

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.018

脐带血造血干细胞—196 °C 保存 20 年后质量分析

雒 猛,王 忠[△],高 峰,王 凯,赵清刚

山东省脐带血造血干细胞库,山东济南 250102

摘要:目的 探讨脐带血造血干细胞经液氮冻存 20 年后的质量情况。方法 对山东省脐带血造血干细胞库于 2000 年冰存的合格的脐带血 200 例出库进行检测,检测其母血、脐带血的乙肝表面抗原(HBsAg)、丙肝病毒抗体(抗-HCV)、梅毒螺旋体抗体(抗-TP)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)和巨细胞病毒(CMV)-IgM 抗体;检测脐血的有核细胞数(TNC)、细胞活性、粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM)、CD34⁺ 细胞数量,以及血培养(细菌/真菌)检测,检测指标与冻存前指标进行对比,同时分析复苏后的检测指标是否符合现有的质量标准。结果 母血、脐带血的 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV 和 CMV-IgM 抗体与入库时结果完全一致,均无反应性;脐带血的细菌/真菌培养无菌生长;冻存前 TNC、细胞活性、CFU-GM、CD34⁺ 细胞数量分别为 $(11.2 \pm 4.8) \times 10^8$ 、 $(99.5 \pm 1.3)\%$ 、 $(1.9 \pm 0.8) \times 10^6$ 和 $(3.1 \pm 2.3) \times 10^6$;冻存后的 TNC、细胞活性、CFU-GM、CD34⁺ 细胞数量分别为 $(10.1 \pm 4.0) \times 10^8$ 、 $(75.4 \pm 2.4)\%$ 、 $(1.4 \pm 0.6) \times 10^6$ 和 $(2.4 \pm 2.1) \times 10^6$,冻存后与冻存前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脐带血造血干细胞经过液氮冻存 20 年后,TNC、细胞活性、CFU-GM、CD34⁺ 细胞数量均有所下降,但是脐带血的多项指标仍然符合质量标准,细胞仍具有很强的增殖活性,能够满足临床需要。

关键词:脐带血; 造血干细胞; 冻存时限; 细胞质量

中图分类号:R329.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)10-1410-04

Quality analysis of cord blood hematopoietic stem cells stored at -196 °C for 20 years

LUO Meng, WANG Zhong[△], GAO Feng, WANG Kai, ZHAO Qinggang

Cord Blood Hematopoietic Stem Cell Bank of Shandong, Jinan, Shandong 250102, China

Abstract: Objective To investigate the quality of cord blood hematopoietic stem cells stored in liquid nitrogen for 20 years. **Methods** A total of 200 cases of qualified public cord blood cryogenically stored in cord Blood Hematopoietic Stem Cell Bank of Shandong in 2000 were tested when discharged from storage. The Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and Hepatitis C virus (HCV) antibody, Treponema pallidum (TP) antibody, human immunodeficiency (HIV) antibody and cytomegalovirus (CMV)-IgM antibody in mother blood and cord blood were tested, and the number of total nucleated cells (TNC), cell viability, granul-monocyte colony forming unit (CFU-GM), number of CD34⁺ cells, blood culture (bacteria/fungi) in cord blood was tested. Test results were compared with indicators at the time of storage, and whether the indicators after resuscitation met the existing quality standards were analyzed at the same time. **Results** The HBsAg, HCV antibody, TP antibody, HIV antibody and CMV-IgM antibody of the mother blood and cord blood were completely consistent with the results at the time of storage, and they were all non-reactive. Blood culture of cord blood grew aseptically. TNC, cell viability, CFU-GM, the number of CD34⁺ cells before freezing were $(11.2 \pm 4.8) \times 10^8$, $(99.5 \pm 1.3)\%$, $(1.9 \pm 0.8) \times 10^6$ and $(3.1 \pm 2.3) \times 10^6$, and TNC, cell viability, CFU-GM, and CD34⁺ cell number were $(10.1 \pm 4.0) \times 10^8$, $(75.4 \pm 2.4)\%$, $(1.4 \pm 0.6) \times 10^6$ and $(2.4 \pm 2.1) \times 10^6$ after freezing, and there was a statistically significant difference between the values after freezing and before freezing ($P < 0.05$). **Conclusion** After the cord blood hematopoietic stem cells are cryogenically stored in liquid nitrogen for 20 years, TNC, cell viability, CFU-GM, and CD34⁺ cells decreased, but the cord blood quality index still meets the quality standard and the cells have strong activity, which can meet clinical needs.

