

·诊疗技术·

温度对脐带血单个核细胞和干细胞的影响

燕法红¹,林彩莲²,孙凤强³,庄洪霞¹,朱玉春²,居瑞雪³(潍坊医学院第一附属医院/潍坊市人民医院血液内科¹,产科²,检验科³,

山东 潍坊 261041)

摘要:目的 探讨温度对脐带血中单个核细胞(MNC)和干细胞的影响。方法 采集2020年7月~10月我院16例产妇的脐带血,均取30 ml,平均分为4℃组和室温组(RT组),均放置12 h,应用密度梯度离心法分离单个核细胞,用血细胞分析仪检测MNC数,流式细胞术检测干细胞(CD34⁺细胞)占CD45⁺细胞的比例,计算CD34⁺细胞数;比较两组MNC数、CD34⁺细胞比例及CD34⁺细胞数,分析不同温度下CD34⁺细胞数与MNC的相关性。**结果** 4℃组与室温组MNC数分别为 $(9.28 \pm 4.65) \times 10^8/L$ 、 $(20.11 \pm 8.37) \times 10^8/L$,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);4℃组与室温组CD34⁺细胞比例分别为 $(1.10 \pm 0.56)\%$ 、 $(0.55 \pm 0.24)\%$,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);4℃组与室温组CD34⁺细胞数分别为 $(9.41 \pm 5.08) \times 10^6/L$ 、 $(10.80 \pm 5.40) \times 10^6/L$,差异无统计学意义($P > 0.05$);4℃组CD34⁺细胞数与MNC无相关性($r = 0.295$, $P = 0.267$),室温组CD34⁺细胞数与MNC呈正相关($r = 0.551$, $P = 0.027$)。**结论** 室温保存脐带血可有效保护干细胞和MNC,4℃保存可保护干细胞但损失MNC。

关键词:温度;脐带血;单个核细胞;干细胞

中图分类号:R331

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.15.052

文章编号:1006-1959(2021)15-0184-03

The Effect of Temperature on Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells and Stem Cells

YAN Fa-hong¹, LIN Cai-lian², SUN Feng-qiang³, ZHUANG Hong-xia¹, ZHU Yu-chun², JU Rui-xue³(Department of Hematology¹, Department of Obstetrics², Department of Laboratory Medicine³, the First Affiliated Hospital of Weifang Medical University/Weifang People's Hospital, Weifang 261041, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the impact of temperature on mononuclear cell (MNC) and stem cell in umbilical cord blood (UCB). **Methods** Sixteen umbilical cord blood units were collected in our hospital between July 2020 and October 2020. Thirty milliliters UCB were taken and then divided into two groups including 4℃ group and room temperature (RT) group. They were kept at 4℃ or RT for 12 hours. MNCs were separated using Ficoll-Hypaque density centrifugation and MNC number was measured using automated hematology analyzer. CD34⁺ cell ratio was analyzed using flow cytometry and CD34⁺ cell number was further calculated. MNC number, CD34⁺ cell ratio and CD34⁺ cell number were compared between 4℃ group and RT group. Correlations between CD34⁺ cell number and MNC number were analyzed in each group. **Results** MNC number was lower in 4℃ group than RT group [$(9.28 \pm 4.65) \times 10^8/L$ vs $(20.11 \pm 8.37) \times 10^8/L$, $P < 0.001$]. CD34⁺ cell ratio was higher in 4℃ group than RT group [$(1.10 \pm 0.56)\%$ vs $(0.55 \pm 0.24)\%$, $P = 0.001$]. CD34⁺ cell number was not significantly different between 4℃ group and RT group [$(9.41 \pm 5.08) \times 10^6/L$ vs $(10.80 \pm 5.40) \times 10^6/L$, $P = 0.225$]. CD34⁺ cell number was not correlated with MNC number in 4℃ group ($r = 0.295$, $P = 0.267$) while they were positively correlated in RT group ($r = 0.551$, $P = 0.027$). **Conclusion** Room temperature storage of UCB is useful for both stem cell and MNC while 4℃ storage is useful for stem cell only.

