

影响外周血CD34⁺细胞纯化的相关因素

白雯, 白槟, 王黎明, 周建军, 张聪, 刘涛

Related factors affecting peripheral blood CD34⁺ cell purification

Bai Wen, Bai Bin, Wang Li-ming, Zhou Jian-jun, Zhang Cong, Liu Tao

Cell Therapy Center, the 323 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Bai Wen, Associate chief technician, Cell Therapy Center, the 323 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China
bai_wen_323@126.com

Correspondence to: Wang Li-ming, Master, Chief physician, Cell Therapy Center, the 323 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China
wanglm@fmmu.edu.cn

Received: 2010-08-25
Accepted: 2010-10-13

解放军第三二三医院细胞治疗中心, 陕西省西安市 710054

白雯, 女, 1965年生, 陕西省西安市人, 汉族, 2000年解放军第三二三医院检验系毕业, 副主任技师, 主要从事临床检验研究。
bai_wen_323@126.com

通讯作者: 王黎明, 硕士, 主任医师, 解放军第三二三医院细胞治疗中心, 陕西省西安市 710054
wanglm@fmmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)45-08460-04

收稿日期: 2010-08-25
修回日期: 2010-10-13
(20100825007/W · Q)

Abstract

BACKGROUND: Hemopoietic stem cells have the potential of self replication and renewal. CD34⁺ cells have the marker of hemopoietic stem cells.

OBJECTIVE: To analyze the related factors that affect the peripheral blood CD34⁺ cell purification.

METHODS: From 90 cases of patients, the peripheral blood were collected, after human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 5 μg/kg·d mobilizing for 1-3 days, using COBE machine mononuclear cells fluid 80-100 mL was collected, the CD34⁺ stem cells were purified by Clini MACS.

RESULTS AND CONCLUSION: The mean value of CD34⁺ cells was $(1.73 \pm 1.15) \times 10^7$ in 90 cases. Using flow cytometry, the positive rate of CD34⁺ cells was more than 80%. When the circulation blood liquid singly collected by COBE machine was 980-1100 mL, it was useful for CD34⁺ cells collection ($P = 0.005$). After mobilizing, when the white blood cell concentration was $(16-21) \times 10^9/L$, it was useful for CD34⁺ cells collection ($P < 0.05$); when the general ratio of middle cells to lymphocytes was more than 11%, it was useful for CD34⁺ cell collection ($P < 0.05$). When the concentration of blood platelet in mononuclear cells was less than $2 \times 10^9/L$, it was useful for CD34⁺ cell collection ($P < 0.05$); when the patient's age was younger than 16 years, the number of collected CD34⁺ cells was high ($P = 0.003$). Moreover, the temperature of CD34⁺ cells, the magnetism marker, the eccentricity of treating cells, all could affect the CD34⁺ cells collection. Results indicate that the CD34⁺ cells purified by Clini MACS machine could fit the clinical need and keep good experiment stability and repeatability. To improve the CD34⁺ cells collection, the related factors which affect the peripheral blood CD34⁺ purification should be carefully considered.

Bai W, Bai B, Wang LM, Zhou JJ, Zhang C, Liu T. Related factors affecting peripheral blood CD34⁺ cell purification. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(45): 8460-8463.
[http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 造血干细胞具有良好的自我复制和更新的能力, CD34⁺细胞具备有造血干细胞的标志。

目的: 分析影响外周血 CD34⁺细胞纯化的因素。

方法: 90例患者, 经粒细胞集落刺激因子 5 μg/(kg·d)动员 1~3 d 后, 应用 COBE 血细胞分离机采集外周血单个核细胞液 80~100 mL, 经 Clini MACS 免疫磁珠分选技术纯化 CD34⁺细胞。

