

CNIC-01335

SMC-0150

脐血造血干细胞的分离和冻存方法研究*

张占英 张澜生 朱寿彭

(苏州医学院, 苏州, 215007)

摘 要

用人类脐血干/祖细胞代替骨髓移植, 治疗辐射损伤性疾病, 并为核事故受害者的救治建立脐血干细胞库是一重要课题, 而脐血造血干细胞的分离与冻存是建立脐血干细胞库、进行干细胞移植的关键。研究了脐血造血干细胞的分离和冻存方法, 首先用密度梯度离心法以不同比重的淋巴细胞分离液 (Ficoll 液) 分离脐血单个核细胞 (mononuclear cells, MNC), 计数, 并用 CD₃₄ 单抗经流式细胞仪进行表型分析; 然后加冻存保护剂梯度降温, 冻存于液氮中, 再间隔一定时间常规复苏 MNC。采用“三种梯度降温法”、“五种不同细胞浓度”和“两种细胞冻存保护剂”比较了不同条件下脐血 MNC 的分离和冻存效果。结果显示, 使用比重为 1.064 的 Ficoll 液较常规 1.077 所分离的 MNC 中 CD₃₄ 细胞百分数高, 前者约为后者的 3 倍, 但细胞总数较少; 梯度降温以直接放入液氮瓶口内 (液相之上的气相中) 过夜, 次日再置入液氮内 (-196 °C) 低温保存最佳; 细胞浓度以 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 最好; 冻存保护剂以含 10% DMSO, 90% 胎牛血清为宜。

* 国家核工业基金资助课题。

Research on Separation and Cryopreservation of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells

(In Chinese)

ZHANG Zhanying ZHANG Lansheng ZHU Shoupeng

(Suzhou Medical College, Suzhou, 215007)

ABSTRACT

It is an important project to use the umbilical cord blood (UCB) stem/progenitor cells transplantation instead of the marrow transplantation and to set up UCB stem cell bank for treating the victims of nuclear accidents. The key problem is the separation and cryopreservation of UCB stem cells for the bank and the transplantation. The separation and cryopreservation methods of UCB stem cells have been studied. Firstly, the mononuclear cells (MNC) were separated from UCB with density gradient centrifugation by using Ficoll of different densities and detected the MNC phenotype with CD₃₄ MAb by flow cytometry. Thereafter the MNC were added in cryopreservation solution and put into liquid nitrogen for gradient lowering of the temperature, and then recovered routinely after certain time. "Three methods of gradient lowering of the temperature", "five MNC concentrations" and "two kinds of cryopreservation solution" to compare the efficacy of MNC separation and cryopreservation under different conditions were studied. The results showed that Ficoll with density of 1.064 separated more CD₃₄⁺ cells than Ficoll with density of 1.077, and CD₃₄⁺ cells separated by the former were about three times as high as those by the latter. But the former separated less MNC than the latter. The best way of controlling lowering of the temperature was to put it directly in the mouth of a liquid nitrogen freezer (i. e. gas phase above liquid phase), and then to put it in the liquid nitrogen (-196 °C) in the next day morning. The best MNC concentration was 2×10^7 /ml. The cryopreservation solution containing 90% heat-inactivated fetal bovine serum and 10% DMSO was optimal for UCB MNC cryopreservation.

