

人脐带血有核细胞冷冻干燥保存实验初步研究*

肖洪海** 李 军** 华泽钊**,**** 谷雷霆** 王 欣** 郑效东***

(**上海理工大学低温医学与食品冷冻研究所 上海 200093 ***东富龙有限公司 上海 201109)

摘 要 脐带血中的造血干细胞有着广泛的应用前景,随之而产生的保存问题已成为关注的热点。目前已有低温保存的研究,但未有冻干成功的报道。实验试图用冻干的方法来长期保存脐带血中的造血干细胞。冻干过程中选用 PVP、HES 和各种糖类作为保护剂,一次干燥阶段搁板温度控制在 -30°C ,二次干燥时搁板温度控制在 $+15^{\circ}\text{C}$,整个冻干过程为 52.5h。冻干后复水性能极佳,能够在 30s 内完全复水,用显微染色观察,细胞形态完整;用流式细胞仪进行 PI 染色和 $\text{CD}34^{+}$ 抗体跟踪检测,测得有核细胞存活率为 55.67%, $\text{CD}34^{+}$ 抗体跟踪检测得到 $\text{CD}34^{+}$ 细胞占淋巴细胞的 3.61%。

关键词: 人脐带血 冷冻干燥 冻干保护剂 $\text{CD}34^{+}$ 细胞

所谓脐带血是指婴儿分娩出断脐后,保留在脐带和胎盘绒毛血管内的血液。研究证实人脐带血(HUCB)有丰富的造血干细胞,其质和量可与骨髓相媲美,移植后能够持久重建造血功能^[1]。

脐带血中的造血干细胞有着广泛的应用前景,但是由于脐带血移植需要配型,非亲属之间配型完全相同的概率很低,因此出生时脐带血必须很快处理或者妥善保存,随之而产生的长期保存问题已成为关注的热点。目前,脐带血多采用低温保存。低温保存的方式可以是 -80°C 的低温冰箱保存,但是只能用于短期冻存。长期保存目前采用保存于 -196°C 的液氮罐内深低温保存。对于一份脐带血,分离出单核细胞进行保存,需两个 5ml 的试管冻存而保存 50 万份脐带血标本,则需要 100 万个试管;一个 50 升的液氮罐一般只能保存 100 份,这样需要 1 万个液氮罐;如此多的容器需建造一座有 500 个房间的楼房,同时必须建立一个自动液氮灌注系统。这样庞大的建筑和复杂的系统即使在欧美国家,近期内也难以实现。此外,国内一份脐带血经分离纯化、检测、登记等处理后放入 -196°C 的液氮中保存,若储存 20 年,总费用在 2 万元左右。在美国一份脐带血标本从采集、血型、病毒检测、HLA 检测、细菌培养到单个核细胞保存约需 1000 美元,50 万份需 5 亿美元,加上每日大量消耗的昂贵的液氮费和管理费,费用惊人^[1]。

冷冻干燥技术是在低温真空下干燥制品,干燥

后体积、形状基本不变,物质呈海绵状,无干缩;复水时能够迅速还原成原来的性状;能够除去物质中 90% 以上的水分,制品的保存期长,而且在保存过程中可以置于室温下避光或 4°C 冰箱内长期保存,不需要昂贵的低温储存设备及复杂的保存条件;且在运输过程中由于其质量很轻便于长途运输。由于以上这些无可比拟的优越性,冻干保存一直受到人们的关注,而关于血液细胞的冻干也成为科研工作者关注的热点。但由于血液细胞其结构的复杂性,血液细胞的冻干保存一直是尚未解决的世界性的一个难题。自从 Meryman 在 1960 年和 MacKenize 在 1971 年尝试利用冻干保存红细胞失败以来,Goodrich 和 V. Rindler 等一直致力于红细胞的冻干保存研究。但是到目前为止报道过而未见争议的红细胞冻干复水后的最高存活率还没有超过 50%^[2-6]。而脐带血的冻干保存目前在国内外还未见相关报道。