结果与结论: 90例 CD34⁺细胞平均数为 $(1.73 \pm 1.15) \times 10^7$, 经流式细胞仪分析, CD34⁺细胞阳性率大于 80%。COBE 血细胞分离机单次收集的循环血量在 980~1100 mL 时, 利于 CD34⁺细胞收集 ($P = 0.005$); 动员后白细胞浓度在 $(16 \sim 21) \times 10^9/L$ 时, 利于 CD34⁺细胞收集 ($P < 0.05$); 中间细胞和淋巴细胞总比例超 11% 时, 利于 CD34⁺细胞收集 ($P < 0.05$); 单个核细胞液血小板小于 $2 \times 10^9/L$ 时, 利于 CD34⁺细胞的收集 ($P < 0.05$); 年龄小于 16 岁, CD34⁺细胞数高 ($P = 0.003$); CD34⁺细胞抗体的温度、磁性标记及细胞处理时离心力的大小, 均有影响。结果提示, 经 Clini MACS 免疫磁珠细胞分选技术纯化的 CD34⁺细胞能满足临床需要, 实验稳定性好, 重复性好; 注重相关因素的影响, 可提高纯化的 CD34⁺细胞数量。

关键词: 外周血; CD34⁺细胞; 纯化; 免疫磁珠分选技术

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.45.023

白雯, 白槟, 王黎明, 周建军, 张聪, 刘涛. 影响外周血 CD34⁺细胞纯化的相关因素[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45):8460-8463. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

造血干细胞具有良好的自我复制和更新的能力, CD34⁺细胞具备有造血干细胞的标志^[1-2]。国内外已有将CD34⁺细胞用于临床治疗多种疾病的病例报道^[3-4], 但应用纯化的CD34⁺细胞作再生修复治疗则较少报道。应用免疫磁珠分选技术(magnetic activated cell sorting, MACS)可以明显提高CD34⁺细胞的纯度^[5-7]。从2008-04以来, 本实验室对90例外周血单个核细胞应用MACS技术纯化CD34⁺细胞的结果及

相关因素分析。

1 对象和方法

设计: 细胞学体外对照观察。

时间及地点: 于2008-04/2010-05在西安市解放军323医院细胞治疗中心实验室完成。

对象: 采用COBE血细胞分离机采集90例患者的单个核细胞液80~100 mL, 由本中心提供, 均经患者同意, 实验方案经医院医学伦理委员会批准。90例慢性难治性疾病的患者, 男77例, 女13例, 平均年龄 (27.57 ± 13.50) 岁。治

疗的疾病包括: 中枢神经系统损伤如脊髓损伤、脑损伤后遗症、脑血管病变等, 中枢神经系统变性性疾病如运动神经元病、小脑萎缩等, 风湿性疾病如类风湿性关节炎、强直性脊柱炎, 进行性肌营养不良等。所有患者均无血液系统疾病, 动员剂动员前血常规均正常。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
粒细胞集落刺激因子(G-CSF)	华北制药
球蛋白(2.5 g/50 mL)	四川远大蜀阳药业股份有限公司
CliniMACS 细胞分选仪及配套管道、CliniMACS 配套试剂	德国
清华同方 THMM-GH 多媒体超高分(2万倍)显微镜	清华同方
OLYMPUS 显微镜、Sysmex SF 3000 血液分析仪	日本
血液保存液(I), 成分为枸橼酸钠、枸橼酸等	四川南格尔生物医学股份有限公司
流式细胞检测仪及 CD34 鼠抗人单抗(PE 标记)	美国 BD 公司

实验方法:

外周血单个核细胞液的采集及转移: 患者经粒细胞集落刺激因子(G-CSF), 5 μg/(kg·d), 两三天动员后, 应用 COBE 血细胞分离机按自动干细胞程序采集单个核细胞液 80~100 mL (共收集 8~10 次, 单次收集 10 mL)。用体积分数为 75% 乙醇对单个核细胞液袋子喷洒消毒, 并在百级超净台(XYJ-1450 型)中, 将单个核细胞液直接转移入“八爪袋”(CliniMACS 细胞分选仪配套管道, 内含带 8 个可控旋钮的细胞袋)。

单个核细胞液的分离: 往“八爪袋”的细胞液中加入 2 倍体积的 PBS 缓冲液(含 1 mmol/L EDTA, pH 值为 7.2), 用时加入 10% 人血白蛋白, 终浓度为 5 g/L, 800 r/min 离心 15 min, 弃上清, 除去较高的血小板及血浆成分, 剩约 100 mL 细胞液待标记。