引 言

已知接受 10 Gy 以上全身照射的病人由于出现多系统的不可逆性损伤而不能存活; 低于此剂量, 如果及时给予造血因子和造血干/祖细胞的移植, 可加速病人造血功能恢复, 使之存活。1989 年切尔诺贝利 (Chernobyl) 核电站事故发生后, 遭受全身大剂量照射的几名病人, 都进行了骨髓移植, 但大部分死于急性移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 仅两人存活^[1]。目前认为, 在确定辐射损伤和核事故受害者的造血干/祖细胞严重缺乏时, 给病人移植造血干细胞是最好的策略^[2]。由于相配供体的骨髓找寻难度较大, 而使用脐血和外周血作为造血干细胞的来源日益增多, 它们较骨髓来源的干细胞有些优点, 特别是脐血干细胞的移植前景令人注目。自 1989 年 Gluckman 等在世界上首例用脐血造血干细胞代替骨髓移植治疗 Fanconi 贫血获得成功以来, 全世界已进行了近 500 例的脐血移植^[3]。大量研究表明, 脐血中多能造血祖细胞比例较高, 并含有一定量发育不成熟的前身辅助 T 细胞和前身细胞毒 T 细胞, 这些 T 细胞亚群的发育不成熟表型表达不足, 对同种异体抗原的应答能力较弱, 使得脐血移植后 GVHD 的发生较少而不太严重; 另外由于其免疫学上的不成熟还可使供体和受体 HLA 匹配范围更扩大; 加之脐血容易收集, 能低温长期储备, 达 7 年之久而不失其特性^[4], 急用时可立即获取。所以它是一种能保持具有完全造血细胞特性的产品, 被认为是目前治疗核事故受害者最理想的生物制剂^[2,5]。因此, 为我国和平利用原子能建立脐血干细胞库, 以备放射损伤事故临床移植时急用, 是一项重要的研究课题。近年来, 欧美等国家建立脐血造血干细胞库的科研发展方兴未艾, 我国才刚刚起步。

脐血干/祖细胞能在低温下长期保存, 但容易在降温、复苏及洗涤过程中受到损伤, 特别是在脐血干/祖细胞的分离、浓集过程中, 离心、洗涤、混匀等机械作用也可能引起一定数量的细胞损伤而死亡, 所以目前国内大都使用全血保存方法。然而全血移植时由于大量红细胞和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 的注入, 存在着溶血产物及 DMSO 毒性等有害作用^[6], 其庞大的样本量也将大大增加脐血库的费用。

我们使用 CD₃₄ 单克隆抗体 (monoclonal antibody, MAb)、流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 技术、细胞活体染色及细胞集落形成等方法对脐血 MNC 的分离和冻存条件进行了研究, 其目的是为脐血干细胞建库寻找一种简便、经济和较少损伤细胞活性的脐血造血干细胞的分离和冻存方法。

1 材料与方法

1.1 实验对象

无内外科病症、无传染性疾病、无血液系统疾病、乙肝表面抗原阴性和非高危妊娠的健康孕妇足月顺产的脐带血。标本分别来自苏州医学院附一院、附二院、苏州市妇幼保健院和苏州市第四人民医院产科。

1.2 试剂和方法

1.2.1 主要试剂和细胞株

PRMI1640 (GIBCO)、胎牛血清、CD₃₄MAb (美国生命技术公司); Ficoll 液 (上海试剂二厂); DMSO、泛影葡胺、羊抗鼠 IgG 荧光抗体 (华美生物工程公司)。细胞株 (为国外引进): ①CD₃₄ 标准细胞株——人类急性髓性白血病细胞株 (bone marrow, acute myel-

ogenous leukemia, human); ②CD₃₄标准细胞株——人类红白血病细胞株 (erythroleukemia, human)。

1.2.2 不同比重 Ficoll 液的配制

比重 1.064 的 Ficoll 液用比重 1.077 的 Ficoll 液和 5% 泛影葡胺, 按文献 [7] 配制。

1.2.3 脐血采集与分离

无菌操作下收集健康顺产的产妇脐带血, 在胎儿娩出后 30 s 内、胎盘未娩出前自脐静脉穿刺收集于预先放置抗凝剂的输血袋内。然后经密度梯度离心法分离脐血 MNC, 并计数细胞量。

1.2.4 用 CD₃₄MAb 经间接免疫荧光法对 MNC 进行表型分析

分别将比重 1.064 和 1.077 的 Ficoll 液所分离的 MNC 放入 Appentoff 管 (Nunc) 中, 同时设空白对照管、阳性对照管 (为 CD₃₄标准细胞株) 和阴性对照管 (为 CD₃₄标准细胞株), 分别加入经适当稀释的 CD₃₄MAb, 操作按文献 [8]。最后经免疫荧光显微镜下观察和 FCM 测定, 计算其免疫荧光阳性细胞的百分率。

