DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.032
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1321-03

论著

外周血干细胞收集物中有核细胞成分分析

宫立众[1],张茂宏[2],徐从高[2] ([1]第三军医大学附属西南医院血液内科,重庆 400038;[2]山东医科大学附属医院血液病研究室,济南 250012)

提 要:目的 探讨癌症患者用环磷酰胺(CTX)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员后,外周血干细胞收集物的成分及数量。方法 21例诊断明确的癌症患者,男15例,女6例,平均年龄30.1岁(19~62岁)。动员方案为:CTX 4.0 g/m^2,同时碱化、水化,应用美司那和别嘌呤醇,在WBC降至最低点时,开始应用G-CSF(惠尔血)150 μg/d,当WBC≥10.0×10^9/L或MNC≥2.0×10^9/L或CD34$^+$细胞≥30×10^6/L时,用Fenwal CS 3000 PLUS连续式血细胞分离机分离单个核细胞,通过瑞氏染色和荧光标记单克隆抗体流式细胞仪分析干细胞收集物细胞成分和比例。当收集CD34$^+$>2×10^6/kg时停止采集。结果 T淋巴细胞、NK细胞、粒细胞、B淋巴细胞、单核细胞、CD34$^+$细胞所占的比例分别为56.75%、14.50%、10.89%、7.32%、7.29%、2.18%。结论 外周血干细胞收集物成分复杂、多样,T淋巴细胞、NK细胞是干细胞收集物的主要成分。有待开发干细胞收集物多种成分的潜在用途。

关键词:环磷酰胺;粒细胞集落刺激因子;外周血干细胞收集物
中图法分类号:R446.11;R730.2 文献标识码:A

Analysis of neucleated cell components in peripheral blood stem cell collections

GONG Li-zhong, ZHANG Mao-hong, XU Cong-gao (Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the nucleated cell component of peripheral blood stem cell collections in cancer patients mobilized by cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Methods A total of 21 cancer patients, with average age of 30.1 years old (range 19—62), 15 males and 6 females, were enrolled in this study. Mobilization regimen included CTX 4.0 g/m^2 and 150 μg/d G-CSF (Filgrastim) was carried out when white blood cell count reached nadir. Whole blood cell count was taken everyday. Stem cell collection by Baxter CS3000 PLUS separator began when WBC≥10.0×10^9/L, or MNC ≥2.0×10^9/L, or CD34$^+$ cell≥30×10^6/L. Nucleated cells were analysed with Wright stain and fluorescein-labelled monoclonal antibody flow cytometry technique. Stem cell collection stopped when CD34$^+$ cells were more than 2×10^6/kg. Results T lymphocytes, NK cells, granulocytes, B lymphocytes, monocytes, and CD34$^+$ cells 56.75%, 14.50%, 10.89%, 7.32%, 7.29%, 2.18% were respeclively. Conclusion A lot of hematopoietic cell component can be found in peripheral blood stem cell collection. T lymphocytes and NK cells are the main components. CD34$^+$ cell takes very small part of the collection. Something need to be done to explore the potential clinical application of pheripheral blood stem cell graft.

Key words: cyclophosphamide; recombinant human granulocyte colony stimulating factor; peripheral blood stem cell graft(collection)

外周血干细胞移植(Peripheral blood stem cell transplantation,PBSCT)因造血恢复快,并具有安全、简单、有效、肿瘤细胞污染少、适应症广、所需费用低等优点,已在放、化疗敏感肿瘤治疗中广泛应用,并有逐渐取代骨髓移植的趋势。为使PBSCT后造血快速持久重建,一般需收获动员后单个核细胞(Mononuclear cell, MNC)>4×10^8/kg[1],CD34$^+$细胞至少为2×10^6/kg[2],CD34$^+$细胞占干细胞收集物的比例小于5%,其余95%细胞成分仅仅随着造血干/祖细胞输入体内而已。因此,有必要了解干细胞收集物中绝大部分细胞成分的比例和数量,为进一步开发利用细胞收集物的细胞成分打下基础。为此,我们通过瑞氏染色、单克隆抗体荧光标记流式细胞术分析干细胞收集物成分的组成、比例和数量,现报告如下。

1 病例与方法

1.1 病例

21例诊断明确的癌症患者,包括11例非何杰金淋巴瘤,1例何杰金病,3例乳腺癌,2例急性非淋巴细胞白血病完全缓解期病人,2例急性淋巴细胞白血病完全缓解期病人,2例慢性髓性白血病慢性期病人。男15例,女6例,平均年龄30.1岁(19~62岁)。

