

液氮冻存时间对605份脐血造血干细胞质量和临床移植效果的影响

章毅 朱华 金焕英 王引婷 邵夏炎 孔静思
黄文浩 洪艳 李春丽 高峰 陈亮 王锋 陆瑶

【摘要】 目的 探讨液氮冻存时间对脐血造血干细胞质量和临床移植效果的影响。方法 对上海脐血库已经应用于临床移植的605份脐血进行研究,脐血平均冻存时间为820(88~2651)d,测定脐血复苏之后的有核细胞、CD34⁺细胞数量、细胞回收率、细胞活力,粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM),结合脐血冻存时间、临床移植效果进行统计分析。结果 复苏后细胞回收率、细胞活力与冻存时间无显著相关性,CFU-GM平均(109.6~105.7)个/1×10⁵,随冻存时间延长逐渐降低(P=0.011)。临床移植患者的造血重建时间、植入失败率、急性移植物抗宿主病、总体生存率与脐血冻存时间长短无显著相关性。结论 深低温冻存时间长短对脐血复苏后细胞回收率、细胞活力、临床移植效果无显著影响,冻存时间较长的脐血复苏后CFU-GM在正常标准范围内略有下降,保存3~7年的脐血仍能维持正常细胞活性和功能、达到良好的临床移植效果。

【关键词】 脐血; 深低温保存; 造血干细胞; 细胞质量; 治疗结果

Impact of cryopreservation duration of 605 units umbilical cord blood on quality of hematopoietic stem cell and outcome of clinical transplantation Zhang Yi, Zhu Hua, Jin Huanying, Wang Yinting, Shao Xiayan, Kong Jingsi, Huang Wenhao, Hong Yan, Li Chunli, Gao Feng, Chen Liang, Wang Feng, Lu Yao. Shanghai Cord Blood Bank. Shanghai, Shanghai Stem Cell Technology Co., LTD. 200051, China
Corresponding author: Lu Yao, Email: luyao@shanghaicordblood.org

【Abstract】 Objective To investigate the impact of cryopreservation duration of umbilical cord blood (UCB) on quality of hematopoietic stem cell and outcome of clinical transplantation. **Methods** 605 units of UCB which had been used in clinical transplantation were previously cryopreserved for 820 (88-2651) days in average. UCB was detected for total nucleated cell count, CD34⁺ cells count, cell recovery rate, cell viability and CFU-GM after thawing. **Results** No statistical correlation was found between cryopreservation duration and cell recovery rate, cell viability. CFU-GM decreased along with the extension of cryopreservation duration (P=0.011), ranging between 109.6 and 105.7/1×10⁵. There was no significant difference on hematopoietic reconstitution time, graft failure, acute GVHD and overall survival among groups with different cryopreservation duration. **Conclusion** Cryopreservation duration has no significant effect on cell recovery rate, cell viability and clinical transplantation outcome. Extension of cryopreservation duration may reduce CFU-GM of stem cells with fluctuation still in normal range. UCB could maintain cell viability and function to achieve satisfactory clinical transplantation outcome even when thawed after 3 to 7 years' cryopreservation.

【Key words】 Fetal blood; Cryopreservation duration; Hematopoietic stem cell; Cell quality; Outcome

脐血作为造血干细胞的重要来源之一,已经被广泛应用于临床造血干细胞移植(HSCT),治疗多种血液系统疾病、遗传性疾病、实体肿瘤。目前全

球有超过60万份的脐血库存,已经完成了3万多例脐血干细胞移植。与骨髓、外周血相比,脐血具有来源丰富、采集过程方便、无伤害、HLA配型要求相对较低、免疫原性低、发生移植物抗宿主病(GVHD)风险低等诸多优势。同时,脐血库是实体库而非信息库,一般情况下,脐血采集之后需要长期保存在深低温环境中,冻存时间的长短是否会对脐血的质量、临床应用的效果产生影响?本研究我们回顾性分析上海脐血库的605份已应用于临床的脐血冻存

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.001

基金项目:上海市科技成果转化与产业化项目(12431902202);
上海市科技小巨人(培育)企业项目(13HX11810000)

作者单位:200051 上海市脐带血造血干细胞库、上海市干细胞技术有限公司、中国干细胞集团有限公司

通信作者:陆瑶, Email: luyao@shanghaicordblood.org

时间与细胞回收率、细胞活性、细胞功能的相关性,探讨冻存时间长短对临床移植效果的影响。

材料和方法

1. 脐血的采集:2000年3月23日至2013年3月3日,由具备采集资质的医疗机构采集的605份来自妊娠34周以上的自然分娩或剖宫产胎儿的脐血。产妇无乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋病等传染病史,无遗传性疾病、血液系统疾病、恶性肿瘤病史,妊娠期无严重合并症。胎儿娩出脐带结扎后,从脐静脉穿刺抽取脐血注入含有枸橼酸钠抗凝采血袋中,4℃保存并尽快运输。