1.2.5 细胞冻存方法、冻存数量和冻存保护剂

细胞冻存时的三种梯度降温方法为: ① 冰块上操作→4℃→-20℃→液氮瓶口内 (液相上的气相中) 过夜→液氮; ② 冰块上操作→-20℃→液氮瓶口内过夜→液氮; ③ 冰块上操作→液氮瓶口内过夜→液氮。我们冻存的细胞量为: 5×10⁶、10×10⁶、20×10⁶、40×10⁶、80×10⁶/ml 五种。冻存保护液为: ① 10%DMSO、40%胎牛血清、50%1640 培养基; ② 10%DMSO、90%胎牛血清。分别在上述不同条件组合下进行细胞冻存。

1.2.6 细胞复苏及台盼兰染色测定细胞活性

细胞冻存 10 d 后, 从液氮装置内取出常规复苏, 并计数细胞数; 再取少量细胞加入 0.5% 台盼蓝溶液染色, 镜下观察活细胞拒染, 死细胞着色, 在 3~5 min 内观察 200 个细胞, 计算其中台盼蓝拒染细胞出现的频率 (即活细胞百分率)。

2 结 果

2.1 脐血的体积与单个核细胞的计数

本实验所采集的 10 份脐血标本的平均体积为 (99.8±7.3) ml, 最大为 140 ml, 最小为 70 ml; 常规 Ficoll (1.077) 分离的 MNC 计数平均为 (4.15±0.67) ×10⁶/ml, 较用 1.064 Ficoll 分离的 MNC (1.34±0.58) ×10⁶/ml 为高, 其差别有显著性 ($t = 2.79, 0.01 < P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 脐血量与所分离单个核细胞数量分析

观察指标	n	$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	t
脐血量/ml ⁻¹	10	70~140	99.8±7.3	
MNC/10 ⁶ ·ml ⁻¹				
Ficoll 1.064	6	0.73~2.22	1.34±0.58	2.79*
Ficoll 1.077	10	1.36~7.83	4.15±0.67	

* 0.01 < P < 0.05, 差别有显著性; 两组资料均满足正态和方差齐性。

2.2 不同比重 Ficoll 液 (1.064, 1.077) 所分离的脐血 MNC 表型分析

比重 1.064 组 CD₃₄细胞荧光阳性率为 (4.44±0.56)%; 1.077 为 (1.54±0.40)%, 前

者为后者的3倍,两均数相比,其差别有高度显著性($t = 4.2337, P < 0.01$,见表2)。从表2还可看到,两组中CD₄₅荧光阳性细胞数不同,前者最低为2.9%,最高为5.8%,而后者最低为0.3%,最高仅为2.8%。

表2 不同比重Ficoll液所分离的MNC中CD₄₅细胞(%)的比较*

分组	n	$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	t	P
1.064	6	2.9~5.8	4.44±0.56		
1.077	6	0.3~2.8	1.54±0.40	4.2337	<0.01

*两组资料经正态性和方差齐性检验, P 均>0.05。

2.3 三种不同梯度降温方法冻存效果的比较

细胞回收率 = (复苏后的细胞数 ÷ 冻存前的细胞数) × 100%

三种不同的梯度降温方法冻存MNC,经方差分析其细胞回收率之间的差别有高度显著性($F = 64.29, P < 0.0001$,见表3),又经Student-Newman-Keuls检验方法进行组间两两比较发现,方法③分别与方法①、方法②之间有高度显著性差别(Q值为12.65和14.86, P 均<0.001),①与②之间的差别无显著性($Q = 2.21, P > 0.05$),即方法③冻存效果最佳;平均回收率达47.76%±3.44%,最高为65.5%。三组台盼蓝拒染率(%)之间无显著差别($F = 0.95, P > 0.05$)。

表3 三种不同梯度降温方法对MNC的冻存效果比较*

降温方法分组	n	细胞回收率/%		台盼蓝拒染率/%	
		$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
①	9	8.8~21.3	14.07±1.47	83.3~100	92.18±1.85
②	9	15.9~26.8	19.07±1.20	86.0~97.5	91.53±1.18
③	9	31.3~65.5	47.76±3.44	83.5~98.0	94.40±1.52
方差分析			$F = 64.29$		0.95
P			<0.0001		>0.05

