

—80℃非程控降温保存自体外周血干细胞的应用

刘淑均¹ 杨鹏¹ 王莉² 张循善¹ 卞茂红¹

[摘要] 目的:观察—80℃非程控降温保存自体外周血干细胞(PBSC)的应用效果。方法:常规方法动员外周血干细胞,血细胞分离机分离采集干细胞,120 g/L 羟乙基淀粉、体积分数为 10%的 DMSO、体积分数为 10%的 AB 型血浆为冷冻保护剂与干细胞以 1:1 的比例混合,然后直接将其置于—80℃冰箱保存。测定保存前以及保存后不同时间的单个核细胞(MNC)、CD34⁺细胞、粒-单核细胞系集落形成单位(CFU-GM)的回收率以及细胞的台盼蓝拒染率。结果:经非程控直接冷冻保存 15~720 d, PBSC 的台盼蓝拒染率、MNC 回收率的变化较小($P>0.05$),而 CD34⁺细胞、CFU-GM 回收率在冻存 240 d 后下降较明显($P<0.05$),但仍分别达 82.5%、79.6%。21 例患者经相应处理后,回输经—80℃下保存 12~46 d(平均 29 d)的干细胞,患者于干细胞回输后 14~27 d(平均 20.5 d)获得造血功能重建。结论:在采用终浓度为 60 g/L 羟乙基淀粉、体积分数为 5%的 DMSO 及体积分数为 5%的 AB 型血浆组成的冷冻保护剂情况下,—80℃非程控降温法适于 PBSC 的短期(240 d 内)保存,效果理想。

[关键词] 外周血干细胞;非程控降温;冷冻保存

[中图分类号] R457.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)06-0345-03

Study of peripheral blood stem cell cryopreserved at —80℃ non rate-controlled freezing

LIU Shujun¹ YANG Peng¹ WANG Li² ZHANG Xunshan¹ BIAN Maohong¹

(¹ Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, 230022, China; ² Department of Computer, Anhui Medical College)

Corresponding author: ZHANG Xunshan, E-mail: zxs511@sina.com

Abstract **Objective:** To observe the effect of the cryopreservation of human peripheral blood stem cells (PBSC) by —80℃ non rate-controlled freezing. **Method:** We mobilized and collected peripheral blood stem in common methods, froze cells with 120 g/L HES and 10% DMSO and 10% human plasma of AB type without rate-controlled and preserved them at —80℃. Trypan blue viability and recovery rate of mononuclear cells (MNC), CD34⁺ cells, colony-forming unit-granulocyte macrophages (CFU-GM) were detected before and after cryopreservation in different periods. **Result:** Having been cryopreserved from 15 to 720 days at —80℃, there were no statistically significant differences in trypan blue viability and MNC recovery rate ($P>0.05$). Although recovery rate of CD34⁺ and CFU-GM decreased obviously after cryopreservation for 240 days ($P<0.05$), the recovery rate was 82.5% and 79.6%, respectively. After corresponding pretreatment, twenty one patients received transfusion with —80℃ cryopreserved PBSC which had been stored for 12 to 46 days (mean 29 days) and hematological reconstitution was obtained successfully in 14 to 27 days (mean 20.5 days). **Conclusion:** —80℃ non rate-controlled freezing method could be suitable to human PBSC short-term cryopreservation with the cryoprotectant composed of 60 g/L HES and 5% DMSO and 5% human plasma of AB type.

Key words Peripheral blood stem cell; Non rate-controlled freezing; cryopreservation

自体外周血干细胞移植(APBSCT)是治疗急性白血病和对化疗治疗敏感的实体瘤有效的方法之一。APBSCT 的基本过程是首先缓解期动员和采集患者外周血干细胞(peripheral blood stem cells, PBSC)深低温冻存,再回输给经过预处理的患者,使之获得造血重建功能。因此,有效地保存造血干细胞关系到移植的成败。传统的以 10%的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为低温保护剂程序降温、液氮冻存细胞的方法较为复杂、费时,且需购置专用仪器,费用较为昂贵^[1-2],在一

定程度上限制了自体外周血造血干细胞移植的开展。为此我们观察了—80℃冰箱直接冻存外周血造血干细胞的效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