CD34⁺细胞的标记: 在约 100 mL 的细胞液中, 加入 3 mL 的球蛋白, 阻断非特异性结合的抗体, 在 18~25 °C 条件下, 用 VSN-5 三维摇床摇晃 5 min, 使其充分混匀; 续加入 CD34⁺ 抗体 7.5 mL (每 5×10⁶ 个 CD34⁺ 细胞加入 100 μL 抗体), 继续三维摇床摇晃 30 min, 使 CD34⁺ 抗体充分混匀; 用 2 倍体积的 PBS 洗涤 850 r/min 离心 15 min, 弃上清留细胞液约 100 mL, 重复 2 次; 洗涤后, 上 CliniMACS 细胞分选仪进行分选, 分别分选出 CD34⁺ 细胞约 45 mL、CD34⁻ 细胞约 280 mL。显微镜计数 CD34⁺ 细胞量, CD34⁻ 细胞用 Sysmex SF3000 血液分析仪计数。用锥虫蓝测定细胞活率。

流式细胞仪测定 CD34⁺ 细胞百分率: 取纯化的细胞 1×10⁵ 个, 加入 PE 标记的鼠抗人 CD34⁺ 单抗 20 μL, 混匀后置室温孵育 30 min, 用 PBS 洗 3 遍, 弃上清, 将细胞重新悬浮于 500 μL PBS 中, 进行流式细胞仪检测。

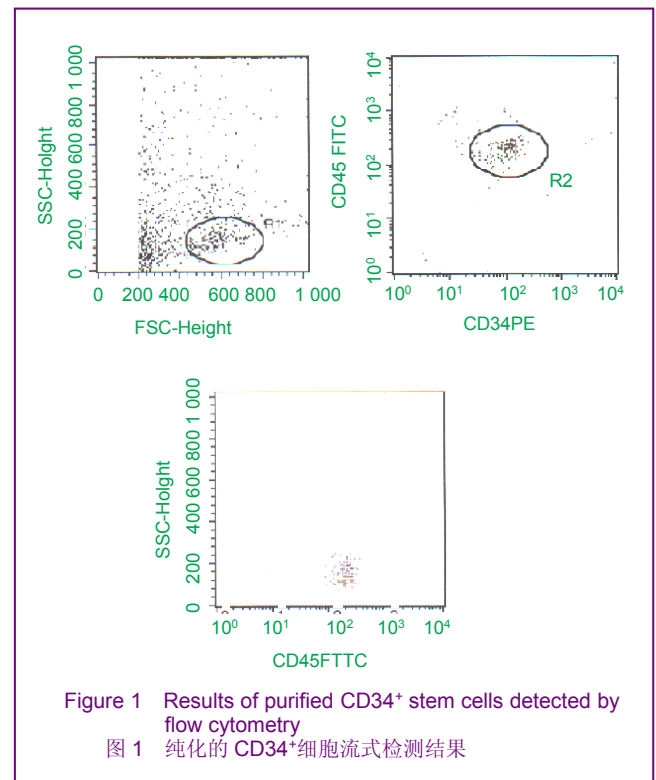
主要观察指标: G-CSF 动员后的白细胞数、中间细胞和淋巴细胞总比例, 年龄, COBE 血细胞分离机单次收集的循环血量, 单个核细胞液的血小板数, 纯化前后三系细胞的变化, CD34⁺ 细胞的数量。

统计学分析: 在通讯作者指导下, 由第一作者采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 计量资料首先进行正态性检验, 各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本间方差齐性采用 *F* 检验, 均数比较采用 *t* 检验(方差齐性)或近似 *t* 检验(方差不齐), 以 *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 外周血单个核细胞样本数量分析 选取的 90 例样本均进入结果分析, 中途无脱落。