*两指标各组数据经Bartlett X^2 检验, P 均>0.05,即各组方差齐性。

2.4 在梯度降温方法③条件下, MNC最佳冻存浓度/ml的研究

冻存五组不同浓度的MNC,复苏后其细胞回收率及台盼蓝拒染率之间均无显著性差别(F 分别为0.78和0.79; P 均>0.05;见表4)。

表4 冻存不同浓度的MNC,复苏后细胞回收率(%)及台盼蓝拒染率(%)分析*

细胞量	n	细胞回收率/%		台盼蓝拒染率/%	
		$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
10 ⁶ /ml					
5	8	53.0~90.6	69.5±5.3	95.0~100	97.4±0.74
10	8	28.0~90.7	55.9±8.0	97.1~100	98.4±0.48
20	8	48.8~75.9	63.3±2.9	92.2~100	96.6±0.89
40	8	25.6~95.5	58.7±9.2	92.8~99.9	96.9±0.81
80	8	19.7~75.9	54.4±7.5	93.9~99.0	97.2±0.83
方差分析			0.78		0.79
P			>0.05		>0.05

*两指标各组数据经Bartlett X^2 检验, P 均>0.05,即各组方差齐性。

2.5 两种不同成分的保护剂对 MNC 冻存效果的影响

对所分离的 MNC, 用两种不同成分的保护剂进行冻存, 由表 3 可见, 保护剂①的细胞回收率为 $(45.2 \pm 3.04)\%$, 范围为 $19.7\% \sim 65.4\%$; 保护剂②为 $(75.6 \pm 2.31)\%$, 最低为 60.3% , 最高为 95.9% ; 两均数间有非常显著的差别 ($t = 7.94, P < 0.001$)。台盼蓝拒染率亦是后者显著高于前者 ($t' = 2.038, 0.01 < P < 0.001$; 见表 5)。

表 5 两种不同成分的保护剂冻存 MNC 其细胞回收率及细胞活性分析

保护剂分组	n	细胞回收率/%*		台盼蓝拒染率/%**	
		$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$X_{\min} \sim X_{\max}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
①	20	19.7~65.4	45.2 ± 3.04	92.2~100	96.5 ± 0.54
②	20	60.3~95.9	75.6 ± 2.31	94.4~100	98.2 ± 0.35
统计量			$t = 7.94$		$t' = 2.038$
P			< 0.001		$0.01 < P < 0.05$

注: * 两组数据经 W 及 F 检验, *P 均 > 0.05 , **W 检验 $P > 0.05$, 而 F 检验 $P < 0.05$, 都用 t 检验。

3 讨 论

目前, 人们受到脐血干细胞移植良好结果的鼓舞和 New York 血液中心领先制定的脐血干细胞研究试行方案的激励, 许多国家已建立起地区或国家的脐血细胞库, 希望为无关供体移植物的存放进行国际联网, 发展成为一个庞大而种族平衡良好的脐血干细胞库。我国随着核电站等核事业的发展, 临床上对脐血移植需求的力度不断加强, 脐血细胞库的建立已成为一个众心所向的研究课题。因而, 目前研究、改进脐血细胞的分离和冻存方法, 就显得尤为重要。下一步则是脐血细胞的扩增、纯化和移植在受体中的存活效应的研究, 便于脐血干细胞长期液氮低温存放, 以备核事故发生后立等可取的应用, 为核事业的发展创造条件。

本研究用比较简便、快速的方法对脐血干细胞的分离、冻存进行了初步探讨。结果显示, 用经典的常规 Boyum 法略加改良, 经密度梯度离心法分离脐带血, 其 MNC 计数为 $(4.15 \pm 0.67) \times 10^6/\text{ml}$, 与文献 [4] 研究结果是一致的, 可见脐带血比骨髓更富含造血干细胞。

