

脐带血干细胞制备的检测分析

任 娜, 朱荔青, 赵 威, 邱广斌[△] (解放军第二〇二医院检验科, 沈阳 110003)

【摘要】 目的 对脐带血干细胞制备进行检测, 为临床安全、有效地应用提供依据。**方法** 测定母体和脐带血标本的人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒(HCV)、梅毒螺旋体(TP)、巨细胞病毒(CMV)、内毒素、支原体和病原微生物。应用体外分离纯化试剂盒, 分离干细胞, 计数提取后单个核细胞数, 经台盼兰染色检测干细胞活力。应用流式细胞仪检测 CD34⁺ 干细胞、淋巴细胞亚群。**结果** 提取后有核细胞数为 $(5.4 \pm 1.09) \times 10^7$, 脐血的量和提取干细胞数成正相关。干细胞活力检测分离的活性率为 $(98.7 \pm 1.3)\%$ 。流式细胞仪测得脐血干细胞 CD34⁺ 为 $(1.55 \pm 0.67)\%$ ($n=19$)。淋巴细胞亚群检测结果显示, 脐血 CD3 细胞数较少, CD4 和 CD8 细胞数之和明显高于 CD3 细胞数, 且选择脐血 CD4/CD8 小于 1.3, 这也是脐血移植时 GVHD 表现轻微的一个重要原因。**结论** 脐血干细胞制剂的制备, 符合细胞治疗的相关安全性指标。

【关键词】 脐血; 干细胞; 人类免疫缺陷病毒; 乙型肝炎病毒表面抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0528-03

Measurement and analysis of unrelated umbilical cord blood transplantation REN Na, ZHU Li-qing, ZHAO Wei, QIU Guang-bin[△] (Department of Clinical Laboratory, PLA 202 Hospital, Shenyang 110003, China)

【Abstract】 Objective To prepare the cord blood stem cell for providing the basis for effective and safe clinical application. **Methods** Maternal and cord blood samples of HIV, HBsAg, HCV, TP, CMV, endotoxin, mycoplasma, cytomegalovirus, pathogen were detected, and stem cells were isolated by purification kit in vitro. Then stem cells the number of mononuclear cells were counted after extraction. Dynamic of stem cells was detected by Taiwan phenol blue staining. CD34⁺ stem cells and lymphocyte subsets were tested by flow cytometry. **Results** The number of nucleated cells was $(5.4 \pm 1.09) \times 10^7$ after extraction, plus the number of stem cells had positive correlation with cord blood volume. Dynamic rate of stem cells was $(98.7 \pm 1.3)\%$. CD34⁺ cord blood stem cells was $(1.55 \pm 0.67)\%$ ($n=19$). There were fewer CD3 cells in cord blood. Total cells number of CD4 and CD8 was significantly higher than CD3. Cord blood CD4/CD8 selected umbilical cord blood transplantation was also less than 1.3, which caused mild symptom of GVHD. **Conclusion** Preparation of cord blood stem cell can accord with safe standard for cell therapy.

【Key words】 umbilical cord blood; stem cell; HIV; HBsAg

干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源, 具有高度自我复制、增殖和多向分化的潜能。在特定的生理或实验条件下, 能够分化成机体器官和组织的特定功能细胞, 干细胞按其来源分类可以分为外周血干细胞、骨髓干细胞和脐带血干细胞。与骨髓和外周血相比, 脐带血具有来源丰富、细胞免疫性低、再生能力强、病原体感染可能性小、移植抗宿主病(GVHD)的发生率低等优势^[1]。脐血除造血干/祖细胞外, 还存在其他多种干/祖细胞, 包括间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和非限制性体干细胞(unrestricted somatic stem cells, USSCs)等^[2-4], 因此脐带血干细胞具有极大的临床应用价值, 而为达到临床治疗的标准, 对干细胞制备相关的检测分析则具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 人类骨髓、脐带血干细胞/祖细胞体外分离纯化试剂盒(沈阳赛欧生物工程有限公司), 二联采血袋(CPDA 抗凝), 低温离心机。梅里埃全自动细菌培养仪和配套标准的血培养瓶, Sysmex-2100 全血细胞分析仪, FACSCalibur 流式细胞仪, MultiTEST IMK Kit CD3/CD8/CD45/CD4、