本研究对人脐血分离的有核细胞,以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等为冻干保护剂进行了冷冻干燥保存实验,探讨了不同冻干保护剂组分及浓度对人脐血分离有核细胞冻干保存效果的影响。

本文 2003 年 7 月 15 日收到,9 月 7 日接受。

*基金项目:国家自然科学基金重点项目(59836240)

****通讯作者。E-mail: tchua@sh163.net

致谢:感谢中科院上海生化所流式细胞仪室在检测方面的大力协助。

材料与amp;方法

1. 实验标本来源

试样为正常孕妇顺产的新生儿脐血。采用的 200ml 双联脐带血收集袋内含 28ml ACD 抗凝剂。实验中采用采集的脐带血全血 1 袋, 容积为 100ml。

2. 仪器设备

冻干实验装置采用上海东富龙科技有限公司研制的中试型实验用冻干设备, 并经我们一定的改造, 其设备原理如图 1 所示。

该设备主要由制冷系统、冷阱系统、加热系统、真空系统、电器控制系统和微机数据采集系统组成。压缩机组为全封闭活塞式制冷压缩机, 制冷工质为 R22; 冷阱系统与加热系统同时安置在冻干室内, 采用不锈钢盘管, 用档板与搁板间隔开; 通过中间介质硅油对搁板进行制冷与加热; 该设备可以通过掺冷阀控制搁板的温度; 真空系统主要是保持干燥室的真空度, 真空泵为上海真空泵厂生产的 2XZ-2 型旋片式真空泵, 极限真空度可以达到 6×10^{-2} Pa; 加热系统采用电加热器加热, 加热搁板温度可调整设定; 微机数据采集系统可实时采集温度数据。

该装置冷阱温度可以达到 -45°C , 预冻结过程中搁板温度最低可达到 -40°C , 在干燥过程中搁板温度可以在 -35°C -40°C 任意控制。

3. 主要试剂

通常在低温保存中使用的是渗透型低温保护剂 DMSO 和甘油。经多次实验在有核细胞悬液中加入 DMSO 和甘油后, 制品在冻干后期均会产生融化现象。因此在实验中选择了非渗透型的低温保护剂 PVP (聚乙烯吡咯烷酮, 化学纯试剂, 分子量约 10 000 -70 000, 广东汕头新宁化工厂进口分装) 和 HES (羟乙基淀粉, 分子量为 200000, 取代率 0.62, Sigma 公司)。同时根据 Crowe^[8,9] 等关于糖类对脱水的脂质双分子膜的稳定保护效果的描述, 在实验中选择了蔗糖 (分析

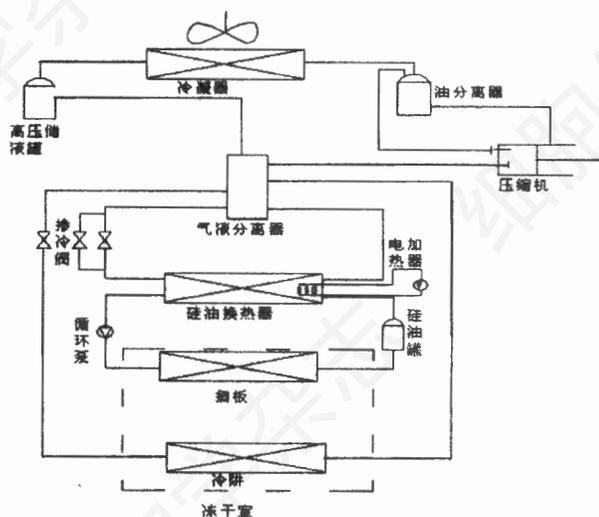


图 1 冻干设备原理图

纯, 分子量 342.3, 上海华东师范大学化工厂)、葡萄糖 (分析纯, 分子量 198.17, 威尔昆化学试剂有限公司)、麦芽糖 (生化试剂, 分子量 360.31, 中国医药集团上海化学试剂公司) 和海藻糖 (生化试剂, 分子量 378.33, 上海恒信化学试剂有限公司) 与 PVP 和 HES 同时作为冻干保护剂, 以比较不同配方的冻干保护效果。