Key words: Temperature; Umbilical cord blood; Mononuclear cell; Stem cell

脐带血(cord blood)是一种重要的造血干细胞来源,保持脐带血的有效质量与数量对造血干细胞移植的成功至关重要。脐带血的质量与数量受到多种因素的影响,涉及采集、运输、保存、冷冻、融化等多个环节^[1]。其中,脐带血的运输及保存就是其中一个重要方面,运输及保存的时间及温度等都可能影响脐带血的质量与数量。对于脐带血的最佳运输及保存条件,目前研究存在一定分歧。德国制定了脐带血运输保存的规范,要求脐带血在采集后48 h内送至脐血库并予以处理、冻存,在此期间的温度必须保持在 $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ 。目前其他国家对脐带血的运输及保存的时间与温度等条件没有明确规定^[2]。随着交通条件的改善,物流速度的加快,脐血库数量的增

多,目前脐带血的运输时间已大大缩短,一般脐带血在采集后十余小时内均可到达脐血库。本研究拟观察脐带血采集后12 h保存于4℃与室温对干细胞及单个核细胞的影响,以探索脐带血运输与保存的最佳温度。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 PC7-anti CD45、PE-anti CD34 流式抗体购自美国 Becton Dickinson 公司,淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,裂红液购自美国 Becton Dickinson 公司,肝素钠购自成都市海通药业有限公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购自天津灏洋华科生物科技有限公司,血细胞分析仪为日本 Sysmex 公司产品,流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 人脐带血采集及处理 16 份人脐带血来自潍坊医学院第一附属医院 2020 年 7 月~10 月健康产妇。在 50 ml 无菌注射器中加入 1 支肝素钠(12500 U),脐带娩出后用注射器抽取 30 ml 脐带血,立即平均

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2016WS0644)

作者简介:燕法红(1977.6-),女,山东寿光人,博士,副主任医师,主要从事血液病的治疗研究

通讯作者:居瑞雪(1973.4-),女,山东临朐人,本科,副主任检验师,主要从事血液病的流式诊断研究

分为两组,分别为4℃组与室温组,前者放置于4℃冰箱,后者放置于室温(22±4)℃,均放置12 h。此后的处理步骤两组一致,以减少干扰与误差,除离心外均放置在4℃(或者冰水浴)。

1.3 密度梯度离心法分离干细胞(MNC)与MNC计数 脐带血放置12 h后,1200 r/min离心7 min,吸取白膜层,加入等体积PBS后混匀,缓慢加入到含有淋巴细胞分离液的离心管中,2000 r/min缓慢离心20 min。吸取MNC,加入10 ml PBS,1200 r/min离心7 min,弃上清,以PBS重悬至1 ml。用血细胞分析仪检测血常规,白细胞浓度除以15,记录为每毫升脐带血所采集的MNC数,然后进行流式检测。

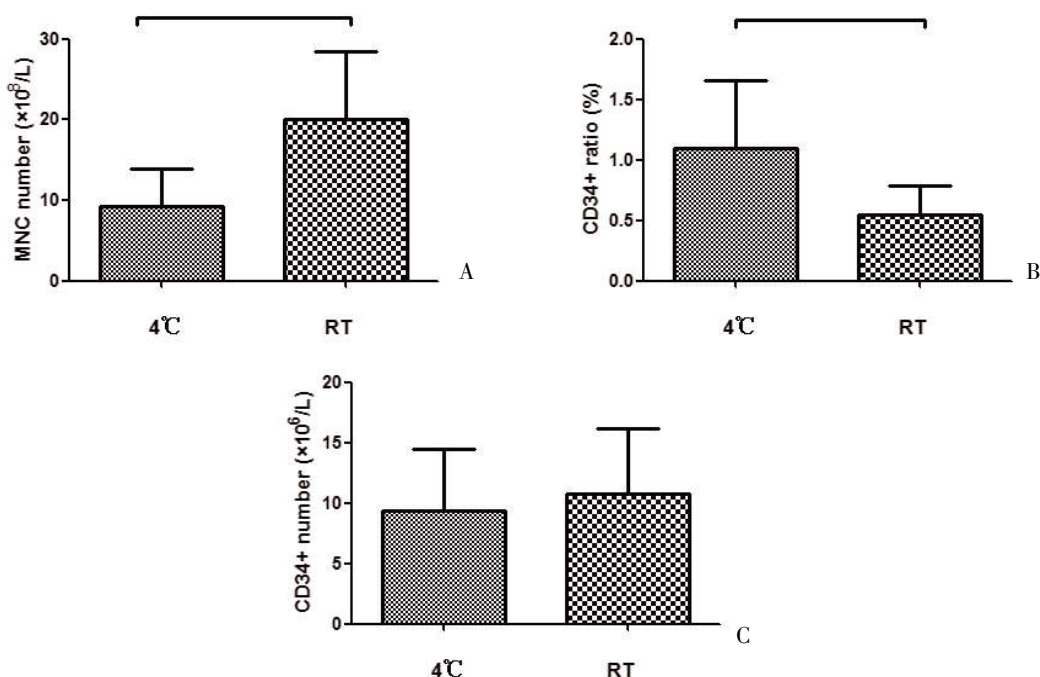
1.4 流式细胞术检测CD34⁺细胞比例 每组取50 μl充分混匀后的脐带血,若MNC浓度过高可进行稀释,每组加入PC7-anti CD45、PE-anti CD34流式抗体各5 μl,避光孵育20 min。加裂红液,放置10 min。加PBS,300 g离心5 min,弃上清。再洗一遍。以PBS重悬细胞,用流式细胞仪检测。以CD45/SSC设门,定位白细胞群。分析CD34⁺细胞占CD45⁺细胞的比例,然后乘以MNC数,得出CD34⁺细胞的数量。