CD3/CD16⁺56/CD45/CD19 试剂; CD34 造血干细胞检测: CD34-PE/CD45-FITC/Mouse IgG1-PE。

1.2 脐血干细胞制备 采用四联采血袋(CPDA 抗凝)封闭式收集第 3 产程剖宫产的新生儿脐血。产妇无内科及产科并发症, 产前病原体检查阴性、肝功能正常, 产妇夫妇双方无遗传病及家族病史。应用人类骨髓、脐带血干/祖细胞体外分离纯化试剂盒, 分离干细胞。将 A、B 液与脐血 4:1 混匀, 静置沉降 30 min 分层后, 吸取上清液, 置于离心管中, 经低温 2 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。用医用生理盐水制成单细胞悬液铺在 C 液层, 1 800 r/min 离心 30 min, 吸取云雾状的细胞悬液层, 离心, 洗涤 3 次, 即得干细胞。依据临床需要调整剂量。常规检查合格后, 将干细胞制剂送往手术室行干细胞移植术。

1.3 病原微生物的检测 母体和脐带血的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎抗体(抗-HCV)、巨细胞病毒抗体(抗-CMV)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)、梅毒螺旋体(TP)等病原微生物检测; 分离纯化的脐血干/祖细胞, 进行无菌试验、内毒素测定、支原体检测、巨细胞病毒等检测。细菌学检查: 干细胞制剂制备完成后, 用全自动细菌培养仪和配套标准的血培养瓶进行真菌和细菌检测。

[△] 通讯作者, E-mail: qiuguangbin@163.com。

1.4 细胞计数 用 SYSMEX-2100 全自动血细胞分析仪,测定脐血的白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、NR-BC、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比。另用 HPC 模式,计数提取干细胞后单个核细胞数。

1.5 干细胞活力检测 将 90 μ L 的细胞悬液和 10 μ L 的 0.4% 台酚蓝溶液充分混匀静置 5 min,微量加样器取 10 μ L 混合液,沿计数板边缘加样。200 倍显微镜下计数 10 个大方格,分别记录活细胞和死细胞数,根据公式计算细胞活力,即活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times$ 100%。

1.6 脐血 CD34 干细胞计数 调整样本浓度为 2×10^7 cells/mL;在 FALCON 管加入 100 μ L 抗凝全血;加入对照管 CD45⁻ FITC、Mouse- γ 1-PE 抗体,试验管 CD45⁻ FITC、CD34⁻ PE 抗体各 10 μ L,混匀,室温避光反应 15 min;加入溶血素应用液 2 mL,混匀,室温避光反应 10 min;300 r/min 离心,弃上清液;PBS 洗两遍;用 FACSCalibur 流式细胞仪,检测 CD34 与 CD45 双荧光染色,结合前向角散射光与侧向角散射光两个参数(FSC/SSC),来识别表型 CD34bright/CD45dim/侧向角散射光低的造血干细胞。

1.7 脐血和干细胞的淋巴细胞亚群检测 取 50 μ L 脐带血或干细胞提取液,加入 Trucount tube 中,取 20 μ L 四色标记的抗体,加入 Trucount tube 中,混匀,室温避光放置 15 min。取出加入 450 μ L $1\times$ FACS 溶血素避光放置 15 min。上 FACSCalibur 流式细胞仪检测 CD3⁻ FITC/ CD16⁺ CD56⁻ PE/CD45⁻ PerCP/CD19⁻ APC、检测成熟 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺)、NK 细胞(CD3⁻ CD16⁺ CD56)、B 淋巴细胞亚群

(CD3⁻ CD19⁺)。

1.8 统计学方法 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 软件进行统计学分析,采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 干细胞制剂安全性相关检测 脐血在手术当天以剖宫产方式取得,保证无菌足量。母体和脐带血标本 HIV、HBsAg、HCV、TP、CMV、无菌试验、内毒素测定、支原体检测、巨细胞病毒检测均为阴性,病原微生物指标检测全部合格。未发现细菌、真菌的污染。参照美国治疗性细胞的制备标准,制备出的干细胞经安全性评估达到良好效果,能提供符合国际标准的治疗性细胞。

2.2 细胞数检测 选择脐血量大于 90 mL($n=25$)进行 SYS-MEX-2100 全血细胞分析仪检测,提取后有核细胞数为 $(5.4\pm 1.09)\times 10^7$,脐血的量和提取干细胞数成正相关。脐血移植所需的最低细胞数量至今仍未有统一标准,2006 年欧洲脐血移植协作组建议单份脐血移植安全最低的有核细胞数为 3×10^7 /kg。

2.2.1 干细胞活力检测 细胞经台酚兰染色后,显微镜下可见活细胞胞质和胞核透亮,而死细胞胞核蓝染。在镜下分别计数活细胞数和细胞总数,分离的活性率为 $(98.7\pm 1.3)\%$ 。