4. 实验方法

1) 样品处理 按照 Rubinstein^[7] 等的方法, 将 6% 的羟乙基淀粉 (HES) 25ml 加入脐带血袋内完全混匀后经 500RPM 正置离心 500min, 用压浆板压出富含核细胞的血浆至一血浆转移袋内, 再经 1300RPM 正置离心 13min 后用自动压浆板压出血浆后收集富集脐带血的有核细胞 20ml。

2) 有核细胞悬浮液配置 实验使用的冻干容器是容量约为 2.5ml 的安瓿瓶, 每瓶中加入 1ml 有核细胞悬液; 其配方如表 1 中所示。

表 1 11 种实验用的冻干保护剂配方

浓度 序号	PVP (W/W)	HES (W/W)	蔗糖 (W/W)	葡萄糖 (W/W)	海藻糖 (W/W)	麦芽糖 (W/W)
1	30%		20%			
2	30%			20%		
3	30%				20%	
4	40%		20%			
5	40%			20%		
6	40%				20%	
7	30%		40%			
9		20%	20%			
10		20%		20%		
11	40%					20%

注: 按以上配置——PVP 或 HES 0.5ml 与 0.5ml 糖类均匀混合后加入到 1ml 分离好的脐带血有核细胞当中。

为了使保护剂充分混合,首先将各种保护剂配成一定浓度的溶液,再按1:1的比例混合后加入到1ml血液中,混合后的冻干细胞悬液体积为2ml。同时,为了减小血液与保护剂混合过程中由于溶质浓度而引起的损伤,先将两种保护剂均匀混合,在4℃静置10分钟后再用吸管将保护剂慢慢滴到血液中,并且边滴加边摇匀。

3) 冻干过程 按表1中配方配置好有核细胞悬液,之后将安瓿瓶均匀布置在冻干机搁板上。为了实时监测温度,在其中1号和4号瓶中分别布置两根热电偶,热电偶布置在安瓿瓶中心线上,接近瓶的底部。另置两根热电偶分别测量搁板和冷阱温度的变化。在冻干过程中通过冻干机前侧的玻璃观察窗口观察细胞悬液升华界面变化,并通过监测制品的温度变化监控冻干过程。本实验的预冻结过程是直接冻干机搁板上进行的。搁板温度最低可降至-40℃。我们监测得到的悬液的降温速率为2-3K/min。预冻结过程持续3h,此时细胞悬液温度降低至-38℃。预冻结结束后关闭对搁板制冷的电磁阀,开启对冷阱制冷的电磁阀,在冷阱温度达到-40℃后,开启真空泵,整个过程大约30min。由此开始进入一次干燥过程,在这个过程中通过掺冷阀控制整个一次干燥过程中搁板温度维持在-30℃。当升华界面完全消失并且细胞悬液温度达到-30℃,说明一次干燥已完成。此后提高搁板温度到+15℃,开始进入解吸干燥阶段,在这个阶段通过掺冷阀维持搁板温度在+15℃,直至整个冻

干过程结束。

4) 复水 每组冻干样品原含有1ml脐血单核细胞,复水时在每组冻干后的样品中加入1ml磷酸盐缓冲液(PBS),PBS缓冲液由100mmol/L NaCl、9.4mmol/L Na_2HPO_4 和0.6mmol/L KH_2PO_4 (pH 6.8)组成。