1.5 统计学分析 数据采用SPSS 22.0进行统计。各组资料经检验为正态分布后,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用配对样本的 t 检验。应用线性相关,分析不同温度下CD34⁺细胞数与MNC数的相关性,应用GraphPad Prism5软件作图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组脐带血MNC数、CD34⁺细胞比例及CD34⁺细胞数比较 4℃组与室温组MNC数分别为(9.28 ± 4.65) $\times 10^8$ /L、(20.11 ± 8.37) $\times 10^8$ /L,4℃组MNC数低于室温组($t = -5.283, P < 0.05$)。4℃组与室温组CD34⁺细胞比例分别为(1.10 ± 0.56)%、(0.55 ± 0.24)%,4℃组高于室温组($t = 4.348, P < 0.05$)。4℃组与室温组CD34⁺细胞数分别为(9.41 ± 5.08) $\times 10^6$ /L、(10.80 ± 5.40) $\times 10^6$ /L,两组比较,差异无统计学意义($t = -1.265, P = 0.225$),见图1。

2.2 CD34⁺细胞数与MNC的相关性 4℃组CD34⁺细胞数与MNC无相关性($r = 0.295, P = 0.267$);室温组CD34⁺细胞数与MNC呈正相关($r = 0.551, P = 0.027$)。



注:A:MNC数;B:CD34⁺细胞比例;C:CD34⁺细胞数

图1 两组脐带血MNC数、CD34⁺细胞比例及CD34⁺细胞数比较

3 讨论

对于脐带血冻存前的最佳保存温度、温度对脐带血中的干细胞及其他成分的影响,部分学者从不同的角度对此进行了研究,但研究的结论并不一致。部分研究认为室温保存可获得较好的效果,Moldenhauer A等^[3]认为,在25℃时MNC与CD34⁺细胞

明显高于4℃,集落形成单位(CFU)的形成能力优于4℃。Maeng JY等^[4]发现在24℃保存比4℃保存下CFU数量增多,但CD34⁺细胞活性无明显差别。Pereira-Cunha FG等^[5]发现脐带血在室温保存至96 h,能较好地保存各种细胞成分的活性。Guttridge MG等^[6]证实脐带血在室温保存3 d,CD34⁺细胞活性

不受影响,但 CD45⁺细胞活性明显下降。另一部分研究则认为 4℃保存更优越,如 Pamphilon D 等^[7]认为 4℃保存比室温可获得更多的总有核细胞(TNC)数、MNC 数、CD45⁺活细胞,但 CD34⁺活细胞与 CFU-GM 之间无差别。Fry LJ 等^[8]认为 4℃~8℃保存比室温保存可得到更多的 CD45⁺细胞、CD34⁺细胞、粒细胞与 MNC。Louis I 等^[9]认为 4℃保存比室温可明显提高 MNC、CD45⁺、CD34⁺细胞活性和复苏能力,但 CFU 形成能力无差别。另外一部分研究则认为 4℃保存与室温保存差别不大^[10,11]。Strobel J 等^[2]研究了 2460 例脐带血,发现不同的保存温度总体上对 CD34⁺活性及 CFU 影响不大,但 20℃~24℃保存会略显优势。