Harris 等^[4]和 Broxmeyer 等^[9]各自报道了脐血标本的采集、分离和冻存方法, 他们用输血袋法分别可采集到 50~100 ml 和 42~240 ml, 均数为 110 ml 和 103 ml, 我们均数为 99 ml, 范围为 70~140 ml (见表 1), 看来用一般简单的技术均可采到一定量的脐血。Harris 采用常规分离剂比重 1.077、重复分离两次, 认为第二次分离的 MNC 除去有核和无核的红细胞, 而 Broxmeyer 等则用明胶沉淀法除去红细胞得到单个核白细胞。我们用两种比重的 Ficoll 分离脐血中的 MNC, 发现比重 1.064 分离的细胞经荧光染色后其 CD_{34}^{+} 细胞数为 1.077 分离的 CD_{34}^{+} 细胞的 3 倍 (见表 2), 这可能是比重 1.064 的细胞内含祖细胞较多, CD_{34}^{+} 细胞比例增加所致。因脐血中造血干/祖细胞均为 CD_{34}^{+} 细胞, CD_{34}^{+} 细胞比例较常规分离法增高 3 倍, 此结果提示, 对进一步造血干细胞纯化、增殖和植入受体的成功率可能有明显的促进作用。关于细胞数量较少的问题, 可能是由于比重 1.064 的 Ficoll 分离的有核红细胞较多 (镜下观察结果, 待发表), 红细胞系的细胞膜渗透压较低, 细胞易于溶解, 故在复苏、洗涤过程中丢失之故。

有关细胞冻存问题,降温的步骤是一个关键。我们采用三种不同的降温方法,以复苏后细胞回收率为指标衡量冻存效果(见表3)。由表3可以看出,所采用的梯度降温以③冰块上操作→液氮瓶口内(液相上的气相中)过夜→次日置入液氮内低温保存为最佳,此时细胞回收率和台盼蓝拒染率都较高。无论经4℃或-20℃降温,都可能大大降低细胞回收率(为14.07%和19.07%)影响冻存效果,它们与方法③(47.76%)相比,其差别均有高度显著性(P 均 <0.001 ;见表3)。这一结论与1991年Makino等报道冻存PBSC的冷冻程序和结果基本一致。

我们有关细胞最佳浓度/ml的研究显示,冻存不同数量的MNC,各组的细胞回收率和台盼蓝拒染率均无显著性差异(P 均 >0.05 ;见表4),说明所冻存的细胞浓度(在 $5\times 10^6\sim 80\times 10^6$ 内),不影响复苏后的细胞回收率及台盼蓝活性;但若同时考虑既提高回收率,又尽量减少抽样误差而言,冻存 2×10^7 /ml为宜。对两种冻存保护剂的研究显示,不同成分的保护剂能影响MNC冻存后的数量和活性,以②10%DMSO、90%胎牛血清作冻存保护剂为最好,其细胞回收率平均为76.5%,最高达95.9%,与保护剂①的(45.2%和65.3%)相比,有高度显著性差异(P 均 <0.001 ;见表5)。这可能是胎牛血清不仅含有各种蛋白,而且含有某种胎血中的激素或生长素的缘故,对新生儿MNC有保护作用。此结果与Harris等人的研究相同^[4]。

我们的研究结果将为脐血干细胞建库提供简便、可靠、有效的脐血MNC较高CD₃₄细胞数的分离和冻存方法;有可能在此基础上,随着研究工作的进展将有效地改进方法,为核事故受害者和从事核事业的辐射损伤患者及癌症病人提供更为及时和有效的治疗措施。

参考文献

1. Baranov A, Gale R P, Guskova A, et al. Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. *New Engl J Med*, 1989, 321: 205~212.
2. Frickhofen N, et al. Is blood a better source of allogeneic hematopoietic stem cells after radiation accidents? *Blood Marrow Transplantation*, 1996, 17: 131~135.
3. Cairo M S, et al. Placental and/or umbilical cord blood: An alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*, 1997, 90 (12): 4665~4678.
4. Harris D T, et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1994, 13: 135~143.
5. Grant Rusdon, et al. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cellular Immunology*, 1994, 154: 14~24.
6. Newton, et al. Toward cord blood banking: density-separation and cryopreservation of cord blood progenitors. *Experimental Hematology*, 1993, 21: 671~674.
7. 方瑞衡等编著. 现代医学实验技巧全书. 北京医科大学协和医科大学出版, 1995.
8. Zhang Lanshen, Wan Ninghai. Effect of exogenous and endogenous IL-2 on irradiated human peripheral blood lymphocytes. *China Nuclear Science & Technology Report*. CNIN-00762 SMC-0096. 北京: 原子能出版社, 1993.
9. Broxmeyer H E, et al. Umbilical cord and placental blood hematopoietic stem cells: Collection, cryopreservation, and storage. *J. Hematother*, 1992, 1: 167.