

儿童外周血干细胞采集效果及影响因素分析

陈海雷, 黄 燕, 沈妙娜, 黄倩雯, 刘 勇[△]

(中山大学孙逸仙纪念医院儿科血液室, 广州 510120)

摘要:目的 探讨儿童外周血干细胞(PBSC)采集效果以及影响因素。方法 回顾性分析该院 2015 年 8 月至 2017 年 12 月 PBSC 采集成功的 29 例供者采集前后外周血和干细胞产物的血常规指标,并对于干细胞产物的淋巴细胞亚群进行分析。结果 采集前其外周血的白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血小板计数(PLT)水平分别为 $40.10 \times 10^9/L$ ($10.07 \times 10^9/L$, $64.51 \times 10^9/L$)、 $4.41 \times 10^{12}/L$ ($2.61 \times 10^{12}/L$, $5.75 \times 10^{12}/L$)、 $241.60 \times 10^9/L$ ($101.00 \times 10^9/L$, $453.00 \times 10^9/L$),而采集后其外周血的 WBC、RBC、PLT 水平分别为 $45.13 \times 10^9/L$ ($22.33 \times 10^9/L$, $71.88 \times 10^9/L$)、 $4.39 \times 10^{12}/L$ ($3.02 \times 10^{12}/L$, $5.31 \times 10^{12}/L$)、 $101.68 \times 10^9/L$ ($46.00 \times 10^9/L$, $251.00 \times 10^9/L$),采集后的 WBC 和 PLT 水平高于采集前,差异有统计学意义($P < 0.05$)。干细胞产物中的 WBC 与血常规指标 RBC、红细胞平均体积(MCV)具有一定相关性($P = 0.000, 0.002$);中性粒细胞百分比(LYM)与血常规指标 WBC 具有一定的相关性($P = 0.005$)。28 例患儿的干细胞产物与排除 2 例嵌合率低患儿的干细胞产物进行比较,结果显示,两组各细胞水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 PBSC 采集前供者的 RBC 及 MCV 与干细胞产物的细胞数密切相关,而与其他指标则无相关性。干细胞产物的淋巴细胞亚群对移植后的嵌合率无影响。

关键词:外周血干细胞; 淋巴细胞亚群; 影响因素; 儿童

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1692-03

Influenced factors of collection of peripheral blood stem cells in children

CHEN Hailei, HUANG Yan, SHEN Miaona, HUANG Qianwen, LIU Yong[△]

(Pediatric Blood Room, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen

University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To discuss the influenced factors of collection of peripheral blood stem cells (PBSC) in children. **Methods** The blood routine of peripheral blood and stem cell products collected from 29 successful donors in our hospital from August 2015 to December 2017 were retrospective analyzed, as well as the lymphocyte subsets of stem cell products. **Results** Before collection, the values of WBC, RBC and PLT in peripheral blood were $40.10 \times 10^9/L$ ($10.07 \times 10^9/L$, $64.51 \times 10^9/L$), $4.41 \times 10^{12}/L$ ($2.61 \times 10^{12}/L$, $5.75 \times 10^{12}/L$) and $241.60 \times 10^9/L$ ($101.00 \times 10^9/L$, $453.00 \times 10^9/L$), while after collection, the values were $45.13 \times 10^9/L$ ($22.33 \times 10^9/L$, $71.88 \times 10^9/L$), $4.39 \times 10^{12}/L$ ($3.02 \times 10^{12}/L$, $5.31 \times 10^{12}/L$) and $101.68 \times 10^9/L$ ($46.00 \times 10^9/L$, $251.00 \times 10^9/L$), differences were statistically significant ($P < 0.05$). WBC in stem cell products were correlated with RBC and MCV ($P = 0.000, 0.002$). LYM was correlated with WBC ($P = 0.005$). Levels of stem cell products in 28 children had no statistical differences with that of children excluded who had low chimeric rate ($P > 0.05$). **Conclusion** RBC and MCV of the former donors are closely related to the number of stem cell products, while other indicators have no correlation. The lymphocyte subsets of stem cell products have no effect on the chimeric rate after transplantation.