2. 脐血的制备:脐血中加入60 g/L羟乙基淀粉(体积4:1),117×g离心6.5 min,经过人工压浆,将上层血浆、白细胞层和约25 ml红细胞层压至保存袋;再次离心791×g 13 min,通过自动压浆板,将多余的血浆压出,保留脐血总量约30 ml。所有制备过程在脐血采集后18 h内完成。

3. 脐血的检测和冻存:所有脐血冻存前均检测有核细胞(TNC)数、CD34⁺细胞数、CFU-GM、细菌、乙肝表面抗体、丙肝病毒抗体、HIV抗体、梅毒螺旋体抗体、CMV抗体,对检测合格样本,留取1.8 ml小管(用于脐血移植之前的检测)后进行冻存。每袋脐血加入7.5 ml 10% DMSO冷冻保护剂,经程控降温后于-196℃液氮冻存(MVE,美国Thermofisher公司产品)。

4. 脐血的复苏检测、运输和临床应用:取出1.8 ml冻存小管,置于37~40℃的水浴箱中,轻轻摇晃,1 min内完成复苏。检测复苏后TNC、0.4%锥虫蓝染色后计数活细胞数和CFU-GM数。移植前1天或当天将脐血从气相液氮罐转移至便携式液氮罐,平稳运输到移植医院,取出后37~40℃的水浴箱中快速解冻,1 min内完成复苏,15 min内输注到患者体内。

5. 标准与定义:脐血入库标准为TNC≥8×10⁸, CD34⁺细胞≥8×10⁵, CFU-GM≥30个/1×10⁵,细菌检测、梅毒螺旋体、病毒抗体检测均为阴性。细胞回收率是指脐血复苏后TNC与冻存前TNC的比例;细胞活力是指复苏后脐血中活细胞数占细胞总数的比例。

6. 统计学处理:采用SPSS17.0软件进行统计学分析。脐血复苏后检测指标、临床移植预后指标用描述性统计学方法;冻存时间不同的4个分组之间,脐血CFU-GM、有核细胞回收率、细胞活力、临床移

植造血重建天数的比较用非参数分析法;临床移植植入失败率、aGVHD发生率的比较用方差分析;生存率的比较用Kaplan-Meier生存分析。

结 果

1. 冻存复苏后脐血细胞质量:本研究605份脐血的平均冻存时间(从采集当日到临床移植日)为820(88~2651)d,按照冻存时间分为<1年、1~2年、2~3年、3年以上4组,分别有101、201、148、155份脐血。对冻存后复苏的脐血进行CFU-GM检测,4组的平均集落数分别为(109.6±16.1)、(106.8±12.4)、(105.9±10.8)、(105.7±12.6)个/1×10⁵(*P*=0.011)。冻存后TNC回收率4组分别为(83.3±7.15)%、(84.3±11.6)%、(84.7±6.5)%、(85.9±7.7)%、差异有统计学意义(*P*=0.002)。冻存后活性细胞比例(细胞活力)4组分别为(86.2±5.4)%、(86.3±4.3)%、(86.4±4.4)%、(86.9±4.4)%、差异无统计学意义(*P*=0.400)。

2. 冻存复苏后脐血的临床应用效果:605单位的脐血中,有178份用于单份脐血造血干细胞移植(sUCBT),9份用于双份脐血造血干细胞移植(dUCBT),418份用于HLA半相合+第三方脐血移植(haplo-HSCT)。比较不同冻存时间脐血移植后的各项预后指标,单份/双份脐血移植的187例患者中,中性粒细胞重建时间、血小板重建时间、植入失败率、急性移植物抗宿主病(aGVHD)、总体生存(OS)率,在脐血冻存时间不同的4组患者中,差异均无统计学意义(表1)。

HLA半相合+第三方脐血移植的418例患者中,中性粒细胞重建天数和OS率在4组患者间差异有统计学意义(*P*=0.048、*P*=0.040),但应用保存3年以上脐血进行移植的一组患者,中性粒细胞重建中位时间为12(9~60)d,并未比其他3组患者延缓;OS率为72.5%,高于<1年组、1~2年组。血小板重建时间、植入失败率、aGVHD发生率在4组患者之间差异无统计学意义(表1)。

讨 论

随着脐血在临床的广泛应用,脐血的质量也备受关注。脐血中TNC和CD34⁺细胞数量和增殖分化能力是评估脐血质量的重要指标,也是脐血移植是否能够植入并重建造血的关键因素之一。脐血从采集到临床应用,必须经过较长一段时间的深低温保存。由于脐血冻存的逐级程控降温、冷冻保护

