DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.012

脐血造血细胞分离和冻存的研究

张林生 陆道培* (第三军医大学附属西南医院血液内科) 重庆,630038

提 要 用6%羟乙基淀粉沉淀、比重1.077~1.080的Ficoll-泛影葡胺及比重1.080的Percoll分层分离脐血有核细胞,发现以比重1.080的Percoll分层后粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)回收率最高,可达104%。随全血加入培养体系中的少量血浆会明显影响CFU-GM回收率的计算。6例脐血用不同保护剂及降温方法冻存证明-70℃冰箱降温效果接近甚至优于程控降温。结果表明,用Percoll 1.080分层后细胞-70℃冰箱降温冻存,可作为现阶段较为理想的大规模库存脐血造血细胞的方法。

关键词 脐血;造血细胞;冷冻保存

中图法分类号 R329.24

人白细胞抗原不完全相合兄弟间及无血缘关系供受者间的脐血移植已经取得成功。这种来源广泛、取材方便的造血细胞可能最终解除人类干细胞移植的供体来源之忧。但其先决条件是要有足够容量的脐血造血细胞库。本研究分析浓缩有核细胞的不同方法对脐血造血细胞的影响及脐血冻存与复苏方法对造血细胞损伤的情况,为大规模库存脐血造血细胞打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

脐血47例,按Broxmeyer等[1]介绍的方法进行收集;成人骨髓11例,取自骨髓移植供者。二者均用15 u/ml肝素抗凝。

1.2 实验方法

1.2.1 脐血有核细胞的分离 6%羟乙基淀粉(HESPAN®,美国Dupont Pharma产品)2次沉降红细胞按张洪泉等[2]介绍的方法进行。比重1.077和1.080的Ficoll-泛影葡胺及比重1.080的Percoll(Pharmacia)密度梯度离心分层为实验室常规单个核细胞悬液制备方法。吸取中间白细胞层时保证尽量完全地吸入所有细胞。

1.2.2 造血祖细胞培养 10 d CFU-GM琼脂体系培养按文献[3]的方法,体系内含粒单集落刺激因子(GM-CSF, Leucomax) 40 ng/ml,有核细胞2×10⁵/ml。用全血作培养时,计数前滴入3%醋酸可使集落清晰突出。14 d CFU-GM,红系爆增性集落形成单位(BFU-E)和粒系、红系混合集落形成单位(CFU-GEM),粒系、红系、巨核系混合集落形成单位(CFU-GEMM)甲基纤维素体系培养按文献[4]的方法进行。

1.2.3 脐血细胞的冻存 全血冻存时把脐血与20% DMSO按1:1混匀后分装2支冷冻保存管,其一加入肝素50 u/ml。分层后细胞的冻存分别用10% DMSO+10%人AB血清-RPMI-1640或6%羟乙基淀粉(MW 150000)+4%人血白蛋白+5% DMSO的冷冻保护剂,混匀后各分装2支冷冻保存管,一组置程控降温冷冻仪,4℃平衡5 min,1℃/min降温至-50℃,5℃/min降温至-100℃,取出置液氮液相中保存。另一组直接置-70℃冰箱,12 h后移至液氮液相中保存。

1.2.4 脐血细胞的复苏 标本保存1个月以上后取出复苏。在40℃水浴中摇震快速融化后,按冷冻前的细胞浓度计算,稀释至2×10⁶/ml,直接按10%比例(终浓度1×10⁵/ml)加入培养体系中,培养完毕作有核活细胞计数。

1.2.5 统计学方法 祖细胞产率及回收率的比较用配对或非配对计数资料t检验。资料不呈正态分布时用Wilcoxon检验。

2 结果

2.1 脐血有核细胞分离对造血细胞的影响

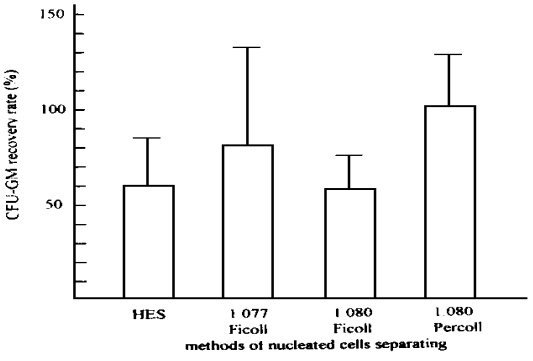
2.1.1 脐血血浆对自身细胞CFU-GM培养的影响 用0.4 ml自身脐血血浆代替0.4 ml的400 ng/ml GM-CSF作为刺激因子进行CFU-GM培养,每10⁵细胞产率为12.17±14.07,GM-CSF刺激组产率为6.75±4.04,两组差异无显著性。说明自身血浆至少含有相当于400 ng/ml生白能的GM-CSF活性。在全血或全骨髓CFU-GM培养时,随血液或骨髓细胞也加入了少量血浆。分层后细胞悬液作CFU-GM培养时,补充相应量的血浆作校正,26例脐血校正前产率为17.36±41.16,校正后为36.24±66.14,12例骨髓校正前产率为53.84±58.36,校正后为140.36±161.65,骨髓和脐血校正前后差异均有显著性。