1.2 动员方案

CTX 2.0 g/m^2+生理盐水500 ml,静脉滴注,连续2 d。同时水化、碱化,应用恩丹西酮、别嘌呤醇、美司那。在WBC计数达最低点时或WBC<1.0×10^9/L时,开始皮下注射rhG-CSF(Filgrastim,日本麒麟公司)150 μg/d,直至完成采集外周血干细胞。

1.3 外周血干细胞采集时机

当WBC≥10.0×10^9/L或MNC≥2.0×10^9/L或CD34$^+$细胞≥30×10^6/L时,采集外周血干/祖细胞。

1.4 外周血干细胞采集方法

建立静脉通道,用Baxter公司生产的Fenwal CS 3 000 Plus连续式血细胞分离机,选用程序8基础研究收集程序(Baseline cell collection)的外周血干细胞收集程序(外周血单个核细胞收

作者简介:宫立众(1966—),男,河北省巨鹿县人,博士,主治医师,讲师,主要从事血液病临床及外周血造血干细胞移植方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755395

收稿日期:2001-03-13;修回日期:2001-10-25

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

集运行程序),根据 HCT 选择地址 68 参数,根据 MNC 选择地址 71 参数,流速 50~60 ml/min,1 600 r/min,循环处理总血量 7 000~10 000 ml,分离持续时间 120~180 min 不等,全血与抗凝剂(ACD-A 方)之比为 10∶1。当收集量超过 50 ml 时停止当日单采。当收获 $CD34^+$ 细胞≥2.0×10^6/kg 时,停止单采。

1.5 瑞氏染色

取少量干细胞收集物加等量的血清,制片,风干,常规瑞氏染色,油镜下计数形态可辨认阶段细胞比例。

1.6 干细胞收集物流式细胞术分析

取干细胞收集物 10^6 有核细胞,加入标记的单克隆抗体(CD4-FITC/CD8-PE/CD3-Cy5,$CD13^+$-PE,IMMUNOTECH 公司产品;CD3-FITC/CD16CD56-PE,CD20-FITC,BECTON-DICKINSON 公司产品;CD34-PE,PHARMINGEN 公司产品),混匀,避光放置 30 min。加入溶血素(FACS lysing solution,BECTON-DICKINSON 公司)破坏红细胞,洗涤后,上流式细胞仪(FACS Vantage,BECTON-DICKINSON 公司)测试 10^6 细胞,计算 $CD34^+$、CD3-$CD16^+CD56^+$、$CD3^+$、$CD8^+$、$CD4^+$、$CD20^+$、$CD13^+$ 细胞等的比例。根据各种细胞所占的比例,计算出所采某种细胞绝对值,结果以每公斤细胞数表示。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 外周血干细胞收集物成分及比例见图 1

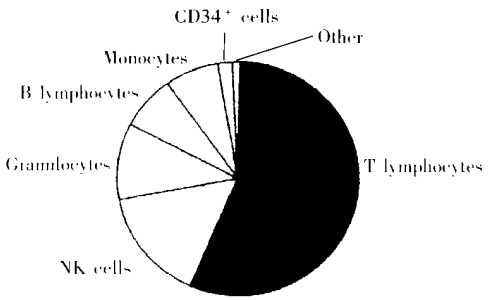


图1 外周血干细胞收集物成分及比例

Fig 1 Component and ratio of PBSC collection

2.2 T 淋巴细胞

T 淋巴细胞所占比例平均为(56.75±15.01)%,范围 38.88%~83.23%,其中 $CD4^+$ 细胞占(27.72±10.32)%,范围 9.42%~45.92%,$CD8^+$ 细胞(27.52±8.68)%,范围 15.11%~42.36%,$CD4^+/CD8^+\approx1$。T 淋巴细胞绝对数(167.77±88.40)$\times10^6$/kg,范围为(47.36~429.38)$\times10^6$/kg,其中 $CD4^+$ 细胞为(79.02±39.43)$\times10^6$/kg,范围(28.16~188.13)$\times10^6$/kg,$CD8^+$ 细胞为(79.36±48.98)$\times10^6$/kg,范围(20.48~219.46)$\times10^6$/kg。

2.3 NK 细胞

NK 细胞占收获细胞的(14.50±7.58)%,范围 5.25%~35.04%。NK 细胞绝对数为(35.04±20.28)$\times10^6$/kg,范围(7.68~77.27)$\times10^6$/kg。

2.4 粒细胞

占收获有核细胞的(10.89±4.58)%,范围 4.31%~21.12%,绝对数为(32.19±10.19)$\times10^6$/kg,范围(11.34~67.64)$\times10^6$/kg。