Key words: cord blood; hematopoietic stem cells; cryopreservation time limit; cell quality

脐带血干细胞的应用,已从当初的移植治疗血液病逐步向治疗多种疾病方向发展,脐带血来源的干细胞对治疗早产儿脑损伤和神经后遗症、失代偿期酒精性肝硬化、自身免疫性疾病、黏多糖病和 1 型糖尿病

作者简介:雒猛,男,工程师,主要从事脐带血的制备、分离、检测与冷冻方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wangzhongyt@163.com.

本文引用格式:雒猛,王忠,高峰,等.脐带血造血干细胞—196 °C 保存 20 年后质量分析[J].检验医学与临床,2021,18(10):1410-1412.

等均有很好的疗效^[1-8]。脐带血自采集到应用有相当一段时间的间隔,把获得的干细胞储存于液氮中,是目前通用的方式。干细胞在液氮中可以保存几个月至十多年仍有很高的细胞活性^[9-13]。本研究对-196℃储存的 20 年脐带血 200 份进行检测,并进行质量分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 设备:流式细胞仪(美国 BD caliber)、全自动血液分析仪(日本希森美康 XN-350)、液氮罐(美国 THERMO)、二氧化碳培养箱(美国 THERMO)、BacT/ALERT 3D 240 全自动血液培养系统(法国梅里埃)、全自动酶免分析仪(奥斯邦 STAR+FAME)。试剂:美国 BD 公司生产的 CD34、CD45、mouse IgG、甲基纤维素(加拿大 Stemcell)、台盼蓝(德国 Sigma)、培养瓶 BacT/ALERT 的需氧瓶和厌氧瓶(法国梅里埃)。

1.2 标本处理 选取 2000 年储存已满 20 年的血液 200 例,入库前传染病等各项检测指标符合入库标准,标本一直冻存于液氮中。从液氮罐中取出标本,在 37℃水浴中迅速 2 min 内复融,标本进行后续检测。

1.3 传染病检测 -20℃保存标本,取出当时保留的母血、脐带血复检标本,采用酶联免疫吸附试验,采用全自动酶免分析系统分别检测母血、脐带血血浆的乙肝表面抗原(HBsAg)、丙肝病毒抗体(抗-HCV)、梅毒螺旋体抗体(抗-TP)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)(1+2)和巨细胞病毒(CMV)-IgM 抗体。

1.4 有核细胞数(TNC) 复苏后的脐带血标本采用全自动血液分析仪获取 TNC。TNC 的平均回收率为复苏后的 TNC 均值/冻存前 TNC 均值×100%。

1.5 细胞活力检测 采用台盼蓝拒染法检测细胞的活性,取 50 μL 脐带血标本与等体积的台盼蓝溶液混匀后,立即取混合悬液镜检,计算其细胞活性。

1.6 粒-单核细胞集落形成单位(CFU-GM) 采用

甲基纤维素半固体培养液,以细胞浓度为 5×10^5 /mL 吸取 20 μL 接种于 48 孔培养板中,每份标本设置 3 孔,培养板放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中,培养 14 d 后倒置显微镜观察,以大于 40 个细胞组成的细胞团确认为一个集落,3 孔取均值为标本的集落数。

1.7 CD34⁺ 数值计算 标记流式进样管,设置同型对照,阴性管加入 20 μL 的 CD45-FITC 和 Mouse-IgG1-PE,阳性管加入 20 μL 的 CD45-FITC、CD34-PE,在阴、阳管中分别加入 100 μL 标本,室温避光孵育 15 min 后,加入溶血素室温反应 10 min,以 2 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 500 μL PBS 重悬,上机检测。根据流式细胞仪圈门法计算 CD34⁺ 比值(CD34 数目与 CD45 数目比值),利用 TNC 与 CD34⁺ 比值相乘,计算获得 CD34⁺ 数值。