2007-01—2009-05 我院进行自体外周血干细胞移植的 21 例住院患者,其中男 10 例,女 11 例;年龄 14~52 岁,中位年龄 32 岁。非霍奇金淋巴瘤(NHL)8 例;霍奇金淋巴瘤(HD)2 例;多发性骨髓瘤 8 例;急性淋巴细胞白血病 3 例。

1.2 自体外周血干细胞的动员采集

使用重组人集落刺激因子 300 μg/d,皮下注射 5~6 d 后用 COBE Spectra 血细胞分离机行外周

¹ 安徽医科大学第一附属医院输血科(合肥,230022)

² 安徽医学高等专科学校计算机教研室

通信作者:张循善, E-mail: zxs511@sina.com

血干细胞采集术,采集单个核细胞(MNC),采集循环血液量为 8 500~11 000 ml。17 例为 1 次采集,4 例为 2 次采集。采集干细胞终体积为 52~128 ml。

1.3 材料

DMSO(Sigma,美国),羟乙基淀粉(hydroxyethylstarch,HES)(味之素,日本),人 AB 型血浆(合肥市中心血站),右旋糖酐(安徽丰原药业公司)。台盼蓝(上海试剂三厂),冷冻血袋(Baxter,美国)。

1.4 冷冻保护液

保护液中含 120 g/LHES、体积分数为 10%的 DMSO、体积分数为 10%的 AB 型血浆。

1.5 外周血干细胞冷冻保存

用 RPMI1640 培养液稀释干细胞,调整白细胞密度为 $(2\sim4)\times 10^9/L$ 。将低温保护剂缓慢注入外周血干细胞采集袋中,同时轻轻晃动采集袋,使低温保护剂与干细胞充分混合。低温保护剂加入量为重量比 1:1,即 1 份低温保护剂加入到 1 份外周血采集液中。将混匀后的低温保护剂和干细胞混合液装入到 200 ml 弹性塑料袋中,每袋装入量不超过 70 g。 4°C 冰箱平衡 20~30 min 立即置于一 80°C 冰箱,待患者符合移植条件时输注。同时取 1 ml 混合液于灭菌的低温保护管中,每人次留取 8 管,其中 7 管立即置于一 80°C 冰箱中冻存,1 管做冻存前相关检测。外周血干细胞解冻、输注 41°C 水浴中 2 min 内快速解冻复苏,经静脉通道以患者可以耐受的速度快速输注。

1.6 细胞计数检测

单个核细胞计数及活细胞检测:在冻存前、解冻后分别进行单个核细胞计数,计算单个核细胞回收率=解冻后单个核细胞数/冻存前单个核细胞数 $\times 100\%$;用台盼蓝拒染试验进行活细胞检测,细胞活率=解冻后活细胞数/冻存前活细胞数 $\times 100\%$;CD34⁺细胞检测:在冻存前、解冻后分别进行 CD34⁺细胞计数,计算 CD34⁺细胞回收率=解冻后 CD34⁺细胞数/冻存前 CD34⁺细胞数 $\times 100\%$ 。CFU-GM 参照文献[3]采用半固体琼脂培养,计数集落(>40 个细胞)。

1.7 统计分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 及百分率表示,应用 t 检验进行数据的统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

PBSC 采集物经 -80°C 非程控降温直接保存 15~720 d,其 MNC 回收率变化较小($P>0.05$),而 CD34⁺细胞、CFU-GM 回收率在冻存早期变化不大,在 240 d 以后下降较为显著($P<0.05$),但仍然分别达到 82.5%、79.6%(见表 1)。21 例回