5) 检测 冻干后的有核细胞复水后取样进行光镜检测观察细胞数目及形态的变化。在中科院上海生科院生化与细胞所流式细胞仪室分别进行了PI染色活性鉴定和CD34⁺细胞抗体跟踪检测。冻干后的有核细胞在检测之前进行复水,复水后立即取样进行检测。有核细胞的活性通过测定细胞碘化丙锭PI(propidium iodide staining)拒染率来确定。冻干后单核细胞群中CD34⁺细胞恢复情况通过进行FITC(fluorescein isothiocyanate)人CD34抗体来进行CD34⁺细胞标定,可测得CD34⁺细胞占有核细胞的比例。流式细胞仪型号为FACStar,采用FACSCalibur软件进行数据分析。

结果与分析

1. 冻干过程曲线

一次干燥过程持续38h,两次干燥过程持续11h,整个冻干过程持续时间为52.5h,此过程中温度的变化情况,即冻干曲线,示于图2。

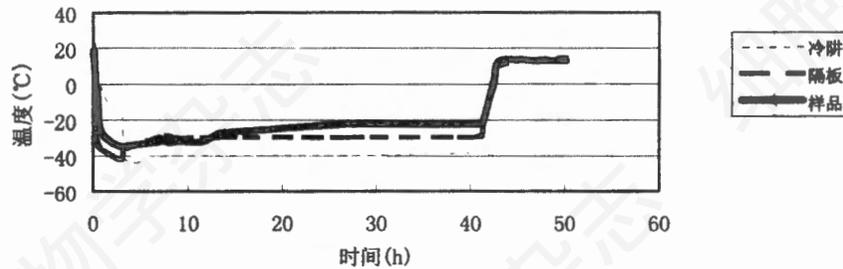


图2 冻干过程曲线

2. 复水

冻干后在每组样品中加入1ml PBS复水,发现冻干后的有核细胞在30s内能够完全复水,复水性极好。

3. 光学显微镜检查

首先对每组复水后的细胞进行细胞显微观察,均可以观察到形态完整的细胞,其形态与嗜碱性粒细胞极其相似。通过比较发现PVP的保护效果较HES好,显微观测下细胞形态更完整,且数目较多;而且适当提高PVP的浓度有一定的效果。在各种糖类保护剂的保护效果比较中,蔗糖和葡萄糖的保护效果要好于海藻糖、麦芽糖。

经400倍光学显微镜多次观察确定40%PVP+20%蔗糖的实验组4冻干保护效果最好,其冻干

后观察到的细胞数目约为新鲜样品细胞数目的15%。

4. 细胞存活率

为进一步确定有核细胞中CD34⁺细胞的存活,我们请中科院上海细胞所流式细胞仪室进行了PI染色活性鉴定和CD34⁺细胞抗体跟踪检测。PI染色是根据细胞凋亡时在细胞、亚细胞和分子水平上所发生的特征性改变,通过各种染色体荧光染料对凋亡细胞DNA可染性发生的改变及凋亡细胞形态上的改变影响细胞的光散色特性等原理检测细胞凋亡和存活率;而抗体跟踪检测是根据活细胞表面保留有较完整的抗原或受体,先用特异性鼠源性单克隆抗体与细胞表面相应抗原结合,再用荧光标记的第二抗体结合,根据所测定的荧光强度和阳性百分

率即可知相应抗原的密度和分布情况^[10]。

选取冻干后显微观测效果最好的实验组 4 的两个样品加入 1ml PBS 复水后立即经 2000RPM 多次离心后分别在流式细胞仪上进行 PI 染色活性鉴别和 CD34⁺ 抗体跟踪检测 CD34⁺ 细胞。检测结果见图 3-6。图 3 为有核细胞二维点图, R4 标记区域为淋巴细胞。复水后有核细胞进行 PI 染色活性检测, 有核细胞存活率为 55.67%, 见图 4; CD34⁺ 抗体跟踪检测得到 CD34⁺ 细胞占淋巴细胞的比率为 3.61%, 如图 5 所示。