Key words: peripheral blood stem cells; lymphocyte subsets; influenced factors; children

外周血干细胞(PBSC)移植已经被广泛应用于多种血液病、先天性免疫缺陷及代谢性疾病的治疗^[1-3]。随着 PBSC 技术发展的越来越成熟,供者采集的禁忌证越来越少^[4-5]。本文通过回顾性分析本院 2015 年 8 月至 2017 年 12 月采集成功供者的相关资料,探讨儿童 PBSC 采集的影响因素,分析干细胞产物,以期提高干细胞产出效率,减少采集的次数。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2015 年 8 月至 2017 年 12

月 PBSC 采集成功的 29 例儿童供者为研究对象,其中男 16 例,女 13 例;年龄 2~13 岁;地中海贫血 15 例,急性髓系白血病(AML)3 例,幼年型粒-单核细胞白血病(JMML)3 例,再生障碍性贫血(AA)3 例,急性淋巴细胞白血病(ALL)5 例。

1.2 仪器与试剂 COM. TEC 型血细胞分离机(费森尤斯卡比公司)、流式细胞计数仪(BD 公司)、全自动血细胞计数仪(XE-200, Sysmex 公司)等。一次性单采干细胞管路 9400431-P1YA(德国费森尤斯卡比

公司)和枸橼酸钠(ACDA)抗凝剂 500 mL(四川南格尔生物有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动员方法 采用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员,将 G-CSF[5~10 μg/(kg·d)]进行皮下注射,5 d后清晨注射地塞米松 5~10 mg,并于当日上午进行 PBSC 采集。

1.3.2 采集方法 (1)分离机设置与运行。选择 COM, TEC 型血细胞分离机单个核细胞(MNC)采集程序,输入患者性别、身高、体质量、外周血血细胞比容(Hct)、白细胞计数(WBC)等数据,程序将根据输入资料自动计算单个循环量、泵出量及收集量。调节全血流速为 30~55 mL/min。设定循环终点量为小儿全血容量的 3.0~4.5 倍。(2)静脉导管的使用。对所有儿童供者采集前 1~3 d 进行静脉插管,以保证 PBSC 的采集顺利进行。(3)抗凝剂的选择。采用 ACDA 作为血液抗凝剂。全血与抗凝剂比例为 10:1~12:1。采集前,口服葡萄糖酸钙口服液 1 支;采集过程中,每循环 2~4 L 血容量,给予 10%葡萄糖酸钙 5~10 mL,通过回输管道缓慢注射,预防低钙血症发生。

1.3.3 PBSC 产物检测 每次 PBSC 移植结束后,留取标本,用全自动血细胞计数仪进行有核细胞分类计数,用流式细胞仪进行干细胞淋巴细胞亚群分析和 CD34⁺计数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行处理,正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验;MNC 采集量与相关因素的关系分析采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 采集前后及干细胞产物和血常规分析 采集后的 WBC 和血小板计数(PLT)水平高于采集前,差异有统计学意义($P < 0.05$);干细胞产物中 WBC 水平

为 $264.04 \times 10^9/L(108.01 \times 10^9/L, 473.80 \times 10^9/L)$,红细胞计数(RBC)为 $1.03 \times 10^{12}/L(0.62 \times 10^{12}/L, 1.92 \times 10^{12}/L)$,PLT 水平为 $4\ 514.26 \times 10^9/L(2\ 062.00 \times 10^9/L, 7\ 305.00 \times 10^9/L)$ 。见表 1。

表 1 采集前后血常规指标分析[$M(P_{25}, P_{75}), n=29$]

血常规指标	采集前	采集后	<i>P</i>
WBC($\times 10^9/L$)	40.10(10.07,64.51)	45.13(22.33,71.88)	0.002
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.41(2.61,5.75)	4.39(3.02,5.31)	0.369
PLT($\times 10^9/L$)	101.68(46.00,251.00)	241.60(101.00,453.00)	0.000

2.2 干细胞产物与采集前血常规指标的相关性分析 由于 1 例患儿干细胞产物并未进行血常规检测,此部分只分析了 28 份标本。结果显示,干细胞产物中的 WBC 与血常规指标 RBC、红细胞平均体积(MCV)具有一定相关性($P=0.000, 0.002$);中性粒细胞百分比(LYM)与血常规指标 WBC 具有一定的相关性($P=0.005$)。见表 2。