表1 脐血冻存不同时间组患者临床移植预后情况

冻存 时间	单份/双份脐血移植(187份)						HLA半相合+第三方脐血移植(418份)					
	例 数	中性粒细胞重 建中位时间(d)	血小板重建 中位时间(d)	植入失败 (%)	aGVHD 发生率(%)	总体生存 率(%)	例 数	中性粒重建 中位时间(d)	血小板重建 中位时间(d)	植入失败 (%)	aGVHD 发生率(%)	总体生存 率(%)
<1年	42	17(12~38)	36(10~94)	33.3	46.7	56.5	59	13(10~29)	15(11~66)	11.9	35.8	64.3
1~2年	64	16(9~37)	28(12~90)	28.1	21.3	69.2	137	13(9~30)	15(10~60)	3.6	45.8	61.4
2~3年	47	14(11~29)	31(16~79)	25.5	42.9	69.8	101	13(9~66)	16(9~66)	5.0	33.7	78.5
>3年	34	20(12~40)	35(25~60)	32.4	25.0	79.3	121	12(9~60)	14(9~60)	4.1	31.3	72.5
P值		0.538	0.432	0.930	0.247	0.244		0.048	0.066	0.156	0.169	0.040

注:aGVHD:急性移植物抗宿主病

剂(10% DMSO)的使用、冻存温度的控制和监测(液氮-196℃)、复苏过程的技术已经非常稳定和成熟,而冻存时间的延长是否会影响脐血的质量,进而影响临床移植的效果?这是脐血移植中医生和患者关注的问题。

本研究我们对605单位脐血的统计分析数据显示,随着冻存时间的延长,TNC的回收率、活性细胞的比例能够稳定在一定水平而不降低。冻存时间<1年、1~2年、2~3年、>3年4组的平均TNC回收率稳定在83.3%~85.9%,细胞活力在86.2%~86.9%,研究结果与国内外同期的研究报道相近。许利民等^[1]比较了-196℃液氮冻存3、6、12个月的脐血,TNC数、CD34⁺细胞数及细胞活力与冻存前比较,差异均无统计学意义,冻存12个月后平均细胞活力仍可达到90.86%。时庆等^[2]研究了34份液氮冻存16年的脐血复苏前后的情况,TNC回收率平均达到79%,细胞活力为82%。Anagnostakis等^[3]分析了105份液氮冻存6~36个月的脐血样本,平均TNC回收率为79.48%,他们认为冻存时间延长对脐血质量无显著影响。Lee等^[4]的研究数据也表明脐血TNC回收率、细胞活力并不与冻存时间呈负相关。

CFU-GM是反映造血干细胞功能的指标,本研究中,脐血复苏后CFU-GM检测结果随着冻存时间延长有所降低($P=0.011$),但4组脐血平均CFU-GM检测结果为(105.7~109.6)个集落/ 1×10^5 ,均超过100个集落/ 1×10^5 。Broxmeyer等^[5]研究了一组冻存15年的脐血,复苏后CFU-GM平均为(95±15)个集落/ 1×10^5 ,他们将细胞移植到小鼠体内,细胞成功植入并很快在小鼠体内重建造血,他们认为保存长达15年之久的脐血,复苏之后的造血干细胞仍然可以维持较高的细胞活性和功能,从而达到良好的移植效果。

本研究我们对于脐血冻存时间与临床移植预后相关性的研究数据表明,脐血冻存时间长短对于

造血重建时间、植入失败率、aGVHD发生率、患者OS率等反映移植预后的临床指标,并无显著影响。黄璐等^[6]的研究发现,不同冻存时间对细胞回收率无显著影响,而细胞回收率对于患者造血重建时间也无影响。Picardi和Arcese^[7]认为脐血复苏之后,活性细胞有一定比例的损失,主要是已分化成熟的细胞,这部分细胞的丢失并不影响造血干细胞的植入功能。

综上所述,随着深低温冷冻保存技术的成熟和稳定,脐血造血干细胞冻存时间的长短,并未对细胞回收率、细胞活力、细胞功能产生显著影响;使用不同冻存时间的脐血进行移植的患者,临床移植效果无显著差异。临床移植单位在选择脐血时,不需要考虑冻存时间长短对脐血干细胞的影响。

参考文献

- [1] 许利民,王劲,洪淋,等.脐血造血干细胞不同温度长期冻存效果的实验研究[J].中国现代医学杂志,2007,17(24):3034-3036.
- [2] 时庆,侯怀水,鞠秀丽,等.深低温冻存十六年后脐血造血干细胞活性的检测[J].中华血液学杂志,2008,29(8):555-556.
- [3] Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential [J]. Transfusion, 2014, 54(1): 211-223.
- [4] Lee HR, Song EY, Shin S, et al. Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years [J]. Blood Res, 2014, 49(1): 54-60.
- [5] Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, et al. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(2): 645-650.
- [6] 黄璐,宋瑰琦,吴云,等.深低温冻存不同时间对脐血细胞质量的影响[J].中国实验血液学杂志,2013,21(1):177-180.
- [7] Picardi A, Arcese W. Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective [J]. Transfus Apher Sci, 2010, 42(3): 289-297.

(收稿日期:2014-07-02)

(本文编辑:董文革)