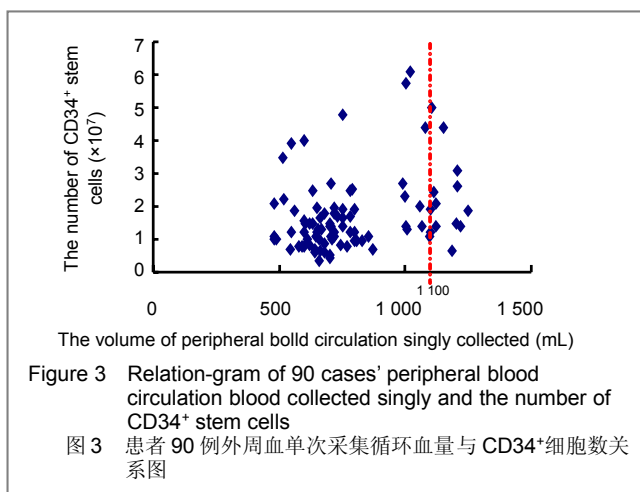
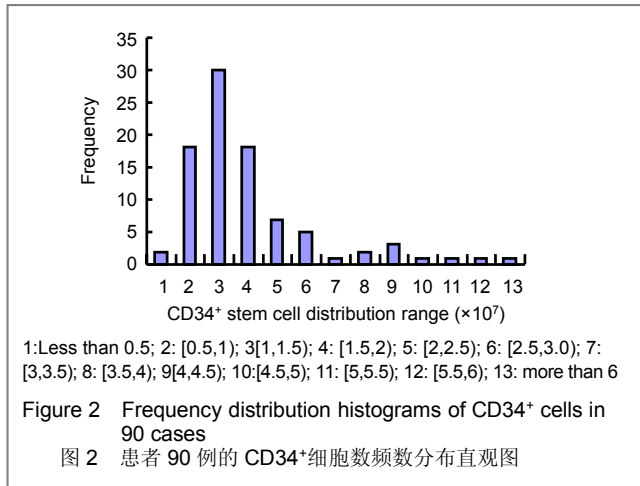
2.2 CD34⁺ 细胞的纯度 见图 1。



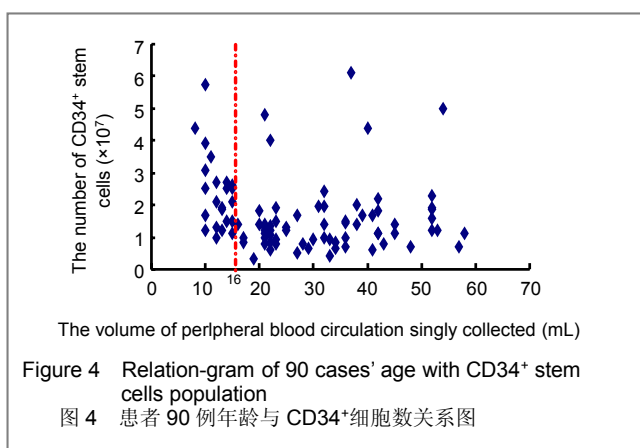
2.3 CD34⁺ 细胞纯化结果 CD34⁺ 细胞平均数为 $(1.73 \pm 1.15) \times 10^7$, 锥虫蓝测定细胞活率为 96%; 90 例 CD34⁺ 细胞数频数分布直观图见图 2, CD34⁺ 细胞的峰值阶段为 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^7$ 。临床治疗用细胞量至少为 0.5×10^8 , 本实验室分选的 CD34⁺ 细胞数平均为 1.73×10^7 , 满足临床需要^[9-11]。

2.4 CD34⁺ 细胞数影响因素 COBE 血细胞分离机单次采集时的循环血量: 采用 COBE 血细胞分离机采集外周血单个核细胞, 之前每收集一次的循环血量一般在 800 mL 以下, CD34⁺ 平均为 $(1.46 \pm 0.85) \times 10^7$; 之后探索将每收集一次的循环血量改为 980 mL 以上(1 000 mL 左右), CD34⁺ 阳性细胞数平均为 $(2.46 \pm 1.51) \times 10^7$; *F* 检