表 2 干细胞产物与采集前血常规指标的
相关性分析($P, n=28$)

血常规指标	干细胞产物		
	WBC	LYM	CD34 ⁺
WBC	0.165	0.005	0.154
RBC	0.000	0.369	0.922
Hct	0.573	0.577	0.970
MCV	0.002	0.276	0.993
Hb	0.151	0.636	0.990
PLT	0.137	0.574	0.755

注:Hb 为血红蛋白

2.3 干细胞产物的淋巴细胞亚群分析 28 例患儿(以下简称“总体组”)的干细胞产物与排除 2 例嵌合率低患儿(以下简称“部分组”)的干细胞产物进行比较,结果显示,两组各细胞水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 例嵌合率低患儿 CD4⁺/CD8⁺分别为 1.502 和 0.843。见表 3。

表 3 两组患儿干细胞产物水平比较

组别	<i>n</i>	淋巴细胞($\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)	T 淋巴细胞(% , $\bar{x} \pm s$)	B 淋巴细胞(% , $\bar{x} \pm s$)	NK 细胞(% , $\bar{x} \pm s$)
总体组	28	98.30±38.20	65.54±7.99	20.57±6.46	13.29±6.38
部分组	26	98.77±39.42	65.49±8.26	20.5±6.69	13.41±6.48
<i>P</i>		0.965	0.981	0.965	0.944
组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ (% , $\bar{x} \pm s$)	CD8 ⁺ (% , $\bar{x} \pm s$)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ [$M(P_{25}, P_{75})$]	CD34 ⁺ [% , $M(P_{25}, P_{75})$]
总体组	28	29.17±5.44	27.73±5.32	1.08(0.88,1.26)	0.34(0.16,0.59)
部分组	26	29.06±5.58	27.73±5.32	1.08(0.88,1.26)	0.34(0.16,0.59)
<i>P</i>		0.938	0.999	0.939	0.640

3 讨 论

有研究表明,干细胞产物中的造血干细胞数与移

植成功有密切的关系^[6-7]。因此,提高 PBSC 的采集效率就显得尤为重要。在 MNC 采集的过程中,由于不

间断的分离收集,不断地刺激机体释放更多的造血干细胞进入外周血,导致采集前后供者的外周血 WBC 变化不显著^[8-10]。而本研究显示,采集后的外周血 WBC 比采集前高,可能与儿童造血功能相对比较活跃有关。

ABO 血型抗原和人类白细胞抗原(HLA)位于不同染色体上,因此 HLA 全相合的供受者之间的血型可以不相同。有资料表明,ABO 血型不合并不会影响异基因造血干细胞移植后的移植物抗宿主病(GVHD)的发生率、复发率及病死率^[11]。若 ABO 血型不相合,采集的 PBSC 产物如果含有过多的 RBC,在输入受者后,可能引起急性血管内溶血,导致急性肾衰竭、弥散性血管内凝血等严重的并发症。因此,在 PBSC 的采集过程中,应当尽量减少 RBC 的采集量^[10]。

本研究结果显示,干细胞产物的 WBC 与采集前的 RBC 和 MCV 密切相关,这与文献^[5-8]报道不一致。可能是由于本研究所纳入的患儿中有地中海贫血患儿的同胞供者,而这些供者本身也是轻型或者中型地中海贫血,存在一定的溶血情况,影响了干细胞收集。此类供者采集前是否需要输注 RBC,其输注 RBC 后采集效率是否提高,本研究未能涉及。CD34⁺细胞数与采集前外周血细胞数均无相关性,由于采集前未能检测供者外周血中 CD34⁺细胞数,因此不能确定两者是否相关。而 LYM 与采集前的 WBC 具有一定相关性,因此,改善干细胞的动员效果,提高动员后的 WBC,对提高干细胞产物中 LYM 有明显作用。