1.8 细菌/真菌培养 采用全自动血培养系统对复苏的脐带血标本分别进行需氧/真菌和厌氧菌培养,培养周期为 5 d。

1.9 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 传染病检测结果 按照脐带血造血干细胞库技术规范要求(试行),对入库脐带血对应的母血进行 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 和 CMV-IgM 抗体检测,200 份标本母血传染病结果均无反应性。同时按照规范和本库的要求,出库的标本需要同时进行母血、脐带血的 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 和 CMV-IgM 抗体检测,检测结果均为无反应性。200 份复苏后脐带血分别接种于需氧/真菌、厌氧培养瓶中进行 5 d 的培养,结果均和入库的检测结果一致,脐带血无菌生长。见表 1。

表 1 冻存前与复苏后母血、脐带血传染病及微生物检测结果

| 项目 | HBsAg | 抗-HCV | 抗-HIV | 抗-TP | CMV-IgM 抗体 | 微生物培养 |
|-------|-------|-------|-------|------|------------|-------|
| 母血 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | / |
| 脐带血 | / | / | / | / | / | 无菌生长 |
| 复苏母血 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | / |
| 复苏脐带血 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 无菌生长 |

注:/表示正常未检测。

2.2 TNC 入库前检测 200 份脐带血的 TNC 为 $(11.2 \pm 4.8) \times 10^8$,冻存 20 年复苏后的 TNC 为 $(10.1 \pm 4.0) \times 10^8$,TNC 的平均回收率为 90.18%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$);入库前检测 200 份脐带血的活性为 $(99.5 \pm 1.3)\%$,复苏后脐带血的活性为 $(75.4 \pm 2.4)\%$,细胞活性比率为 75.78%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$);入库前检测 200 份脐带血的 CFU-GM 为 $(1.9 \pm 0.8) \times 10^6$,复苏后的

CFU-GM 为 $(1.4 \pm 0.6) \times 10^6$,CFU-GM 的比率为 73.68%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$);入库前检测 200 份脐带血的 CD34⁺ 为 $(3.1 \pm 2.3) \times 10^6$,复苏后的 CD34⁺ 为 $(2.4 \pm 2.1) \times 10^6$,CD34⁺ 的比率为 77.42%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

脐带血是胎儿娩出、脐带结扎并离断后残留在胎盘和脐带中的血液,过去是作为医疗废物来处理。脐

带血移植已经成为继骨髓移植和外周血干细胞移植后的一种重要的造血干细胞来源。脐带血干细胞资源丰富,可变废为宝,对供者(母婴)无任何不良影响,病毒感染风险低,人类白细胞抗原组织配型相合要求低,移植后发生排斥反应的危险性小,移植物抗宿主病反应低,干细胞不受疾病、衰老等影响,脐带血干细胞在血液系统和免疫系统疾病治疗方面越来越受到重视^[13]。

脐带血自储存到应用会有一段时间的液氮冻存,因条件限制,在移植使用前不可能获得该份脐带血真实、真实的数据,临床医生选用脐带血的参考依据为冻存前的检测数据,脐带血是否有传染病?是否有微生物污染?经冻存后的脐带血质量指标是否会下降?随着冻存年限的增加,细胞质量是否会逐年降低?这些都是临床医生所关心的问题。

本研究对当初的检测标本进行了传染病指标检测,因新生儿出生前未与外界接触,传染病的唯一途径为母婴垂直传播,鉴于新生儿免疫系统未完全建立及胎盘有一定的屏障作用,筛查母血的传染病指标有相当的必要性。考虑到试剂灵敏度或标本混淆等因素的影响,脐带血移植前,对移植脐带血当初留样的母血、脐带血标本进行传染病检测,检测结果完全一致。用冻存管保存的复检标本储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷库,经过多年的储存,复检标本量能够满足检测,但是有部分标本的量变少或冻干(当初留样为2管,冻干的启用另一管),复检标本冻存管的密封性及保证复检标本的量不减少是脐带血储存多于20年需要注意的问题。