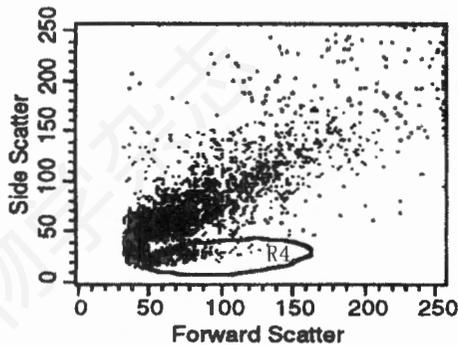


图 3 有核细胞二维点图
(其中标记 R4 的区域为淋巴细胞)

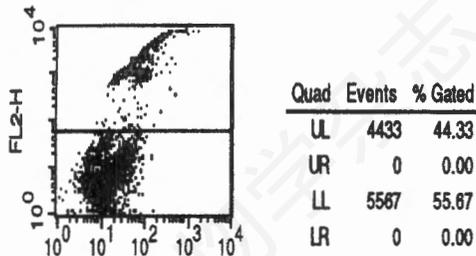


图 4 有核细胞 PI 染色活性检测
(存活率为 55.67%)

讨 论

综合以上的冻干过程和各项检测结果表明, 脐血有核细胞的存活率达到了 55.67%, 结果是相当喜人的, 也说明探索脐血造血干细胞的冷冻干燥保存是可行的。

但是由于目前阶段在整个冻干过程中, 主要是在冻干机内的实验过程不能够在无菌条件下进行, 所以现在还没有进行 CD34⁺ 集落形成的培养, 主要是冻干前后 CFU-GM 和 CFU-GEMM 的对比。在进一步的实验中考虑如何进行冻干前后 CFU-GM 和 CFU-GEMM 的集落培养实验, 进一步确定冻干

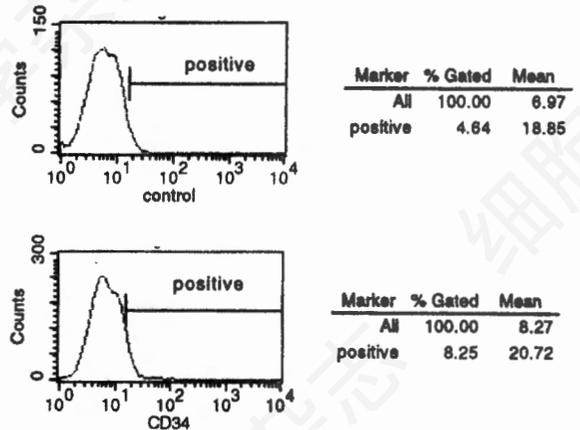


图 5 CD34⁺ 细胞跟踪检测

(占淋巴细胞为 3.61%, 其中 control 为参照组, CD34⁺ 细胞占淋巴细胞的百分率为 8.25% - 4.64% = 3.61%)。

后 CD34⁺ 的集落形成能力。另外在进一步的工作中根据以上的实验结果, 应在加入 10% 血清的情况下, 调整浓度, 以进一步提高冻干保存效果。

参 考 文 献

- [1] 沈柏均, 人类脐血 基础·临床. 天津科学技术出版社, 1995.
- [2] Rindler. Volker, Ingo Heschel, and Gvnter Rau. 1999, *Cryobiology*, **39**:228-235.
- [3] Rindler. Volker, S. Lvneberger, P. Schwindke, I. Heschel, and G. Rau. 1999, *Cryobiology*, **38**:2-15.
- [4] G. Spieles, I. Heschel and G. Rau. 1996, *Cryo-letters*, **17**:43-52.
- [5] Goodrich RP. 1992, *United States Patent*, No 5:171, 661.
- [6] Goodrich RP, Sowemimo-Coker SO, Zerez CR, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**:967.
- [7] Weinstein R, Sowemimo-Coker SO, Goodrich RP, *Transfusion Clin Biol*, 1995, **2**:427.
- [8] Charles J. Hunt, Susan E. Armitage, and David E. Pegg. 2003, *Cryobiology*, **46**:76-87.
- [9] Crowe, L. M., and Crowe, J. H. Hydration-dependent phase transitions and permeability properties of biological membranes. In "Membrane, Metabolism and Dry Organism" (A. Carl Leopold, Ed.), pp. 210-230. Cornell, Ithaca, NY 1986.
- [10] Gatlin, L. A., and Nail, S. L. 1994, *Bioprocess Technol.* **18**, 317-367.