验两组数据方差不齐 ($P < 0.01$), 采用近似 t 检验, $P=0.005$, 两组数据差异具有显著性意义。当单次收集循环血量大于 980 mL 时, 利于 CD34⁺ 细胞收集。单次收集循环血量大于 1 100 mL 以后, CD34⁺ 性细胞数并不随循环血量的增加而提高, 反而成下降趋势。见图 3。



年龄对 CD34⁺ 细胞的影响: 90 例年龄与 CD34⁺ 的细胞数见图 4。



以 16 岁为界, 分成 2 组, 年龄小于 16 岁的 24 例, CD34⁺ 细胞数平均为 $(2.33 \pm 1.18) \times 10^7$, 年龄大于 16 岁的

66 例, CD34⁺ 细胞数平均为 $(1.50 \pm 1.09) \times 10^7$ 。F 检验提示两组系等方差 ($P=0.68$), 采用 t 检验, 两组差异具有显著性意义 ($P=0.003$)。因此, 年龄小于 16 岁, 利于 CD34⁺ 细胞收集, 年龄偏小者, 趋势更好 ($r=-0.50$)。年龄大于 16 岁后, 随年龄的增长, CD34⁺ 细胞数无明显变化。

动员后白细胞浓度及中间细胞和淋巴细胞总比例对 CD34⁺ 细胞的影响: 通过 90 例纯化发现, 动员后白细胞浓度在 $(16 \sim 21) \times 10^9 L^{-1}$ 时, 利于提高 CD34⁺ 细胞收集, 而且在这一范围之内 的 19 例, 无一例 CD34⁺ 细胞小于 1×10^7 ; 中间细胞和淋巴细胞总比例 (M+L)% 大于 11% 时, 利于 CD34⁺ 细胞收集, 但随着总比例进一步增大, CD34⁺ 细胞数变化不明显 (相关系数为 -0.015)^[12-13]。按动员后白细胞浓度将 90 例分为 3 组, 在 $(16 \sim 21) \times 10^9 L^{-1}$ 之间的 19 例为 A 组, 小于 $16 \times 10^9 L^{-1}$ 的 16 例为 B 组, 大于 $21 \times 10^9 L^{-1}$ 的 52 例为 C 组, 3 组 CD34⁺ 细胞均值比较见表 1。按动员后中间细胞和淋巴细胞总比例是否大于 11% 分为两组, CD34⁺ 细胞均值比较见表 2。

表 1 各组 CD34⁺ 细胞均值比较
Table 1 Comparison of mean value of CD34⁺ cells in each group

Group	n	CD34 ⁺ cell population ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)	P (vs A)
A	19	2.56 ± 1.45	-
B	16	1.67 ± 0.81	0.004
C	52	1.47 ± 0.99	0.025

Mobilized white blood cell concentration A: between 16 and 21 $\times 10^9 L^{-1}$; B: less than 16 $\times 10^9 L^{-1}$; C: more than 21 $\times 10^9 L^{-1}$

表 2 动员后 90 例中间细胞和淋巴细胞总比例不同时 CD34⁺ 细胞数比较
Table 2 Comparison of 90 cases' CD34⁺ stem cells population between different ratios of intermediate and lymphocyte cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CD34 ⁺ cell population ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)	P
(M+L) < 10%	21	1.19 ± 0.53	0.002
(M+L) ≥ 10%	69	1.87 ± 1.29	

Mobilized white blood cell concentration A: between 16 and 21 $\times 10^9 L^{-1}$; B: less than 16 $\times 10^9 L^{-1}$; C: more than 21 $\times 10^9 L^{-1}$

单个核细胞液中血小板浓度对 CD34⁺ 细胞的影响: 对比 90 例单个核细胞液中血小板数量, 显示血小板 $< 2 100 \times 10^9 L^{-1}$ 时, 与血小板 $> 2 100 \times 10^9 L^{-1}$ 相比, 利于 CD34⁺ 的收集。见表 3。