输经 -80°C 保存 12~46 d 的干细胞行 APBSC,患者于 14~27 d 获得造血功能重建。

表 1 外周血干细胞保存不同时间的冻存效果 $\bar{x}\pm s$

保存时间 /d	台盼蓝拒 染率/%	回收率/%		
		MNC	CD34 ⁺ 细胞	CFU-GM
15	97.8 $\pm$ 1.2	98.2 $\pm$ 2.9	96.5 $\pm$ 2.7	97.0 $\pm$ 2.2
30	98.0 $\pm$ 1.7	96.8 $\pm$ 3.2	97.2 $\pm$ 2.0	98.1 $\pm$ 2.3
60	96.2 $\pm$ 1.6	97.5 $\pm$ 2.0	95.3 $\pm$ 3.1	94.8 $\pm$ 3.2
120	95.5 $\pm$ 2.2	96.1 $\pm$ 4.2	92.8 $\pm$ 3.2	88.3 $\pm$ 3.7 ¹⁾
240	95.8 $\pm$ 2.1	95.0 $\pm$ 4.4	82.5 $\pm$ 6.2 ¹⁾	79.6 $\pm$ 4.5 ¹⁾
360	93.2 $\pm$ 1.9	95.8 $\pm$ 3.7	76.8 $\pm$ 5.2 ¹⁾	62.8 $\pm$ 5.6 ¹⁾
720	93.3 $\pm$ 2.0	93.8 $\pm$ 4.9	63.8 $\pm$ 7.2 ¹⁾	58.8 $\pm$ 4.2 ¹⁾

与 15 d 时比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

随着造血干细胞临床及实验研究的广泛开展,其应用范围日益扩大,从恶性血液病的治疗,延伸到实体瘤的治疗,采集到的 PBSC 有时需要冷冻保存,待时机成熟时行移植。目前在临床应用造血干细胞主要有 2 类: -196°C 液氮程控降温保存和 -80°C 非程控降温保存。在临床应用中,2 者各有优缺点,前者能长期保存而且细胞损伤少,但操作复杂、设备昂贵、解冻后会出现细胞凝集现象; -80°C 低温保存操作简便、费用低,但该方法进行长期保存研究的报告较少。

一般认为,细胞内冰晶形成和溶液作用是导致细胞损伤的主要因素。程控降温技术能在冷冻过程中简便的控制适宜的液-固相变过程持续时间(≤ 4 min)和相变后期降温速率($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$),此外,若采用体积分数为 5% DMSO 和 60 g/L HES 混合保护剂进行 -80°C 冰箱直接冻存,相变期的持续时间少于 4 min,相变后的降温速率约为 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$,与理想的降温条件相似。上述结果说明 2 类冷冻技术均有进行低温保存的理论基础^[4]。冷冻保护剂可结合水分子以减慢冰晶的形成,减少或防止溶液作用,降低细胞内外渗透压差,减轻细胞的损伤,是任何细胞冷冻技术所必须采用的。DMSO 为目前临床上最常用的造血干细胞冻存保护剂,其为通透性保护剂,可降低冰点及延缓冷冻过程,经典方法是以 10% DMSO 保护剂在 -196°C 液氮中保存细胞。而 HES 是大分子非通透性保护剂,可使细胞脱水,减少细胞冰晶形成从而对细胞膜有保护作用,因此一般在 -80°C 直接冻存中。

解冻是低温保存的另一关键步骤。快速复温可减少因冰晶溶解而导致的细胞肿胀的持续时间,从而减轻细胞损伤。实验表明,复温速度越快,对细胞的损伤就越小,复温速率为 $90\sim 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时

(下转第 349 页)

提高到2010年的100%,平均为98.8%;追踪到位率从2004年的42.0%逐年提高到2010年的90.7%;总体到位率(包括主动到位及追踪到位)也从71.4%提高到95.5%。说明武汉市结防机构与非结防机构协调配合逐步加强,工作职责逐步理顺、明朗,协作成效逐步显现,但转诊到位率仍比较低,有待继续加强和提高。