冻存干细胞的方法有先暂存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,然后转移至液氮中^[9-10,14]。许利民等^[9]曾报道,脐带血干细胞在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱可以有效保存3个月,6个月后存在部分细胞损害,此时的脐带血不适合作为干细胞移植。脐带血经过程控降温后保存于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的液氮中12个月、几年甚至十几年后,仍有很高的细胞活性^[9-13]。通常认为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,细胞内外各种溶质基本达到平衡,此时细胞内酶的活性基本消失,但仍有微量生命活动,仍然会消耗能量,不适合长时间保存。 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的液氮深低温冷冻保存能阻断各种酶的活性和细胞代谢,可长期保存细胞并保存细胞活力。

评价外周血干细胞主要是用体外方法检测复温后有核细胞、CD34⁺细胞和造血集落培养及细胞活性^[14]。本研究发现,冻存前200份脐带血的TNC均值为 $(11.2\pm 4.8)\times 10^8$,冻存20年后复苏TNC均值为 $(10.1\pm 4.0)\times 10^8$,TNC回收率为90.18%,活性回收率为75.78%。许利民等^[9]研究发现,冻存12个月后平均细胞活力仍为90.86%。时庆等^[10]研究了冻存16年的34份脐带血复苏前后的情况,TNC回收率平均为79%。章毅等^[11]比较了605份冻存干细胞的TNC回收率,1年内为83.3%,1~2年为84.3%,>2~3年为84.7%,3年以上为85.9%。ANAG-NOSTAKIS等^[15]分析了105份液氮冻存6~36个月

的脐带血标本,平均TNC回收率为79.48%。LEE等^[16]研究脐带血TNC回收率、细胞活力并不与冻存时间呈负相关。推测冻存液氮后,细胞基本活动停止,其各项指标较入库前有降低的情况,主要与冻存和复苏的过程有关,细胞经历降温和复温的过程,会引起细胞内形成冰晶及渗透压改变,过程中有部分细胞不可避免地受到损伤。细胞活性有一定比例的损失,主要是已分化成熟的细胞,这部分细胞丢失并对移植影响不大。

CD34⁺细胞是造血干/祖细胞的一个重要表面标志,CD34⁺细胞及总有核细胞数能够反映细胞的质量。本研究采用双平台进行CD34计数,200份标本的平均CD34数目是冻存前的77.42%,发现TNC的损失接近10%,因为双平台的原因,CD34⁺实际数目比冻存前远远大于77.42%,鉴于双平台的误差存在计数仪与流式细胞仪2个过程与设备,后续会尝试采用单平台的绝对计数。CFU-GM是造血干细胞增殖能力的指标,冻存20年的标本能够很好地形成集落,说明干细胞有很强的增殖能力。

目前,临床医生考虑移植效果主要关注TNC、CD34⁺、CFU-GM和活性,冻存20年的脐带血虽然指标较冻存前有所降低,但是细胞各项指标仍符合质量标准。临床医生在选择脐带血时不需要过多关注脐带血的冻存年限,更多的是需要关注脐带血的质量。

参考文献

- [1] 孙自敏. 脐血移植临床应用30年的回顾与展望[J]. 器官移植, 2020, 11(2): 199-203.
- [2] 刘茜, 叶山东. 干细胞治疗1型糖尿病的研究进展[J]. 安徽医学, 2017, 38(6): 816-818.
- [3] 王莘, 翟晓文. 脐带血干细胞移植治疗非恶性血液病进展[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2019, 9(4): 242-246.
- [4] 唐湘风, 栾佐. 造血干细胞移植治疗黏多糖病研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(3): 162-165.
- [5] BERGLUND S, MAGALHAES I, GABALLA A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future[J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(6): 691-699.
- [6] 周新人, 王方, 云升皓, 等. 人脐带血干细胞治疗失代偿期酒精性肝硬化临床观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(2): 232-233.
- [7] PENG X, SONG J, LI B B, et al. Umbilical cord blood stem cell therapy in premature brain injury: opportunities and challenges[J]. J Neurosci Res, 2020, 98(5): 815-825.
- [8] GLUCKMAN E. Milestones in umbilical cord blood transplantation[J]. Blood Rev, 2011, 25(6): 255-259.
- [9] 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.
- [10] 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.