RESEARCH ON FREEZE-DRYING OF THE NUCLEATED CELL OF HUMAN CORD BLOOD*

XIAO Hong Hai** LI Jun** HUA Ze Zhao** ,**** WANG Xin** GU Xue Lian** ZHENG Xiao Dong***

(* ** Institute of Refrigeration and Cryogenic Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093 China; *** Tofflon Ltd., Shanghai 201109 China)

ABSTRACT The research on hematogenic stem cells of cord blood has become more popular. How to preserve the cord blood stem cells have been researched by many researchers. At present, cord blood is preserved in ultra-low temperatures. In this research, it was preserved it by freeze-drying. Firstly, the samples with different concentrations of PVP, HES and saccharides were frozen to -40°C on the lyophilizer's shelf. Afterwards, they were vacuum-dried at selected shelf temperature at -30°C for main drying stage, and then at 15°C for second drying, the entire time of the freeze drying is 52.5hs. The dried samples were resuspended in an isotonic phosphate-buffered saline solution for rehydration and tested by microscope and flow cytometer. The protocol of 40% PVP + 20% sucrose had the best result. Flow Cytometer (FCM) measured the livability of the nucleated cells, and it was 55.67%. The ratio of the number of CD34^{+} to lymphocytes was 3.61%.

Key words: Human cord blood Freeze-drying Lyoprotectant CD34^{+} cell

* This work was supported by National Natural Science Foundation of China grant 59836240

**** Corresponding author. E-mail: tchua@sh163.net

小麦叶锈菌侵染过程的显微和超微结构*

王志英** 王冬梅***,**** 侯春燕** 刘娜*** 韩胜芬*** 马利华***

(河北农业大学** 园林与旅游学院*** 生命科学学院 保定 071001)

摘要 采用光学显微技术和电子显微技术对小麦叶锈菌的侵染过程进行了研究。发现叶锈菌从气孔侵入后在气孔腔内形成气孔下泡囊,然后分化出圆形的膨大体,由膨大体产生1-2初生菌丝,初生菌丝在寄主细胞间隙延伸扩展,与叶肉细胞壁接触后分化形成吸器母细胞,吸器母细胞进入寄主细胞后形成吸器。初生菌丝在吸器母细胞处产生分枝,形成次生菌丝在叶肉细胞间蔓延。在病原菌侵染早期(接种后8-24h),寄主细胞的超微结构变化并不明显。侵染中、后期(接种48-72h),被侵染叶肉细胞发生严重质壁分离,叶绿体膨胀变形,基粒片层排列疏松。线粒体嵴突退化。

关键词: 小麦叶锈菌 侵入过程 显微和超微结构

由小麦叶锈菌(*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)引起的小麦叶锈病是世界上最为严重的病害之一,也是我国麦区的一种主要病害。因此,了解病原菌的侵染过程对于探讨寄主植物与病原菌的互作机制尤为重要。我们课题组长期从事小麦抗叶锈生理机制的研究,对小麦抗叶锈防卫反应的信号及其转导机制以及过敏反应的诱发进行了大量的工

作^[1-3],但对该病的致病机理仍缺乏深入系统的研究。我们早期的研究表明,小麦叶锈菌的侵入方式

本文2003年4月21日收到,5月28日接受。

* 基金项目:河北省自然科学基金(编号:399172,301124)及河北省教委博士基金资助(编号:B2001211)。

**** 联系人。E-mail: Dongmeiwang63@hotmail.com