2.5 B 淋巴细胞

占收获有核细胞的(7.32±3.12)%,范围 2.07%~13.11%,绝对数为(16.86±13.38)$\times10^6$/kg,范围(4.10~45.35)$\times10^6$/kg。

2.6 单核细胞

占收获有核细胞的(7.29±7.71)%,范围 0.30%~37.90%,绝对数为(19.25±22.61)$\times10^6$/kg,范围(2.84~92.10)$\times10^6$/kg。

2.7 $CD34^+$ 细胞

占收获有核细胞的(2.18±2.44)%,范围 0.62%~11.06%,绝对数为(7.81±10.07)$\times10^6$/kg,范围(2.02~47.40)$\times10^6$/kg。

3 讨论

T 淋巴细胞表达 $CD3^+$ 抗原,$CD3^+$ 细胞占干细胞收集物细胞的 56.75%,是最多的细胞成分,类似化疗+G-CSF 动员后,干细胞收集物中 $CD3^+$ 细胞占 52.1%(34.7%~60%)[3]。这与血中 T 淋巴细胞占 MNC 主要部分一致。外周血干细胞收集物中的 T 淋巴细胞是骨髓收集物中的 7~10 倍[4,5],众所周知,T 淋巴细胞在免疫应答中起着重要的作用,输入如此多的 T 淋巴细胞,对患者的免疫重建会有什么作用?T 淋巴细胞中,有细胞毒 T 淋巴细胞,能否开发此种细胞的抗肿瘤作用,如淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)等。进行异基因外周血干细胞移植,输入大量 T 淋巴细胞,可以减少移植物排斥,加快免疫恢复,增加移植物抗肿瘤效应。

NK 细胞是干细胞收集物中第二细胞成分,有人报道,癌症患者动员后(CTX+G-CSF),连续单采 5 d 共收获的 NK 细胞达 132×10^6/kg[6],G-CSF 动员正常人收获的 NK 细胞为 34×10^6/kg,比骨髓收集物中的 NK 细胞多 20 倍[4]。加入 IL-2 后,NK 活性会明显增加,100 U/ml 时 NK 细胞可以扩增 5.4 倍[6],这提示干细胞收集物中有 LAK 前体细胞。在体外,利用干细胞收集物大量扩增 NK 细胞可行的。

$CD34^+$ 细胞是我们最主要的目的细胞,仅占细胞成分的 2.18%。一定量的 $CD34^+$ 细胞,对造血快速持久重建非常重要。$CD34^+$ 细胞有广泛的应用前景,首先可用 $CD34^+$ 细胞扩增造血干/祖细胞以缓解 $CD34^+$ 细胞数量的不足。其次外周血中的 $CD34^+$ 细胞亦是基因治疗的良好载体,是良好基因转染的靶细胞。$CD34^+$ 细胞亦可用来扩增 NK 细胞[7]、树突状细胞[8] 等抗肿瘤活性细胞,为进行肿瘤的生物治疗开辟新途径。

参考文献:

[1] Koc O N, Gerson S L, Phillips G L, *et al*. Autologous $CD34^+$ cell transplantation for patients with advanced lymphoma: effects of overnight storage on peripheral blood progenitor cell enrichment and engraftment[J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 21(4): 337—343.

[2] Weaver C H, Schwartzberg L S, Birch R, *et al*. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of cyclophosphamide, etoposide, and granulocyte-colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients [J]. Transfusion, 1997, 32(9): 896—903.

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

[3] Bengala C, Pazzagli I, Tibaldi C, *et al*. Mobilization, collection and characterization of peripheral blood hemopoietic progenitors after chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and granulocyte-colony stimulating factor administered to patients with metastatic breast carcinoma[J]. Cancer, 1998, 82(5): 867—873.
[4] Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, *et al*. G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft[J]. Br J Haematol, 1994, 87(3): 609—613.
[5] Korbling M, Huh Y O, Durett A, *et al*. Allogeneic blood stem cell transplantation: Peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cell ($CD34^+Thy\text{-}1^{dim}$) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease[J]. Blood, 1995, 86(7): 2 842—2 848.
[6] Silva M R G, Parreira A, Ascensao J L. Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: condition for in vitro expansion[J]. Exp Hematol, 1995, 23(14): 1 676—1 681.
[7] Takenaka K, Mizuno S, Harada M, *et al*. Generation of human natural killer cells from peripheral blood $CD34^+$ cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor[J]. Br J Haematol, 1996, 92(4): 788—794.
[8] Siena S, Di Nicola M, Bregni M, *et al*. Massive *ex vivo* generation of functional dendritic cells from mobilized $CD34^+$ blood progenitors for anticancer therapy[J]. Exp Hematol, 1995, 23(14): 1 463—1 471.