在血培养阳性标本中的分离率和耐药率均有所增加, 它们对 β -内酰胺类、氨基糖苷类和糖肽, 如万古霉素等许多抗菌药物的耐药率越来越高, 使其成为重要的医院病原菌, 这可能与近年来过度滥用广谱抗菌药物有关。因此, 应提高临床标本送检率, 结合肠球菌属的抗菌谱, 选择有效治疗和感染控制措施, 减少万古霉素耐药的肠球菌和多重耐药肠球菌的进一步出现。

综上所述, 随着现代医学的发展, 由于产超广谱抗菌药物的广泛使用, 耐药菌、条件致病菌和非致病菌在血液感染中的发病率明显增多, 在各种感染中居首位, 其病死率高达 20%~50%^[15]。血液标本的细菌培养是诊断菌血症基本而重要的方法, 由于不同地区临床医生对抗菌药物的应用习惯不同, 抗菌药物耐药情况亦存在差异。所以, 对血培养耐药情况进行监测, 若从血液中检测出细菌, 一般视为病原菌感染, 提示有菌血症。对血培养病原菌的分布构成情况及其耐药性进行监测, 在一定程度上对掌握本单位、本地区的病原菌分布和耐药趋势, 以及确定治疗措施有重要意义。

参考文献

[1] 马梦亭, 郭普, 李静, 等. 2015—2017 年某院血培养病原菌的分布及耐药率变迁[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40(9):1128-1131.

[2] 钱扬会, 李艳君, 赵强元. 2015 年某院血流感染主要病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(21):2990-2992.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document: M47-A[S]. Wayner, PA, USA: CLSI, 2007.

[4] LOONEN A J, DE C J, TOSSERAMS J, et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection-

diagnostics in an emergency care unit [J]. PLoS One, 2014, 9(1):87315.

[5] VENTOLA C L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats[J]. P T, 2015, 40(4):277-283.

[6] 廖云凤, 严立. 2013—2016 年重庆市血流感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(21):2654-2661.

[7] 颜令, 王淑玲, 徐兰兰, 等. 铜绿假单胞菌临床分布及耐药性的不均一性[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(3):230-234.

[8] 哈瑞, 李刚, 师志云, 等. 80 株铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药机制的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21):2617-2620.

[9] 袁翊, 叶帮芬, 万小涛, 等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(11):1602-1604.

[10] 徐腾飞, 刘志武, 金凤玲. 2012—2015 年医院血流感染病原菌分布及耐药性变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(10):936-940.

[11] 中华人民共和国卫生部. 临床微生物实验室血培养操作规范: WS/T503-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[12] 陈俊, 王燕, 钱耀先, 等. 某院血流感染常见病原菌分布特征及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(2):200-203.

[13] 赵亚楠, 赵建平. 2012—2017 年内蒙古自治区人民医院血培养分离菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(6):641-645.

[14] 殷琳, 喻华, 黄湘宁, 等. 2016—2017 中国西部地区多重耐药肠球菌的耐药及分布特点[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(9):1128-1137.

[15] 王素梅, 张健东, 王宇凡, 等. 2015—2017 年血培养病原菌分布与耐药性研究[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12):61-65.

(收稿日期:2020-09-23 修回日期:2021-01-26)

(上接第 1412 页)

[11] 章毅, 朱华, 金焕英, 等. 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[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(1):1-3.

[12] 陈林, 张坤, 邵文陶, 等. 脐带血造血干细胞分离冻存方法优化[J]. 重庆理工大学学报(自然科学版), 2014, 28(12):82-86.

[13] 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.

[14] 任召祺, 张铮, 原杰, 等. 外周血造血干细胞的采集、冻存与质量检测的研究[J]. 北京医学, 2018, 40(11):1075-

1078.

[15] ANAGNOSTAKIS I, PAPASSAVAS A C, 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.

[16] LEE H R, SONG E Y, SHIN S, et al. Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years[J]. Blood Res, 2014, 49(1):54-60.

(收稿日期:2020-08-23 修回日期:2021-01-03)