

## · 简 报 ·

## 低温冻存对脐血造血细胞增殖潜能的影响

朱美玲<sup>1</sup>, 伍新尧<sup>2</sup>, 陈汝光<sup>1</sup>, 黄玲惠<sup>1</sup>, 胡燕芬<sup>1</sup>

(1. 深圳市宝安血站及脐血干细胞库, 广东 深圳 518101; 2. 中山医科大学法医学系, 广东 广州 510089)

关键词: 胎血; 造血干细胞; 低温保存/方法; 体外扩增; 细胞增殖

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)02-0159-02

目前脐血库长期库存脐血造血细胞的唯一有效方法是加入细胞保护剂后深低温冻存<sup>[1]</sup>, 这使得脐血细胞必然要经历进入深低温状态和复苏两过程, 因此将不可避免地引起细胞理化性质的变化<sup>[2]</sup>。从理论上讲, 这有可能影响脐血造血细胞的生物特性, 尤其是增殖潜能。为此, 本研究采用 Dextran-40+DMSO 作为脐血造血细胞低温保护剂, 探讨低温冻存对脐血造血细胞增殖潜能的影响。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

羟乙基淀粉(Hespan, HES)购自 Dupont pharma 公司; 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、右旋糖甘 40(Dextran-40)均购自 Sigma 公司; 甲基纤维素培养基、无血清干细胞扩增悬液(serum-free medium for culture and expansion of hematopoietic cell, SFEM)、重组人白介素 3(recombinant human interleukin 3, rhIL-3)、重组人白介素 6(recombinant human interleukin 6, rhIL-6)、重组人血小板生成素(recombinant human thrombopoietin, rhTPO)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、Flt-3 配基(Flt-3 ligand)和低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)均购自 Stem cell 公司; ProCount 试剂购自 BD 公司。

## 1.2 脐血采集、有核细胞(NC)分离和计数

分别对冻存前、后各 10 份脐血细胞进行体外扩增, 10 份脐血均严格按美国脐血库标准操作规程(SOP)采自宝安区西乡人民医院妇产科。用羟

乙淀粉粉法分离脐血有核细胞, 按常规方法, 在 H3 血细胞计数仪上计数总有核细胞(TNC)。

1.3 CD34<sup>+</sup>造血细胞计数

用 ProCount 试剂, 按试剂盒使用说明处理脐血标本, 用美国 BD 公司的 FACScalibur 型流式细胞仪检测, 结果经 ProCount 软件分析处理, 算出每  $\mu\text{L}$  脐血中 CD34<sup>+</sup> 细胞含量。

## 1.4 脐血细胞低温冷冻

每份脐血细胞均进行冷冻前总有核细胞、CD34<sup>+</sup>造血细胞、CFCs 细胞培养计数, 并留取  $4 \times 10^5$  有核细胞进行冻存前体外扩增。将剩余细胞加入 Dextran-40+100 mL/L DMSO 后装入低温无菌冷冻管中, 经 0℃, -40℃, -90℃, -196℃ 梯度降温后置液氮深低温冻存 4 个月再复苏、扩增。

## 1.5 集落形成细胞培养

取  $0.5 \times 10^5$  有核细胞加入 1 mL 甲基纤维素培养基中, 其中含有 50  $\mu\text{g/L}$  rhSCF、10  $\mu\text{g/L}$  rhGM-CSF、10  $\mu\text{g/L}$  rhIL-3 和  $3 \times 10^3$  U/L rhTPO, 充分混匀后加入 24 孔培养板内, 置 37℃、 $\varphi = 5\%$  CO<sub>2</sub>, 全饱和湿度的培养箱中进行培养, 第 14 天计数总集落形成细胞(CFCs)。每份标本均平行 2 份 CFCs 培养, 取均值。

## 1.6 脐血细胞的扩增

在 SFEM 干细胞扩增液中加入联合生长因子, 终浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  Flt-3Ligand、100  $\mu\text{g/L}$  SCF、20  $\mu\text{g/L}$  rhIL-3、20  $\mu\text{g/L}$  rhIL-6、50  $\mu\text{g/L}$  rhTPO 和 40 mg/L LDL。取  $4 \times 10^5$  有核细胞培养于 2 mL 此扩增液中, 混匀后于 37℃、 $\varphi = 5\%$  CO<sub>2</sub> 全饱和湿度培养箱中培养, 每周半量换液, 并计数有核细胞和 CD34<sup>+</sup>造血细胞, 同时进行 CFCs 培养。

收稿日期: 2000-07-14

基金项目: 深圳市宝安区专项科技基金资助(9960)

作者简介: 朱美玲(1970-), 女, 湖南湘乡人, 硕士, 主管技师, 中山医科大学 1998 年在职硕士研究生, 已获学位

## 2 结果

脐血有核细胞体外扩增 5 周, 结果见表 1。方差分析冻存前、后造血细胞的体外扩增结果显示:

表 1 冻存前后脐血造血细胞体外扩增结果

Table 1 Expanded times of pre- and post-cryopreservative hematopoietic cells *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ )

	Cell (initial number)	Expanded times					P	
		1th week	2th week	3th week	4th week	5th week		
TNC	pre-cryo	$4.0 \times 10^5$	$10.8 \pm 2.1$	$92.5 \pm 5.8$	$844.0 \pm 51.0$	$1\ 125.0 \pm 79.3$	$1\ 237.0 \pm 89.7$	< 0.01
	post-cryo	$4.0 \times 10^5$	$12.2 \pm 2.5$	$107.6 \pm 7.9$	$1\ 031.0 \pm 78.0$	$1\ 375.0 \pm 91.0$	$1\ 513.0 \pm 110.4$	
CFCs	pre-cryo	365.0	$4.9 \pm 1.9$	$44.9 \pm 5.6$	$56.2 \pm 5.9$	$34.9 \pm 4.8$	$29.0 \pm 3.8$	> 0.05
	post-cryo	410.0	$5.0 \pm 1.8$	$42.8 \pm 4.7$	$54.8 \pm 6.7$	$33.6 \pm 4.5$	$27.4 \pm 3.5$	
CD34 <sup>+</sup> Cells	pre-cryo	$3.3 \times 10^3$	$7.6 \pm 2.5$	$64.8 \pm 5.9$	$53.9 \pm 4.9$	$53.8 \pm 4.7$	$47.7 \pm 4.8$	> 0.05
	post-cryo	$3.4 \times 10^3$	$7.6 \pm 2.8$	$62.4 \pm 5.7$	$52.0 \pm 4.5$	$52.0 \pm 4.7$	$46.2 \pm 5.1$	

## 3 讨论

目前国内外多个实验室根据 CFCs 和 MNC 复苏率研究冻存对脐血造血细胞的影响。Almici 等<sup>[3]</sup>报道短期深低温冻存 6 个月 CFCs 复苏率 80%~87%, MNC 内各种细胞复苏率 82%~91%。而 Mugishima<sup>[4]</sup>的研究显示长期深低温冻存脐血造血细胞, 冻存时间的延长不会导致造血细胞数量进一步丢失。

本实验以 SFEM 作为细胞培养悬液, 采用 FL+SCF+rhIL-3+rhIL-6+rhTPO 造血生长因子协同作用, 能有效刺激脐血造血细胞体外扩增; 以 Dextran-40+100 mL/L DMSO 作为冻存保护剂, 经梯度降温后深低温冻存 4 个月, 不会降低脐血造血细胞的体外增殖潜能。

结果中 CFCs 及 CD34<sup>+</sup> 细胞冻存前后扩增倍数无差异, 而冻存后有核细胞扩增倍数大于冻存前。其主要原因在于脐血细胞中的成熟有核细胞冻存后复苏率低于未成熟有核细胞<sup>[5]</sup>。本实验有核细胞平均复苏率 95%, 活率平均 73%, 单个核平均活率 88%, 与 Rubinstein 等<sup>[5]</sup>报道结果相近, 冻存后同等数量活有核细胞所含造血细胞高于冻存前。

本实验有核细胞体外扩增 5 周仍具有递增趋势, 而 CFCs 和 CD34<sup>+</sup> 造血细胞分别于扩增的第 3 周和第 2 周达高峰后逐渐下降, 显示随着扩增时间

CFCs 和 CD34<sup>+</sup> 细胞两项指标不存在显著性差异; 冻存后细胞扩增液中有核细胞扩增倍数高于冻存前, 总有核细胞至体外扩增的第 5 周仍具有增加趋势。CFCs 细胞和 CD34<sup>+</sup> 细胞分别于体外扩增的第 3 周和第 2 周达到高峰, 然后渐渐下降。

不断延长造血细胞朝成熟血细胞方向分化。在 CFCs 和 CD34<sup>+</sup> 造血细胞出现高峰时, 总有核细胞已扩增了千倍之多, 这将大大提高用于脐血干细胞移植时所需的有核细胞数, 因此认为: 脐血干细胞移植前对其中部份造血细胞进行体外扩增, 可能有利于脐血干细胞成功移植, 因为体外扩增提供了足够的有核细胞, 而未扩增部份又充分保证了造血干细胞的长期重建功能。

### 参考文献:

- [1] McCullough J, Clay M E, Fautsch S, *et al.* Proposed policies and procedures for the establishment of a cord blood bank [J]. *Blood cells*, 1994, 20(2): 609.
- [2] Wang S Y, Ho C K, Chen P M, *et al.* Comparison of stem cell viability of bone marrow cryopreserved by two different methods [J]. *Cryobiology*, 1987, 24(3): 229.
- [3] Almici C, Serlra C C, Wagner J E, *et al.* Clonogenic capacity and *ex vivo* expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells are not impaired by cryopreservation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1997, 19(1): 1079.
- [4] Mugishima H, Harada K, Chin M, *et al.* Effects of long-term Cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23(4): 395.
- [5] Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield R E, *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(22): 10119.

(编辑 黄小延)