综合医疗机构是发现结核患者的重要来源,因此,综合医院转诊工作质量是结核患者规则治疗的前提。武汉市非结防机构转诊肺结核患者数从2004年3 498例到2008年10 539例,到位患者数从1 625例增加到4 816例,都增加了近3倍,但转诊到位率平均仅为41.6%,分析其主要原因有:①人民群众对结核预防意识逐步增强,就诊患者数倍增,接诊医生工作任务加重,医患比例失调;②患者就诊时,部分接诊医生因工作繁忙,对结核知识、免费政策宣传时间较短,转诊程序不到位;③患者对综合医院的依从性高。对结核病的转诊治疗认识不足,认为医院环境设备好,医疗水平较高^[2];④患者经济条件的局限性。部分患者由于经济条件差,不愿意接受免费标准化治疗中的自费肝肾功能检查及护肝等检查治疗。建议:①结防机构与非结防机构协在卫生行政部门的干预下^[1],建立长效的协作机制,严格按照《湖北省结核患者转诊及追踪实施细则》要求进行转诊,同时实行综合医院季度考核及年终责任目标考核制度,并督促综合医患动态调控医患数目比例,保证工作质量;②接诊医生开具患者转诊单后,须告诉患者转诊路线及辖区结

防机构联系方式,以便患者便利转诊治疗;③结防机构应组织综合医院定期培训学习,加强接诊医生对结核病知识及政策的学习,与结核患者及家属之间的交流;接诊医生应宣传结核病的危害性及国家的免费政策,增强患者对家庭、社会的责任感及结核病治愈的信心;并定期对综合医院进行督导考核;④国家将结核患者肝肾功能检查及护肝等检查治疗纳入国家免费政策范畴,同时对经济特别困难患者给予交通和基本生活补助,保证其规则治疗。

武汉市2004—2010年结防机构对肺结核患者追踪工作不断提高,分析其进步的原因主要有:①政府部门对结防工作非常重视,结防经费到位及时、足额,保证了结防工作顺利开展;②结防机构建立追踪人员绩效定期考核制度,年终对优秀追踪人员进行表彰和奖励;③加强综合医疗机构医务人员培训,传报卡填写不详细,错填、漏填,如电话号码、家庭住址等现象逐步改善,但仍有待改进;④加强辖区民众健康教育,使其认识到结核病的危害性,同时又正确地对待结核病的诊治,消除对结核患者的歧视,提高结核患者的追踪到位率。

参考文献

- [1] 林小燕,曾水生,陈晓玲,等.2004—2008年龙岩市肺结核患者报告、转诊和追踪情况分析[J].预防医学论坛,2009,12(15):1270—1271.
- [2] 刘飞鹰,罗丹,黄敏莹,等.2004—2005年广西非结防机构网络直报结核病转诊和追踪分析[J].应用预防医学,2006,12(4):245—246.

(收稿日期:2011-10-30)

(上接第346页)

可有效减少因解冻所致的机械性损伤^[5]。我们采用41℃水浴快速解冻,兼顾了高速解冻的原则和高温对细胞的损伤受性,细胞的台盼蓝拒染率为98.1%,提示所采用的解冻温度较为合适。

DMSO-HSE-ALB混合保护剂的效果更为显著。ALB的价格较昂贵,我们尝试运用AB型血浆代替ALB作为非通透性保护剂行-80℃非程控冷冻,发现短期保存(<30 d)PBSC台盼蓝拒染率达到95%以上,回输后均获造血重建。经过8个月的冻存后,MNC回收率、台盼蓝拒染率下降不明显($P>0.05$),CFU-GM回收率和CD34⁺细胞回收率虽下降明显($P<0.05$),但仍然维持在分别为79.6%、82.5%,8个月以后效果明显下降,提示DMSO-HSE-AB型血浆作为保护剂行-80℃非程控冷冻作近期保存具有理想效果。

参考文献

- [1] 陈水云,黄河,李黎,等.人外周血干细胞低温保存方

法的实验研究[J].浙江医学,2002,24(5):276—278.

- [2] 新海杰,唐菊英,孙敬芬,等.低浓度二甲基亚砷冻存外周血造血干细胞的效果[J].临床血液学杂志,2006,19(6):350—351.
- [3] 刘开彦,高志勇,姜永军,等.脐带血造血干细胞的采集、浓缩与低温冷冻保存[J].北京大学学报(医学版),2003,35(2):119—122.
- [4] ABRAHAMSEN J F,BAKKEN A M,BRUSERU D. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34⁺ cells[J]. Transfusion,2002,42:1573—1580.
- [5] KATAYAMA Y,ANO B,ESSHO A,et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells[J]. Bone Marrow Transplantation,1997,19:283—287.

(收稿日期:2012-01-04)