本研究发现,室温组与 4℃组 CD34⁺细胞数基本相同,与部分研究一致^[4,6,10,11]。脐带血中干细胞数的多少与细胞凋亡、抗凝—纤溶系统的变化等因素有关^[3,10],有研究认为室温与 4℃保存时脐带血中的干细胞凋亡无明显差别^[10],与本次研究结果相吻合。Radke TF 等^[10]发现脐带血采集后 72 h 之内,在 4℃与 26℃保存时 CD34⁺细胞均没有发生死亡,但可发生凋亡,但两种温度下的细胞凋亡差别不大;只有在较高的 37℃条件下 CD34⁺细胞死亡和凋亡才进一步增加,细胞形态也随之发生变化。本次研究没有纳入 37℃保存,由上可以看出,在脐带血采集后的一定时间内,4℃与室温保存时 CD34⁺细胞的损失无明显差别,可以解释本研究中脐带血在采集 12 h 后保存在两种温度下 CD34⁺细胞的数量没有差别。对于 MNC 的变化,本研究发现,室温组 MNC 数高于 4℃组,与有关研究一致^[3]。由于低温环境可释放有害物质,细胞吸收后可引起损伤^[12],MNC 数量的下降可能与其有关。Pereira-Cunha FG 等^[5]观察了室温保存 96 h 内脐带血中不同 MNC 组分的变化,结果发现,随着时间推移,单核细胞与不成熟 B 淋巴细胞维持稳定,成熟 B 淋巴细胞下降,而 CD34⁺细胞与成熟 T 淋巴细胞升高。整体上来说,MNC 是基本维持稳定的。本研究还发现,室温组 CD34⁺细胞数与 MNC 数呈正相关,而 4℃组 CD34⁺细胞数与 MNC 数无相关性,考虑仍与低温损伤 MNC 有关,导致 4℃时二者数量上的不平衡。

综上所述,室温保存比 4℃更有利于同时保护干细胞与 MNC。但本研究尚存在一定的局限性,仅从干细胞与 MNC 细胞数量的角度进行观察,没有对 TNC 数、复苏后细胞活性、CFU 形成能力等进行检测。相关研究值得进一步深入开展,更全面地观察不同保存条件下脐带血一系列参数的变化,为脐

带血的保存提供可靠的理论基础。

参考文献:

- [1]Mousavi SH,Zarrabi M,Abroun S,et al.Umbilical cord blood quality and quantity:Collection up to transplantation [J].Asian J Transfus Sci,2019,13(2):79-89.
- [2]Strobel J,Brenner L,Zimmermann R,et al.Influence of Duration and Temperature of Transport and Storage Prior to Processing on Cell Quality of Cord Blood Units--A German Experience[J].Clinical Laboratory,2015,61(10):1453-1461.
- [3]Moldenhauer A,Wolf J,Habermann G,et al.Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation [J].Bone Marrow Transplantation,2007,40(9):837-842.
- [4]Maeng JY,Kim SY,Kim S,et al.Cord blood quality:Comparison and correlation among in vitro and in vivo assays to assess cord blood quality according to delivery temperature and time after collection[J].Transfusion and Apheresis Science,2019,58(4):475-483.
- [5]Pereira-Cunha FG,Duarte A,Costa FF,et al.Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection[J].Transfusion,2013,53(9):2034-2042.
- [6]Guttridge MG,Soh TG,Belfield H,et al.Storage time affects umbilical cord blood viability [J].Transfusion,2014,54(5):1278-1285.
- [7]Pamphilon D,Curnow E,Belfield H,et al.Storage characteristics of cord blood progenitor cells:report of a multicenter study by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative [J].Transfusion,2011,51(6):1284-1290.
- [8]Fry LJ,Giner SQ,Gomez SG,et al.Avoiding room temperature storage and delayed cryopreservation provide better postthaw potency in hematopoietic progenitor cell grafts [J].Transfusion,2013,53(8):1834-1842.
- [9]Louis I,Wagner E,Dieng MM,et al.Impact of storage temperature and processing delays on cord blood quality:discrepancy between functional in vitro and in vivo assays [J].Transfusion,2012,52(aop):2401-2405.
- [10]Radke TF,Barbosa D,Duggleby RC,et al.The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Application of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays[J].Stem Cells International,2013(2013):823912.
- [11]Schwandt S,Liedtke S,Kogler G.The influence of temperature treatment before cryopreservation on the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34(+)and CD45(+)cord blood cells[J].Cytotherapy,2017,19(8):962-977.
- [12]Mehrihi JN.Current and historical perspectives on methodological flaws in processing umbilical cord blood[J].Transfusion,2013,53(11):2667-2674.

收稿日期:2021-01-24;修回日期:2021-02-07

编辑/成森