表 3 动员后 90 例单个核细胞液中血小板浓度不同时 CD34⁺ 细胞数比较
Table 3 Comparison of 90 cases' CD34⁺ stem cell population between different platelet concentrations in mononuclear cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CD34 ⁺ cell population ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)	P
Platelet < 2 100 $\times 10^9/L$	37	2.14 ± 1.15	< 0.05
Platelet > 2 100 $\times 10^9/L$	53	1.48 ± 0.68	

分选前后三系细胞的变化:90例分选前后有核细胞、红细胞、血小板数,除去7例分选后粒细胞数明显高于分选前,考虑系检测错误所致,83例分选后有核细胞数占分选前平均比例为95%,红细胞占88%,血小板占75%。

3 讨论

目前用于分离纯化间充质干细胞的方法主要有4种^[14]:①密度梯度离心法。②贴壁法。③免疫磁珠分选技术(MACS)。④流式细胞仪分选法。纵观几种方法,MACS技术无需培养,实验室条件易达到,全封闭式管道保证纯化的安全性,可获得明确的目的细胞,细胞在分离后生物活性保持好^[15]。MACS磁性微珠非常小,一般情况下不会活化分选的细胞,也不干扰细胞功能及影响细胞活性,阳性细胞分选后不需要解离微珠,细胞可以立即使用^[16]。本组90例患者干细胞治疗无1例出现不良反应;随访3~28个月,无一例出现干细胞治疗相关并发症。

在对90例分选过程中,作者体会到,动员后白细胞数量并不是越高越好,白细胞过高,细胞偏于成熟阶段,推测可能是CD34⁺细胞已趋于分化。白细胞浓度在(16~21)×10⁹ L⁻¹之间时,中间细胞和淋巴细胞的比例要大于10%,即可进行外周血采集^[17]。在采集中单次采集循环血量在1 000~1 100 mL为宜,循环血量少,收集的造血干细胞含量也少;循环血量过多,同时增加了粒细胞和血小板的收集,会直接影响CD34⁺细胞的标记。当年龄小于16岁时,年龄偏小者,趋势更好,这可能因为年龄越幼小,体内造血干细胞越丰富。

另外,本实验室采集50例骨髓血标本进行CD34⁺细胞纯化,其中43例年龄小于16岁,CD34⁺细胞数为(1.47±0.62)×10⁷ L⁻¹。与外周血组年龄小于16岁的24例[CD34⁺细胞数为(2.33±1.18)×10⁷ L⁻¹]比较,显示外周血组优于骨髓组($P=0.002$),与文献报告相符合^[18-19]。

在动员采集造血干细胞之前必须检查血脂,过高的血脂会影响CD34⁺抗体的包被,高血脂患者需将血脂降至正常后再进行动员。CD34⁺抗体标记时,温度必须保持在18~25℃,过高或过低的温度都不利于抗体的标记。90例中,有9例单个核细胞液在4℃冰箱保存8~12 h后再经MACS纯化,与81例相比,CD34⁺细胞数无明显变化。按文献报道,CD34⁺占单采后的单个核细胞的1%左右^[20],结合本组实验三系细胞纯化前后的变化显示,在离心纯化过程中,单个核细胞损失约4%,细胞损失较少,表明本实验稳定性及重复性好。红细胞损失较白细胞多,可能与多次离心造成红细胞的破碎有关。经轻离心去除血小板,但纯化后仍占75%,可能有

一部分红细胞碎片误计入血小板,这些数量较高的血小板,影响CD34⁺的标记和纯化^[21]。因此注重以上相关因素的影响,可提高外周血单个核细胞纯化CD34⁺细胞的数量。

