DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.03.26

外周血造血干细胞体外保存的研究进展

彭文珍　综述　　周宏远　傅继梁　审校

【中图分类号】 R331.1

外周血造血干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation，PBSCT)近年来在国内外得到广泛发展，已成为治疗恶性血液病和多种实体瘤的有效方法。与骨髓移植相比，PBSCT 有以下优点[1~5]：①外周血造血干细胞(PBSC)收集比较方便，供体无需麻醉，也无多部位穿刺抽髓的痛苦和不便，易被患者接受；②移植后受体造血功能重建快，免疫功能恢复早，感染、出血等并发症少，减少了抗生素和成份血的应用，降低了移植相关病死率，缩短住院时间，节约费用；③可从外周血管采集造血干细胞，对骨髓有浸润、纤维化或接受放疗不能采集骨髓的供体也可施行；④自体 PBSCT 者化疗后 PBSC 有高峰期，可获得足够的移植细胞；⑤与骨髓相比，外周血中肿瘤细胞混入较少，移植后复发率可低于自体骨髓移植。

PBSCT 的直接目的是重建被大剂量化疗、放疗所摧毁的造血功能，不少学者认为 PBSCT 可以长期、稳定、永久性性重建造血功能，增加患者长期生存率。而细胞的体外保存是 PBSCT 中关键的技术方法，现将 PBSC 体外保存技术的研究进展作一综述。

1　程控降温，液氮保存

程控降温指降温过程采用程序控制，程序结束后将 PBSC 置入液氮中保存。此时所有的酶活性均被抑制，环境中的射线也不会对细胞造成电离损伤，可较长期保存。该技术仅以二甲亚砜(DMSO)为冷冻保护剂，是经典的造血干细胞保存方法。

1.1　降温速率　虽然冷冻保护剂能减少或防止细胞内外的溶液作用，但是细胞对降温速率相当敏感，尤其是冷冻过程中液－固相转变的相变期。不同时期应该调整降温速率。降温速率适宜与否直接影响细胞存活率。

Gorin[6]用 10% DMSO 为冷冻保护剂，在电脑程序下以 1～3℃/min 的速率降温，温度降到－80℃时投入液氮。Rowley[7]提出二步降温法，其降温速率为：在－50℃之内，1～2℃/min；－90℃之内，5℃/min，然后液氮长期保存。刑献志等[8]应用 CS-3000plus 血细胞分离机对 52 例儿童及成人急性淋巴细胞性白血病，急性非淋巴细胞性白血病，非何杰金氏淋巴瘤患者按照二步降温法进行程序降温，液氮保存 6～78 天后，有核细胞、单个核细胞回收率和台盼蓝拒染率分别为 107.3%、98.7%和 96.2%。施红等[9]将 20 例大剂量化疗的肿瘤患者自体 PBSC 置于 Cryo-Med-1010 程控降温仪中以 1℃/min 降至－40℃，再以 10℃/min 降至－80℃后投入液氮保存。解冻后的细胞数、台盼蓝存活率和 CFU-GM(粒单系集落生成细胞)回收率分别为(79.24±4.64)%、(83.7±4.68)%和(75.24±9.11)%。陈虎等[10]提出更为简化的方法：将采集细胞中加入含 20% 人 AB 血清的 RPMI-1640 液和一定量抗凝剂，慢慢加入未稀释的 DMSO，使其终浓度为 10%.降温速率为 3～4℃/min，恒温 5 min。每分钟下降 5℃，降至－30℃；每分钟下降 1℃，降至－40℃；每分钟下降 3℃，降至－80℃，最后置入液氮保存。路继红等[11]对冷冻程序进行改进，提出降温程序为：在冷冻箱内由室温降至 4℃；以 1℃/min 的速率降至－10℃；以 20℃/min 的速率降至－70℃；以 20℃/min 的速率升温至－30℃；恒温 1 min；以 2℃/min 的速率降至－40℃；以 5℃/min 的速率降至－80℃，在－80℃等待 2～3 min，恒温 10 min；降至－80℃停止。置液氮罐气相内 30 min，然后下降至液相内。6 天后解冻，有核细胞，CFU-GM 和 $CD34^+$ 的回收率分别为 75%、78.8% 和 92%。