GVHD 和复发是 PBSC 移植后主要的两大并发症。而这两种并发症均与移植物中的 T 淋巴细胞密切相关。在本研究中,有 2 例患儿由于嵌合率降低,曾进行过供者的淋巴细胞输注,尽管结果显示两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),但由于 2 例患儿的 CD4⁺/CD8⁺分别为 1.502 和 0.843,与其余 26 例患儿的 CD4⁺/CD8⁺相差较大,因此笔者认为,维持正常 CD4⁺/CD8⁺,有助于降低 GVHD 和复发的发生率。

研究表明,女性供者为临床不良事件最重要的危险因素^[12]。本研究仅出现 1 例 ACDA 过敏现象亦为女性。同时,增加 ACDA 抗凝剂和采集的次数,也明显增加了风险^[12]。且 PBSC 采集的主要不良反应主要包括 ACDA 中毒、过敏以及电解质的丢失(如 K⁺和 Ca²⁺)^[9]。因此,提高 PBSC 的采集效率,减少采集次数,提高移植物的嵌合率应该是未来进行 PBSC 关注的重点。

PBSC 移植和骨髓移植相比,其中性粒细胞、PLT 植入速度较快,移植失败的发生率较低,但慢性 GVHD 的发生率较高。资料表明,针对血液病的恶性肿瘤,异基因的造血干细胞移植采用骨髓细胞可能更有利,同时发生急性 GVHD 的概率也相对较高^[10-11]。因此,针对移植手术中的不足,提出相应的解决方案,

也是目前亟待解决的问题。

参考文献

- [1] SINGH A K, SAVANI B N, ALBERT P S, et al. Efficacy of CD34⁺ stem cell dose in patients undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transplantation after total body irradiation[J]. *Biol Blood Marrow Transp*, 2007, 13(3): 339-344.
- [2] 陈运贤. 现代造血干细胞移植[M]. 广州: 广东科技出版社, 2005: 49-53.
- [3] KABIR M H, ABD EL-ATY A M, RAHMAN M M, et al. Dissipation kinetics, pre-harvest residue limits, and dietary risk assessment of the systemic fungicide metalaxyl in Swiss chard grown under greenhouse conditions[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 92: 201-206.
- [4] STEFANO F, RACHEL G, KURT L, et al. Progenitor cell recruitment during individualized high-flow, very-large-volume apheresis for autologous transplantation improves collection efficiency[J]. *Transfusion*, 2006, 46(8): 1408-1416.
- [5] CASSENS U, BARTH IM, BAUMANN C, et al. Factors affecting the efficacy of peripheral blood progenitor cells collections by large-volume leukaphereses with standardized processing volumes[J]. *Transfusion*, 2004, 44(11): 1593-1602.
- [6] KARASU G, UYGUN V, YESILPEK A. Factors associated with peripheral blood stem cell yield in healthy pediatric donors[J]. *Transfus Apher*, 2017, 56(6): 819-824.
- [7] KATOH D, OCHI Y, YABUSHITA T, et al. Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio at Relapse Predicts Outcome for Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-cell Lymphoma in the Rituximab Era[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2017, 17(12): e91-e97.
- [8] INCE E U, ILERI T, DOGU F, et al. The impact of donor age and sex on the nucleated cell count and CD34 count in healthy bone marrow donors [J]. *Pediatr Transplant*, 2015, 19(4): 385-390.
- [9] 曹宇华, 冯国生, 邱想英, 等. 血细胞分离机行外周血单个核细胞采集前后肿瘤患者水电解质变化的比较[J]. *广西医学*, 2013, 35(5): 619-620.
- [10] 王荷花, 陈惠珍, 邹外一, 等. ABO 血型主要不合供者外周血干细胞单采中 COM. TEC 血细胞分离机的应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(36): 6781-6784.
- [11] BLIN N, TRAINEAU R, HOUSSIN S, et al. Impact of Donor-Recipient Major ABO Mismatch on Allogeneic Transplantation Outcome According to Stem Cell Source [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(9): 1315-1323.
- [12] DONMEZ A, ARIK B, TOMBULOGLU M, et al. Risk factors for adverse events during collection of peripheral blood stem cells[J]. *Transfus Apher Sci*, 2011, 45(1): 13-16.