4 参考文献

- [1] Zhao CH.Beijing: Chemical Industry Press. 2006:70-111. 赵春华.干细胞原理、技术与临床[M].北京:化学工业出版社,2006:70-111.
- [2] Martin PA,Coveney C,Kraft A,et al.Commercial development of stem cell technology : lessons from the past,strategies for the future.Regen Med.2006;1(6):801-807.
- [3] Bellantuono I.Haemopoietic stem cells.Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(4):607-620.
- [4] Wei YQ,Liu QF,Sun JX,et al.Zhonghua Neike Zazhi.2008;47(8):650-653. 魏永强,刘启发,孙竞徐,等.自体纯化CD34⁺细胞移植治疗系统性红斑狼疮的免疫重建研究[J].中华内科杂志,2008,47(8):650-653.
- [5] Singhal S,Powles R,Trelea ven J,et al.A low CD34⁺ cell dose result in higher mortality and poor survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical sibling:should 2 × 10⁶ CD34 cells/kg be considered the minimum threshold? Bone Marrow Transplant.2000;26:489-496.
- [6] Despres D,Flohr T,Uppenkamp M,et al.CD34⁺ cell enrichment for autologous peripheral blood stem cell transplantation by use of the CliniMACs device.J Hematother Stem Cell Res.2000;9:557-564.
- [7] Liu JZ,Wang Q,Zheng L,et al.Yixue Linchuang Yanjiu. 2008;25(3):399-401. 刘竞争,王前,郑磊,等.脐带血CD34⁺细胞免疫磁珠分选及其意义[J].医学临床研究,2008,25(3):399-401.
- [8] Huang HY.Beijing: Science Press. 2009:236-245. 黄红云.中枢神经修复学[M].北京:科学出版社,2009:236-245.
- [9] Wang LM,Zhou JJ,Bai W,et al.Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2010;(20):66-68. 王黎明,周建军,白雯,等.自体分选干细胞治疗15例Duchenne型肌营养不良症的临床观察[J].中国现代医学杂志,2010,(20):66-68.
- [10] Wang LM,Zhou JJ,Bei W,et al.Yinanbing Zazhi. 2009;8(6):365. 王黎明,周建军,白雯,等.自体纯化干细胞治疗2型糖尿病合并多器官并发症1例[J].疑难病杂志,2009,8(6):365.
- [11] Wang LM,Zhou JJ,Bai W,et al.Xibe Guofang Yixue Zazhi. 2009;30(5):365. 王黎明,周建军,白雯,等.自体分选CD34⁺细胞治疗强直性脊柱炎2例[J].西北国防医学杂志,2009,30(5):365.
- [12] Cashen AF, I azarus HM ,Devine SM.Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? Bone Marrow Transplant.2007;39(10):577-588.
- [13] Pelus LM ,Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft.Leukemia.2008;22(3):466-473.
- [14] Gronthos S,Zannettino A C,Hay S I,et al.Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.J Cell.2003; 116:1827-1835.
- [15] Xu RR,Wang JY,Cui X,et al.Zhijiang Zhongxiyi Jiehe Zazhi. 2008;18(10):610-612. 徐瑞荣,王敬毅,崔兴,等.免疫磁珠分选系统在急性髓系白血病干细胞分离中的应用[J].浙江中西医结合杂志,2008,18(10):610-612.
- [16] Shu SN,Wei L,Fang F,et al.Biaoji Mianyi Fenxi yu Linchuang. 2006;(13):35-37. 舒赛男,魏来,方峰,等.免疫磁珠分选系统在分离大鼠骨髓肝细胞群中的应用[J].标记免疫分析与临床,2006,(13):35-37.
- [17] Li YF.Guoji Shuxue ji Xueyexue Zazhi. 2009;32(2):149-152. 李玉峰.外周血造血干细胞动员的研究进展[J].国际输血及血液学杂志,2009,32(2):149-152.
- [18] Saigawa T,Kato K,Ozawa T,et al.Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells.Circ J.2004;68(12):1189-1193.
- [19] McNiece I. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. Exp Hematol. 2004; 32(5):409-410.
- [20] Jin Y,Zhou J,Zhu B,et al.Zhongguo Shuxue Zazhi. 2005;(22):373-376. 金玉,周俊,朱兵,等.优化骨髓单个核细胞分离技术的分析[J].中国输血杂志,2005(22):373-376.
- [21] Liang HG,Zhang KM.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009,13(40):7825-7828. 梁宏刚,张开明.免疫磁珠法分选骨髓CD34⁺细胞:纯度影响因素的分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(40):7825-7828.