2.2.2 脐血干细胞的 CD34 检测 用 FACSCalibur 流式细胞仪,检测 CD34 与 CD45 双荧光染色,结合前向角散射光与侧向角散射光 12 个参数(FSC/SSC),来识别表型 CD34bright/CD45dim/侧向角散射光低的造血干细胞。测得脐血干细胞 CD34⁺ 为 $(1.55\pm 0.67)\%(n=19)$ 。

表 1 脐血和提取干细胞后淋巴细胞亚群($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4/CD8	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56	CD3 ⁻ CD19 ⁺
脐血($n=21$)	21	54.4 $\pm$ 12.4	46.1 $\pm$ 12.4	16.8 $\pm$ 5.3 ^Δ	0.9 $\pm$ 0.5 ^Δ	15.9 $\pm$ 6.2 ^Δ	16.8 $\pm$ 11.2 ^Δ
提取后干细胞($n=17$)	19	50.3 $\pm$ 8.9	39.7 $\pm$ 7.1	25.0 $\pm$ 2.0	0.7 $\pm$ 0.4	11.9 $\pm$ 6.1	41.2 $\pm$ 13.9

注:脐血与提取后比较,^Δ $P>0.01$ 。

2.2.3 淋巴细胞亚群检测 本资料显示,脐血 CD3 细胞数较少,CD4 和 CD8 细胞数之和明显高于 CD3 细胞数。说明脐血 T 细胞表型不成熟,抑制作用占优势,脐血抑制性占优势的 CD4 细胞,是胎儿预防母体淋巴细胞性 GVHD 的生理性防御机制,以及新生儿易患感染的细胞免疫学基础。供体周围血中 CD4/CD8 大于 1.3,很容易发生移植排斥反应。本研究选择脐血 CD4/CD8 小于 1.3,这也是脐血移植时 GVHD 表现轻微的一个重要原因。脐血和提取干细胞后的淋巴细胞亚群各项指标比较,差异无统计学意义($P>0.01$)。

3 讨 论

在脐血干细胞移植中淋巴细胞亚群检测十分重要。T 淋巴细胞是机体最重要的免疫细胞群,在正常体内各 T 淋巴细胞亚群相互作用维持着机体的正常免疫功能。T 淋巴细胞是细胞免疫介导的抗真菌、病毒和原虫感染所必需的。T 淋巴细胞主要包括两个亚群——CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞。从免疫表型来看,移植后 CD4⁺ T 细胞主要是抗原预激细胞(记忆和效应 T 细胞)而非新生儿期的淋巴细胞发育过程中的初始 T 细胞,移植后 CD8⁺ T 细胞迅速上升,主要是记忆和效应细胞,大部分 CD8⁺ T 细胞为抑制、无能或终末分化细胞的表型,这些表型特征提示抗原预激细胞增加,而非初始细胞数量

的扩增。此外,CD8⁺ T 细胞的恢复对阻止病毒所致的严重感染至关重要。在 T 淋巴细胞亚群中,CD4⁺/CD8⁺ 的数量和适当的比例是免疫调节的关键。CD4⁺ 细胞、CD8⁺ 细胞彼此相互调节,能表现辅助和抑制的作用,是免疫系统的核心。因此 CD4⁺/CD8⁺ 的比值常被临床上作为评估机体免疫状态的指标^[6-7]。自然杀伤细胞(NK)细胞是造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)后早期发挥抗病毒免疫和移植效应的主要细胞亚群。

造血干/祖细胞(HSCs/ HPCs)具有高度的自我更新能力或自我复制能力,和进一步分化为各系祖细胞及成熟血细胞的能力。HSCs 常以 CD34 为标记区分为 CD34⁺ 细胞群和 CD34⁻ 细胞群,其中 CD34⁺ 细胞群占 95% 以上,而 CD34⁻ 细胞群不到 5%,HSCs/ HPCs 是脐带血中含量最丰富的一种干/祖细胞,这也是目前脐带血临床应用的细胞基础^[8]。除 HSCs 外,脐带血中还可分离出其他多种干/祖细胞,间充质干细胞具有低免疫原性,还具有免疫调节作用,在一定条件下具有向脂肪细胞、心肌细胞、成骨细胞、肝脏细胞、神经细胞等多向分化的能力。间充质干细胞(MSC)能抑制 T 细胞的增殖,其机制主要包括:细胞-细胞接触和 MSC 分泌的细胞因子介导。最近有研究表明 MSC 影响 T 细胞对病原体的反应并不明显,但能