1.2　细胞浓度　对骨髓中造血干细胞的冷冻保存常用每毫升 2×10^7～4×10^7 的细胞浓度[7]。但是由于 PBSC 移植时所需细胞数多，如果按照此推荐浓度冻存细胞，则 PBSC 冷冻后的总容积约为 3 L 或更多。由于冷冻保护液中含有 DMSO，虽然为低毒物质，但是大量输入也会造成一定毒副作用；而且回输量过多可能出现高血压、头痛、心率失常等并发症。Rowley 提出 PBSC 可保存于自体血浆(HAS)或含有血浆蛋白的生理盐水或血浆蛋白浓度为 0.5%的保护液中，最终浓度在每毫升 3×10^7～8×10^8 之间。刘锦丽等[12]比较了推荐细胞浓度($\times10^7$)和高细胞浓度($\times10^8$)冷冻复温后有核细胞回收率、台盼蓝拒染率和 CFU-GM 存活率，二者无显著差异，提示可适当提高冻存时的细胞浓度，减少回输悬液量，减轻临床副作用。

1.3　冻存液浓度　Abrahamsen 等分别用 5%和 10% DMSO 冻存 PBSC，复苏后用流式细胞术分析两种冻存液浓度下 $CD34^+$ 细胞总数和活细胞数，发现 5% DMSO 冻存液的这两项指标均高于 10% DMSO 冻存液，而 $CD34^+$ 细胞凋亡和坏死的比例则低于后者[13]。在引起细胞冻存损伤的多种因素中，细胞的渗漏和氧自由基生成有重要作用。Limaye 等在冻存液中添加细胞膜稳定剂(海藻糖和氨基乙磺酸)和抗氧化剂(抗坏血酸、α-醋酸维生素 E 和过氧化氢酶)后发现，海藻糖＋10% DMSO 的冻存保护效果比单独使用 10% DMSO 更好，且保护效果可持续至少 1.5 年；氨基乙磺酸是一种天然的冻存保护剂，与 10% DMSO 联合使用也比单独使用 10% DMSO 的效果好。在三种抗氧化剂的冻存保护效果中以过氧化氢酶最高。由于过氧化氢酶和海藻糖的冻存保护机制完全不同，将过氧化氢酶＋海藻糖＋10% DMSO 联合使用，其保护效果比过氧化氢酶＋10% DMSO 和海藻糖＋10% DMSO 更好[14]。可见使用细胞膜保护剂和抗氧化剂对于复苏后血细胞重建有所裨益。

作者单位：610041　成都，四川大学基础医学与法医学院医学分子生物学开放实验室(彭文珍)，四川大学华西医院肿瘤中心(周宏远)；第二军医大学医学分子遗传实验室(傅继梁)

中国肺癌杂志
www.lungca.org

程控降温、液氮保存的优点是：冻存时细胞由液态转变为固态的相变期短，细胞损伤小，可长期保存。局限性在于需要昂贵的设备和稳定的液氮来源；操作步骤繁杂；单独以 DMSO 为冷冻保护剂，细胞解冻后容易凝集；移植物含大量 DMSO，回输后患者可发生不良反应[15~17]。

2 程控降温，－80℃保存

这是没有速控条件下的冷冻方法，简单可靠，易重复操作。但是由于这种降温方式在降温的过程中降温速度不恒定，冷冻保护剂选择和其对细胞回收率的影响备受重视。

2.1 冷冻保护剂

2.1.1 混合冷冻保护剂 Stiff 报道了以 6%羟乙基淀粉（HES）、5% DMSO 及 4%人血清白蛋白（ALB）混合物作为冷冻保护剂，用非程控降温将骨髓细胞置于－80℃冻存的方法。HES 是一种非穿透性保护剂，它在冷冻过程中能使细胞脱水，从而减少冷冻过程中细胞内冰晶形成。复温时，HES 还可以防止 DMSO 所致的细胞肿胀，对细胞膜有保护作用。

Makino 等[18]将该技术应用于 PBSC 的冻存中，发现将 PBSC 置于－80℃，细胞回收率、细胞活性、CFU-GM 回收率、BFU-E（早期红系集落生成细胞）回收率分别为（92.0±3.5）%、（88.4±3.6）%、（73.8±4.1）%和（82.2±6.9）%，与程控降温、液氮保存骨髓细胞的结果相似。