2.1.2 不同方法分离浓缩脐血有核细胞时脐血CFU-GM的回收情况 6例脐血同时分别用6%羟乙基淀粉沉淀,比重1.077及1.080的Ficoll-泛影葡胺密度梯度离心分层,比重1.080的Percoll密度梯度离心分层,分离后有核细胞的培养均用血浆校正,所得的CFU-GM回收情况,见附图。可见以比重1.080的Percoll梯度离心分层后回收率较高,且也比较稳定。

* 北京医科大学血液病研究所 北京,100044

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

对脐血和骨髓标本分别用不同的分层液分离有核细胞,分离后用或不用血浆作校正,CFU-GM 回收情况见表 1。用血浆校正后,骨髓细胞经比重 1.077的 Ficoll-泛影葡胺分层平均 CFU-GM回收即超过 100%,脐血则只有比重 1.080的 Percoll分层后并校正时 CFU-GM 回收才能达到 100%左右。其它方法平均回收率均不足 70%。



附图 不同方法分离脐血有核细胞时 **CFU-GM**的回收率

Fig CFU-GM recovery rate of cord blood with different way to separate nucleated cell

表 **1** 不同密度梯度离心分层时脐血和骨髓的 **CFU-GM**回收率

Tab 1 CFU-GM recovery rates by different density separation

Type of density separation	Plasma correction	Cord blood		Bone marrow	
		n	$\bar{x}\pm s$	*n*	$\bar{x}\pm s$
1.077 Ficoll-Urografin	no	12	36.35± 52.15	11	61.05± 42.08
	yes	28	56.85± 52.71	8	112.75± 31.07
1.080 Ficoll-Urografin	no	17	28.71± 30.03	10	33.62± 28.62
1.080 Percoll	no	11	71.14± 55.57	–	–
	yes	29	104.22± 54.16	–	–

2.2 脐血造血细胞的冻存与复苏

预实验证明,复苏后细胞必须用 4℃ 1640液逐步稀释,不洗细胞直接培养,否则将损失大量祖细胞。全血冷冻复苏后 10 d CFU-GM回收仅 (27.97± 12.55)%,加入肝素后增高为 (58.50± 25.35)%,差异有显著性。分层后细胞经冷冻保存后祖细胞的回收情况见表 2。从均数看,-70℃冰箱降温组更好一些。14 d CFU-GM 的回收率-70℃冰箱降温组明显高于程控降温组,差异有显著性 ($P<0.05$)。其余差异都没有显著性。

表 **2** 冷冻复苏后脐血造血祖细胞的回收率 ($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 2 Recovery rate of cord blood progenitors recovery after cryopreservation and thaw ($\bar{x}\pm s$, %)

Progenitor colonies	10% DMSO+ 10% AB serum		6% HES+ 4% Albumin+ 5% DMSO	
	Controlled freezer	-70℃ freezer	Controlled freezer	-70℃ freezer
day-10 CFU-GM	64.24± 21.44	68.73± 28.15	65.44± 32.24	62.94± 29.64
day-14 CFU-GM	52.25± 10.62	74.06± 19.76*	56.32± 20.13	73.62± 18.89*
CFU-GEM	44.24± 31.39	56.50± 43.65	44.06± 33.03	37.73± 17.54
CFU-GEMM	37.52± 35.82	59.19± 53.35	57.36± 34.21	62.83± 34.21
BFU-E	25.44± 21.15	39.65± 25.00	38.94± 35.25	55.70± 39.47

