佳的造血细胞回收率[5]。

脐血造血细胞的冷冻保存与骨髓及外周血造血干细胞的冷冻保存方法基本相同, 但对脐血冷冻保存的要求更为严格。因为脐血本身造血干细胞含量相对少, 要尽量减少冷冻所引起的造血干细胞丢失; 其次, 脐血冻存时间通常比骨髓及外周血时间要长, 至少要保证 3～5 年; 此外, 还要尽量地减少冻存体积。因此, 要求冻存设备、冷冻保护剂及操作方法绝对可靠。

造血细胞进行低温保存多联合采用穿透性保护剂及非穿透性保护剂, 以发挥两者的协同作用, 可以长期保存造血干细胞的造血潜能[6～8]。文献报道采用联合冷冻保护剂保存于－80 ℃条件下, 可以不经程控降温, 造血干细胞的活性可以在 1 年内无明显下降。目前国内外研究较多的冻存保护液是含有 HES 及 DMSO 的保护剂。

F68 为新型的大分子非离子型表面活性剂, 属于非穿透性细胞保护剂之一。平均分子量为 8 400, 范围在 2 000～15 000, 为聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物, 为优良的高效增溶剂, 乳化剂, 无毒, 无抗原性, 无刺激性, 无溶血性, 化学性质稳定, 是目前能应用于人体注射的唯一人工合成增溶剂和乳化剂, 文献报道用于冷冻保护的浓度为 100 g/L。F68 低温保护作用的研究较少, 国外曾有用于红细胞的低温保护的研究, 但尚未见用于造血干细胞低温保存的研究报告。本实验采用终浓度为 10%F68 溶液对脐血造血细胞进行冻存, 经冻存 90 d 后复苏, 脐血的 MNC 回收率、CFU-GM 回收率及台盼蓝拒染率分别达到(61.3±8.9)%, (44.5±8.3)%, (69.8±13.4)%, 证实 F68 对脐血造血细胞具有较好的低温保护作用。但在相同实验条件下, 上述三项指标均低于含有 DMSO 的其余 3 组, 且反映脐血细胞活力的各项指标均较低, 说明单用 F68 对脐血造血细胞尚不能达到理想的冻存保护效果。

低温冻存和复苏过程对造血细胞的活力有一定的损伤, 集落形成试验及^{3}H-TdR 掺入率试是目前较为敏感的检测细胞活力的方法[4]。本研究利用上述方法对经 F68 保护体系冻存的脐血活力进行了测定, 并与目前通用的冷冻保护液二甲亚砜及 CP-1 进行了对比研究。结果表明: F68 对脐血造血细胞具有明显的冷冻保护作用, 与 DMSO 合用后具有协同保护效果, 联合 F68 的低温保护体系在冻存 90 d 后的 MNC、CFU-GM 的回收率及台盼蓝拒染率分别达到(83.4±6.3)%, (68.8±7.9)%, (92.5±5.1)%, 优于目前通用的细胞冻害保护液 CP-1 及 DMSO。脐血在 90 d 的保存期内活力无明显下降, 说明这一冻存保护体系的成份是合适的, 该冻存体系的优点是既对造血细胞具有理想的冻存效果, 又降低了 DMSO 的浓度, 减轻了 DMSO 的毒副作用。本项研究亦表明, 该保护体系适用-80 ℃非程控的降温方法, 因而还具有简化冻存操作过程及降低费用的优点。F68 对细胞的冷冻保护机制不清, 可能类似于 HES, 可降低细胞的表面张力, 可能对细胞膜的柔韧性及流动性有一定影响, 促进冷冻所致的质膜破裂的密合[5,9], 但具体机制尚须进一步研究。

本研究在国内外首次应用 F68 作为造血干细胞的冻存保护剂, 为以后的临床应用提供了依据。但该方案对造血细胞的长期冻存保护效果及冻存保护机制尚有待进一步研究。此外有报道 F68 可致高脂血症, 另外可引起补体及白细胞一过性下降, 并对中性粒细胞的功能有一定影响, 故临床应用前须进一步观察其不良反应。

参考文献:

[1] Thierry D, Hervatin F, Traineau R, *et al*. Hematopoietic progenitors cells in cord blood[J]. Bone Marrow Transplant, 1992, 9(Suppl 1): 101－105.

[2] 张林生, 陆道培. 脐血造血细胞分离和冻存的研究[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(6): 495－497.

[3] 张洪泉, 沈伯均. 氚-胸腺嘧啶核苷掺入率对骨髓造血细胞低温保存效果的评价[J]. 中华器官移植杂志, 1994, 15(1): 64－66.

[4] Valeri C R, Pivacek L E. Effects of temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on *in vitro* measurements on human peripheral blood mononuclear cells[J]. Transfusion, 1996, 36(4): 303－308.

[5] Gao D Y, Chang Q, Liu C, *et al*. Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitor cells. I: Osmotic characteristics and volume distribution[J]. Cryobiology 1998, 36(1): 40－48.

[6] Kobylka P, Ivanyi P, Vriesendorp B S. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells[J]. Transplantation, 1998, 15, 65(9): 1 275－1 278.

[7] Broxmeyer H E, Cooper S. High-efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(Suppl 1): 45－53.

[8] Mugishima H, Harada K, Chin M. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood[J]. Bone Marrow Transplant, 1999, 23(4): 395－396.

[9] Togo T, Alderton J M, Bi G Q, *et al*. The mechanism of facilitated cell membrane resealing[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 5): 719－731.

（编辑　张　宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net