Halle 等[19]应用 1% HAS＋3.5% HES＋2.5% DMSO 作为 109 例 PBSCT 患者的 PBSC 冻存保护剂，结果发现有核细胞、$CD34^+$、CFU-GM 和 BFU-E 的回收率分别为 60.8%（11.2%～107.1%）、79.6%（6.7%～158.1%）、35.6%（0.3%～149.5%）和 32.6%（1.7%～151.1%），保存时间中位数为 7 周（1～98 周），表明与标准冻存程序相比，这种简便、便宜的冻存方法也可产生成功的移植。

张俊萍等[20]将 DMSO、HES、ALB 和 HAS 按不同比例组成 3 种冷冻保护剂，分别为 A 组：5% DMSO，6% HES，4% ALB；B 组：5% DMSO，6% HES，HAS；C 组：5% DMSO，4% ALB。测定冻存前后 CFU-GM、BFU-E、$CD34^+CD38^-$，及复苏后细胞拒染率，发现 5% DMSO＋6% HES＋HAS 的冷冻保护液效果最佳。受体 HAS 中可能含有更适于自体造血干细胞保存和增殖的部分细胞因子或者其他成分；而且使用 HAS 经济、方便，更重要的是可以避免血制品污染。

范华骅等[21]研制的 CP80 低温保护剂含 7.5%右旋糖酐、6.25% DMSO 和6.25% ALB，与样品混合后 DMSO 浓度为 5%。其理论依据是右旋糖苷与 HES 同为非穿透性保护剂，但它与 DMSO 联合使用可降低 DMSO 的毒性。由于 HES 很难溶解，因此以右旋糖酐代替 HES 制成 CP80。以 CP80 保存 PBSC 3 个月后，有核细胞回收率为（93.2±3.8）%，CFU-GM 回收率为（82.3±3.7）%，活细胞率为（85.0±6.19）%。对 4 例患者进行 PBSCT，患者在大剂量化疗后回输 CP80 冷冻保护液冻存的自身 PBSC，造血功能短期内均恢复。

同样，加入细胞膜稳定剂和抗氧化剂会产生冻存保护作用[14]。

2.1.2 单一冷冻保护剂 Galmes 等[22]首先提出以 10% DMSO 为保护剂，细胞冷冻后储存于－80℃的方法。Hernandez-Navarro 等[23]以 10% DMSO 和 HAS 混合物为冷冻保护液，将装有 PBSC 的冷冻袋放入 95%甲醇液中，直接置于－80℃保存，细胞回输后造血恢复情况与其他方法无明显差异。叶韵斌等[24]对使用 10% DMSO 单一保护液和 5% DMSO＋6% HES＋4% ALB 混合保护液的效果进行比较，发现在冻存 180 天以内二者差异不大，细胞活力在 85%以上，$CD34^+$阳性细胞比例、粒单集落数均维持治疗水平。作者认为用 10% DMSO 和 HAS 经－80℃低温冻存的 PBSC 进行自体移植是简单可行的。一定比例的 HAS 对于维持细胞活力是必需的，但血浆比例过高会造成细胞凝集，因此以 40%为宜。这与 Hernandez-Navarro 等的结果一致。Choi 等[25]在－80℃以 10% DMSO 冻存 PBSC，并对 24 例进行 PBSCT 的患者进行长期随访，以观察 PBSC 的长期移植稳定性，结果发现单核细胞、CFU-GM 和 $CD34^+$回收率的中位数分别为 93.4%、78.2%和 95.3%，而且通过对中性粒细胞、血小板移植时间和红细胞生成等指标的测定，表明－80℃冻存达到了令人满意的移植稳定性。

2.2 细胞浓度

临床冻存 PBSC 常采用每毫升 $0.5\times10^8\sim1.0\times10^8$ 的细胞浓度。但是随着动员后采集量的增加，PBSC 可超过 $10^{10}\sim10^{11}$。按照原来的细胞浓度配制给冷冻保护剂和临床都带来极大困难[10]。张俊萍等[20]比较 1×10^8/ml、2×10^8/ml 及 4×10^8/ml 三组细胞浓度的冷冻效果，测定复苏后细胞活力、细胞集落形成能力及 $CD34^+CD38^-$细胞回收率，三组之间无显著性差异。但是高浓度细胞冻存易发生细胞凝集，需加入 20% ACD-A 抗凝剂抗凝。ACD-A 能够与钙离子结合而发挥抗凝作用，且在临床应用多年，具有安全性高，不良反应轻的优点，为高浓度细胞冻存提供了保障。