（编辑 冯崇英）

文章编号：1000-5404(2001)11-1323-01

个案与短篇

移植肾破裂的护理

Nursing of rupture of transplanted kidney

王安静，方 丽，卢 宇，张 萍 （第三军医大学附属新桥医院肾病中心，重庆 400037）

移植肾破裂是同种异体肾移植术后早期严重并发症，发病率国内报告为 3.5%～6%[1]，如观察不及时，处理不当可导致肾严重损害甚至出现生命危险，我院从 1978-01—2000-01 共行同种异体肾移植手术 1026 例，发生移植肾破裂 15 例，发生率为 1.5%。

1 临床资料

本组 15 例，男 9 例，女 6 例，年龄平均 23～49 岁，均为同血型尸体供肾。淋巴细胞毒试验均＜10%，术后应用强的松、硫唑嘌呤、环孢素 A 等治疗，移植肾破裂时间在术后 2 周内，行手术探查 12 例，9 例保留移植肾，3 例切除移植肾，另外 3 例出血量少，经保守治疗后痊愈。

2 移植肾破裂原因分析

一般认为，移植肾破裂是移植肾排斥反应的并发症。急性排斥反应是移植肾破裂的主要因素。术后 2 周是急性排斥反应的高发期，本组行手术探查 12 例中有 6 例为急性排斥反应，其中 3 例行移植肾切除，保守治疗 3 例均有急性排斥反应表现，由急性排斥反应所致者占 75%。支持排斥反应是移植肾破裂最主要的病理基础[2]。排斥反应时移植肾有不同程度的肿大、水肿，组织脆弱，当肾内压力增加，如活动、咳嗽、排便等使腹压增加或血液透析肝素化后极易破裂。此外，供肾摘取过程和移植手术造成的缺血性损害、尿路梗阻及供肾过度灌洗或灌注压力过高均可使肾组织反应性水肿破裂，移植肾静脉引流不畅，吻合口狭窄、髂静脉扭转、肾静脉血栓形成亦可造成移植肾压力过高。在腹压增加时，移植肾受力不均，导致受力小的地方发生破裂。本组未行肾包膜切开者的 1.5% 与包膜切开组 0.42% 比较，有显著差异。因此我们认为肾包膜未行切开也是移植肾发生破裂的重要因素。

3 对策

3.1 预防

常规切开肾包膜以减少张力是预防移植肾破裂的有效措施[3]。摘取供肾时要缩短缺血时间，防止过度灌洗或灌注压力过高，修肾时严防损伤血管内膜以免发生静脉血栓，保证肾静脉吻合口通畅，避免肾静脉扭曲，术后合理应用免疫抑制剂，及早发现和正确处理急性排斥反应是十分必要的。急性排斥反应期加强生活护理、防止剧烈活动和咳嗽，保持大便通畅，减少其它使腹压增高的因素对预防移植肾破裂均有重要意义。

3.2 严密观察病情

移植肾破裂主要表现为肾移植区突然巨痛，并逐渐肿胀、隆起、少尿和血尿、手术切口或引流口有鲜血流出。同时伴有血压下降、脉搏增快，大汗等。此时严密观察生命体征，尤其是血压、疼痛的变化，观察有无出血性休克的表现，以及做好抢救准备。

3.3 正确处理

一旦发现有移植肾破裂征兆时，立即绝对卧床，禁止活动，交叉合血，留置尿管，建立静脉通道。出血量多时，快速补液、输血，并做好手术探查准备。有休克时，必须在纠正休克的同时进行手术止血。对移植肾功能差、出血量大、休克严重者，应果断切肾，以保全病人生命。对出血量较少、肾功能好、血压下降不明显者，可保守治疗。

关键词：同种异体肾移植；并发症；排斥反应
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 夏穗生 主编. 器官移植学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1995. 166.
[2] 刘少鸽，李慎勤，李香铁，等. 移植肾实质自发性破裂 8 例报告[J]. 临床泌尿外科杂志，1993，8(4)：214—215.
[3] 张先有，谢 桐. 肾移植后急性外科并发症的发生及防治[J]. 中华器官移植杂志，1993，14(2)：59—60.

（编辑 陈聪连）

作者简介：王安静(1965—)，女，重庆市人，主管护师，主要从事器官移植方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)65200281

收稿日期：2000-07-14；修回日期：2001-05-25

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