显著抑制 T 细胞对同种异体抗原的反应。此外, MSC 能调节 B 细胞的增殖、存活、抗体分泌和分化,能抑制树突细胞(DC)的生成、增殖、抗原呈递和迁移能力,调节 DC 的分化、成熟,能调节 NK 细胞增殖、细胞毒和分泌细胞因子的功能。所以淋巴细胞亚群的检测在脐血和干细胞提取后,以及病情的监测中具有重要意义。

干细胞治疗是需要多科室合作的新兴治疗技术。临床科室需要进行病例的选择和实施,而干细胞制备和相关检测均在检验科完成。美国 AABB 制定的细胞治疗相关安全性指标包括相关病原微生物检测、无菌实验、内毒素测定、支原体检测、免疫表型等。脐血干细胞移植成功的标志是免疫功能的重建,那么对淋巴细胞亚群的检测也具有重要意义。干细胞移植后的结果受多种因素影响,受者因素包括病种、年龄、预处理强度、宿主微环境、药理学干预等,供者因素中重要的是输入细胞量。因此,为了保证脐带血干细胞在临床中更广泛的应用,更好的疗效,须对相关的检测进行进一步研究和规范。

参考文献

[1] Nitsche A. Inhibition of cord blood cell expansion by human herpesvirus 6 in vitro[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13 (2):197-203.

[2] Barker JN. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy[J]. Blood, 2005, 105 (3):1343-1347.

(上接第 527 页)

年表现为高年龄组 UA 平均水平低于低年龄组,推测对于本地区男性人群,饮食和生活方式对 UA 水平的影响近两年已经超过了肾脏排泄功能对 UA 水平的影响,具体有待进一步研究。

本文发现,每年女性 UA 水平各年龄组间差异均有统计学意义($P<0.01$),有随年龄明显增高趋势,6 年间 UA 水平增幅(≥ 71 岁)组比(≤ 30 岁)组分别高 22.8%、26.3%、27.5%、24.1%、23.1%、20.7%。这与女性青春期雌激素分泌随年龄增加,30 岁后达顶峰,随后随年龄降低的现象相吻合,提示女性 UA 水平与雌激素水平呈负相关。研究证明雌激素可通过上调人 UA 盐转运子基因的表达,促进肾脏 UA 排泄^[8],而人 UA 盐转运子是调节肾 UA 分泌的关键物质,进入肾近端小管上皮细胞内的 UA 盐 50% 由其介导分泌到管腔,经肾脏排出体外^[9]。

本研究提示本地区人群的 UA 水平增长较快,应加强对本地区人群的血清 UA 监测和低嘌呤饮食宣教工作,教育群众适当限制海鲜、啤酒、老火肉汤等富含核蛋白食物的摄入,重点干预对象是中青年男性人群。

参考文献

[1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:2602.

[2] 余俊文,陆锦波,张小娟,等. 佛山地区 13 324 例居民血尿酸水平及相关指标分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(7):401-403.

[3] Bradstock KL. Single versus double unrelated umbilical cord blood units for allogeneic transplantation in adults with advanced hematological malignancies:a retrospective comparison of outcomes[J]. Internal Medicine Journal, 2009, 39(1):744-751.

[4] Brunstein CG. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease [J]. Blood, 2007, 110(8):3064.

[5] Kang HJ. Early engraftment kinetics of two units cord blood transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(3):197-201.

[6] Rubinstein Dobrila L, Rosenfielu RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(22):10119-10122.

[7] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4[J]. Science, 1999, 283(5403):845-848.

[8] Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, et al. Incidence and risk factors early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2009, 15(4):439-446.

(收稿日期:2011-08-15)

[3] 吴震,陈璘,赵长林,等. 广州城乡结合部中老年居民血清尿酸水平及其与心血管疾病危险因素的关系[J]. 中国临床康复, 2005, 9(39):150-151.

[4] 党晓琴,蔡琴,赵旅. 高血压颈动脉硬化程度与血尿酸水平的相关性[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(3):151-152.

[5] 刘健,李力,郑敏玲. 广州市健康人群血清尿酸水平动态分析[J]. 中国医学检验杂志, 2007, 8(6):415-417.

[6] Choi H, Liu S, Curhan G, et al. Intake of purine-rich foods, protein and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the third national health and nutrition examination survey[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52: 283-289.

[7] Hyon K, Choi, Curhan G. Beer, lipuor, and wine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey[J]. Arthritis Rheum, 2004, 51:1023-1029.

[8] 卢彦敏,王霞,付正菊,等. 雌激素与人尿酸盐转运子基因表达的相关性研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(20):2739-2740, 2743.

[9] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. Nature, 2002, 417(4):447-452.

(收稿日期:2011-11-22)