对于非程控降温，－80℃冻存的方法能否对 PBSC 进行长期保存，还存在争议。Katayama 等[26]应用此方法对 PBSC 进行冻存，5 年后复苏，发现细胞活性为 80%，BFU-E 回收率为（91.0±26.0）%，CFU-GM 回收率为（70.4±30.0）%，各项指标均未受到明显影响，作者认为这种方法至少可保证 5 年的长期保存。Inada[27]用 6% HES 和 5% DMSO －80℃冻存 PBSC，2、3、5 年后，CFU-GM 的回收率分别为 74%、56%和 21%，表明用这种方法冻存 3 年后的 PBSC 可成功用于 PBSCT。

3 非冷冻保存

McElwain、Mangalik、Burnett 等分别将骨髓造血干细胞在 4℃保存 8、72 和48 h后进行回输，并取得了成功。有鉴于此，Hechler 等[28]将 PBSC 加入 ACD-A 抗凝后，在 4℃下保存 5 天后测定细胞活性和 CFU-GM、BFU-E、CFU-GEMM（粒、红、巨核及单核系集落生成细胞）回收率，分别为 79.7%、65.3%、55.1%、61.8%，认为 4℃保存 PBSC 是安全的。Ager 等[29]将 4℃保存 4 天的 PBSC 给患者回输后也达到了满意效果。张东华等[30]将患者PBSC、HAS、ACD-B 保养液（HAS 与保养液比例为 8∶1）的混合物于 4℃保存，分别于 0、24、48、72、96 和 120 h测定台盼蓝拒染率和 CFU-GM 回收率。随着时间延长，虽然这两项指标均有下降，但是 120 h 时细胞活性仍然达到 66%～78%，CFU-GM回收率达（61.8±20.8）%，与 Hechler 等的结果一致。陈勤奋[31]将 6 例患者PBSC 4℃保存 48 h 后回输，结果患者均获得造血重建。

中国肺癌杂志
www.lungca.org

非低温 4℃保存 PBSC，简化了移植过程，无需加入冷冻保护剂，避免冻存过程对细胞的损害，仅需要骨髓保养液，可减少回输时的毒副作用；减少 PBSC 在体外污染的机会；有利于造血重建。因此它是一种简便可行，安全可靠，经济有效体的外保存方法。缺点是保存时间较短，不宜超过 72 h，当预处理方案为 3～4 天时可考虑选用此方法。

4 小结

三种 PBSC 的体外保存方法各有其优点和局限性。程控降温、液氮保存的方法效果可靠，但是由于含有大量 DMSO，回输时易产生毒副作用；而且降温程序复杂，需要昂贵仪器和稳定液氮来源。非程控降温、－80℃冻存的方法操作简便，所需费用少，可长期保存，效果与程控降温、液氮保存相近。4℃非冷冻保存经济方便，对干细胞不会造成冻存过程中的损伤，回输时无 DMSO 毒副作用，但保存时间短，只适于 3～4 天预处理方案。各级医院可根据设备情况和患者治疗措施，因地制宜地选用 PBAC 体外保存方法。

参 考 文 献

1 Bell AJ，Hamblin TJ，Oscier DG. Circulating stem cell autografts. Bone Marrow Transplant，1986，1(2)：103-110.

2 To LB，Juttner CA. Peripheral blood stem cell autografting：a new therapeutic option for AML？Br J Haematol，1987，66(3)：285-288.

3 Henon PR，Butturini A，Gale RP. Blood-derived haematopoietic cell transplants：blood to blood？Lancet，1991，337(8747)：961-963.

4 Matsuda Y，Hara J，Osugi Y，et al. Allo-geneic peripheral stem cell transplantation using positively selected CD34+ cells from HLA-mismatched donors. Bone Marrow Transplant，1998，21(4)：355-360.