*: $P<0.05$ *vs* controlled freezer

3 讨论

国外一些单位已开始建立以冻存造血细胞为目的的大型脐血库[5],为了缩小每份脐血所占的冻存体积以及减少由红细胞在复苏后溶解和聚集对造血细胞的干扰,去除红细胞并浓缩造血细胞十分必要。Broxmeyer和 Thierry等[1,6]认为,经比重 1.077的 Ficoll-Hypaque分层液分离后脐血祖细胞只有 60%~ 40%的回收率。由于脐血血浆含有丰富的造血刺激活性,本研究对比脐血自身血浆和重组 GM-CSF作刺激因子时脐血细胞 CFU-GM产率发现脐血血浆至少含有相当于 400 ng/ml生白能的造血刺激活性。分层后细胞培养时补充相应全血培养中等量的血浆作校正,也发现脐血的 CFU-GM产率明显提高。文献中未见到类似报告。因此我们认为,在分析脐血有核细胞分离后的 CFU-GM回收率时,不能忽略这少量脐血浆的作用。用 6%羟乙基淀粉,比重 1.077及 1.080的 Ficoll,1.080的 Percoll分离有核细胞,经血浆作校正后,骨髓细胞在 1.077的 Ficoll-泛影葡胺分层时回收率即可达 100%以上,而脐血的 CFU-GM回收率只有在用比重 1.080的 Percoll离心分层后回收率才达 100%。这与 Falkenberg等[7]1993年报告的结果比较接近。但没有张洪泉等[2]报告的那么高。提示脐血造血细胞的确比较脆弱,易受损失。从实际操作来说,祖细胞达到 100%的回收是不可能的,但由于有核细胞分离过程去除了一些抑制祖细胞生长的成分,回收率便可超过

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

100%。Harris等[8]也证明用密度梯度离心分层不象先前报告的那样造成祖细胞的明显损失。因此,用比重1.080的 Percoll密度梯度离心分层是较好的浓缩脐血造血细胞的方法,将有利于大型脐血库的建立与扩展。平均计算,1份脐血有核细胞数约 2× 10^9,回收有核细胞 8× 10^8,可在 20 ml体积内冻存。

造血细胞的冻存保护常规都用 10% DMSO+10% AB型人血清,程控降温,然后投入液氮中保存。近年,合用 DMSO 羟乙基淀粉和白蛋白的保护剂取得了很好的效果[9],并可以直接用 -80℃冰箱降温冻存。本研究发现二者效果没有明显差别。直接在 -70℃冰箱中降温冻存脐血,可避免程控降温的时间消耗和较复杂的操作,是较为理想的大量库存脐血的方法。脐血细胞对复苏后的处理非常敏感,复苏后立即输入患者体内,可以得到血浆和红细胞的保护,可能是保护造血细胞的较好的方法。本研究还发现,如果用全血直接冻存,在冻存剂中加入肝素有利于造血细胞的回收。这一点未见文献中有报告。在分层后细胞冷冻保存时加入肝素是否也可以提高回收率值得进一步探讨。

参考文献

1 Broxmeyer H E, Kurtzberg J, Gluckman E *et al*. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. Blood Cells, 1991; 17(2): 313

2 张洪泉,付曾矩,沈柏均等.脐带血造血细胞的分离与保存.中华血液学杂志,1992; 13(4): 180

3 唐佩弦.粒单系祖细胞.见:唐佩弦,杨天楹主编.造血细胞培养技术.西安:陕西科学技术出版社,1985. 17~29

4 张林生,王逸兰,陆道培.脐血血浆支持体外造血祖细胞培养的研究.中国实验血液学杂志,1996; 4(1): 87

5 Apperley J F. Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 1994; 14(3): 187

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

7 Falkenberg J H, van Luxemberg Heijs SAP, Zijlmans J M *et al*. Separation, enrichment and characterisation of human hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood. Ann Hematol, 1993; 67(5): 231

8 Harris D T. Schumacher M U, Rychlik S *et al*. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. Bone Marrow Transplant, 1994; 13(2): 135

9 Luo K H, Wu G Q, Wang Q L *et al*. Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells. Cryobiology, 1994; 31(3): 349

(收稿: 1996-06-24;修回: 1996-10-09)

(编辑　汪勤俭)

A study of separation and cryopreservation of cord blood hematopoietic cells

Zhang Linsheng, Lu Daopei (Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Cord blood nucleated cell separation and cryopreservation is the major problem in the establishment of large scale cord blood bank for hematopoietic stem cell transplantation. In the present study, cord blood nucleated cells were separated with 6% HESPAN^R sedimentation of red blood cells, Ficoll-Urografin with density gradients of 1.077 and 1.080 and Percoll with a density gradient of 1.080. It was found that the highest recovery rate of 104% of the CFU-GM was seen in those separated with Percoll. A little amount of plasma added to the culture system with the whole blood remarkably affected the calculation of the recovery rate of CFU-GM. Cryopreservation of 6 cord blood samples with different preserving reagents and freezing methods showed that preservation with freezing in a refrigerator at -70℃ was similar or even superior to rate controlled freezing. Therefore, cryopreservation of nucleated cells with Percoll separated with a density gradient of 1.080 in a refrigerator at -70℃ is a simple and effective method for large amount of cord blood banking.

Key words cord blood; hematopoietic cell; cryopreservation

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