5 Reiffers J，Goldman J，Armitage JO (ed). Blood Stem Cell Transplantation. Paris：Martin，Duntz，1998. 19-36.

6 Gorin NC. Collection，manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. Clin Haematol，1986，15(1)：19-48.

7 Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation：a review of current techniques. J Hematother，1992，1(3)：233-250.

8 邢献志，潘惠明，阴继霞，等. 100 例次外周血干细胞低温冷冻保存效果分析. 广东医学，1998，19(10)：735-736.

9 施红，靳黎清，朱玲，等. 自体外周血造血干细胞的动员和采集及冷冻研究. 实用肿瘤学杂志，1999，12(2)：90-91.

10 陈虎. 外周血造血干细胞的采集与处理. 见：达万明，裴雪涛主编. 外周血干细胞移植. 第 1 版. 北京：人民卫生出版社，2000. 91-103.

11 路继红，欧英贤，白海，等. 程控降温后液氮保存对自体外周血造血干细胞含量和活性的影响. 西北国防医学杂志，2001，22(3)：245-247.

12 刘锦丽，王彩，栾文英. 干细胞冻存中细胞浓度对冻存效果影响的观察. 吉林医学院学报，1998，18(1)：32-33.

13 Abrahamsen JF，Bakken AM，Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. Transfusion，2002，42(12)：1573-1580.

14 Limaye LS，Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. J Hematother Stem Cell Res，2001，10(5)：709-718.

15 Kessinger A，Schmit-Pokorny K，Smith D，et al. Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant，1990，5 Suppl 1：25-27.

16 Davis JM，Rowley SD，Braine HG，et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. Blood，1990，75(3)：781-786.

17 Okamoto Y，Takaue Y，Saito S，et al. Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. Transfusion，1993，33(7)：578-581.

18 Makino S，Harada M，Akashi K，et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at －80 degrees C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant，1991，8(4)：239-244.

19 Halle P，Tournilhac O，Knopinska-Posluszny W，et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at －80 degrees C，with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. Transfusion，2001，41(5)：667-673.

20 张俊萍，石远凯，何小慧，等. 不同冷冻保护剂对外周血干细胞保存的研究. 癌症，2001，20(10)：1078-1082.

21 范华骅，马庆，柏乃庆，等. 骨髓，脐血，外周血干细胞-80℃保存研究. 中国输血杂志，1998，11(1)：8-9.

22 Galmes A，Besalduch J，Bargay J，et al. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with －80 degrees C mechanical freezer with dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. Leuk Lymphoma，1995，17(1-2)：181-184.

23 Hernandez-Navarro F，Ojeda E，Arrieta R，et al. Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES，with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath：results in 213 cases. Bone Marrow Transplant，1998，21(5)：511-517.

24 叶韵斌，陈强，陈明水，等. 外周血干细胞冻存的探讨. 中国肿瘤临床与康复，2000，7(4)：38-40.

25 Choi CW，Kim BS，Seo JH，et al. Long-term engraftment stability of peripheral blood stem cells cryopreserved using the dump-freezing method in a －80 degrees C mechanical freezer with 10% dimethyl sulfoxide. Int J Hematol，2001，73(2)：245-250.

26 Katayama Y，Yano T，Bessho A，et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant，1997，19(3)：283-287.

27 Inada H. Cryopreservation and engraftment potential of peripheral blood stem cells：pediatric experience. Kurume Med J，2001，48(2)：151-157.

28 Hechler G，Weide R，Heymanns J，et al. Storage of noncryopreserved periphered blood stem cells for transplantation. Ann Hematol，1996，72(5)：303-306.

29 Ager S，Mahendra P，Jestice HK，et al. The use of non-cryopreserved peripheral blood progenitor cells in autologous transplantation. Bone Marrow Transplant，1995，16(4)：633-634.

30 张东华，刘文励，杨忠心，等. 非冷冻保存外周血干细胞移植的初步研究. 中国输血杂志，1999，12(1)：19-20.

31 陈勤奋，谢彦晖，李佩，等. ＋4℃保存自体外周血干细胞移植治疗恶性淋巴瘤. 白血病，2000，9(3)：161-162.

（收稿：2003-04-04　　修回：2003-05-15）

（本文编辑　张世雯）

中国肺癌杂志
www.lungca.org