

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.002 [http://www.crter.org]

郭继强, 刘爱兵, 王东平, 王黎明. 密度梯度离心法分离脐血干细胞: 分离介质的筛选[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4189-4195.

密度梯度离心法分离脐血干细胞: 分离介质的筛选*

郭继强, 刘爱兵, 王东平, 王黎明

武警总医院医学实验中心, 北京市 100039

文章亮点:

1 文章使用3种质量浓度的聚蔗糖泛影葡胺分离液分离脐血单个核细胞, 用细胞计数法、活细胞染色法及流式细胞计数仪分析单个核细胞的表面标志, 以探讨密度梯度离心法分离人脐血干细胞分离介质的最佳浓度, 建立临床级干细胞分离应用方案。

2 结果显示, 质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL的聚蔗糖泛影葡胺分离液是分离间充质干细胞的最佳介质, 质量浓度(1.075 0±0.000 1) g/mL的聚蔗糖泛影葡胺分离液是分离造血干细胞的最佳介质, 两步法是分离脐带血干细胞的最佳流程。

3 系统研究了聚蔗糖液-泛影葡胺分离液分离脐带血干细胞最佳应用浓度, 建立了密度梯度离心法分离脐带血干细胞最佳分离流程。但密度梯度离心法尚不能分离纯化的干细胞群。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 人脐血; 密度梯度; 离心法; 单个核细胞; 间充质干细胞; 造血干细胞; 分离液; 密度; 流式细胞术; 操作流程

摘要

背景: 应用脐血分离干细胞的目的是获得以干细胞为主要群体的单个核细胞群, 密度梯度离心法是最简单有效的方法之一。密度梯度离心法使用的分离介质以聚蔗糖泛影葡胺最为常用, 但哪种浓度获得干细胞最多, 目前尚未深入研究。

目的: 探讨密度梯度离心法分离人脐血干细胞分离介质的最佳浓度, 建立临床级干细胞分离应用方案。

方法: 采用两步法分离脐血流程, 先用羟乙基淀粉沉淀脐血红细胞, 再使用质量浓度分别为(1.073 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1), (1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液, 分离沉淀脐血红细胞后的上清液, 得到单个核细胞, 分别计数细胞获得率及细胞存活率。采用流式细胞仪测定单个核细胞表面标志物, 将各亚组分绘制成直方图或散点图, 分析所得脐血单个核细胞中所含单个核细胞亚组分的比例和绝对数量。

结果与结论: 应用质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液可得到最大比例间充质干细胞群, 是分离间充质干细胞的最佳质量浓度。使用质量浓度(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液可得到较高比例的造血干细胞群, 是分离造血干细胞的最佳质量浓度。使用质量浓度(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液得到细胞总数最高, 但获得的间充质干细胞、造血干细胞比例最低。采用两步法分离干细胞流程, 建立严格的实验室条件和标准, 可获得密度梯度离心法分离人脐血干细胞的最佳分离方案。

Density gradient centrifugation for isolation of umbilical cord blood stem cells: Screening of separation medium

Guo Ji-qiang, Liu Ai-bing, Wang Dong-ping, Wang Li-ming

Medical Research Center, Armed Police General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract

BACKGROUND: The purpose for isolating stem cells from the cord blood is to obtain the mononuclear cell populations with the stem cells as the major group, and density gradient centrifugation is one of the simplest and most effective ways. Polysucrose diatrizoate is the most commonly used separation medium for density

郭继强★, 男, 1983年生, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗、干细胞治疗、肿瘤相关检验等方面的研究和临床应用。现工作单位为山西医学科学院生物治疗科。
guojiqiang6@163.com

通讯作者: 刘爱兵, 硕士生导师, 主任医师, 教授, 武警总医院医学实验中心, 北京市 100039
doctor_liuaibing@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)23-04189-07

收稿日期: 2012-10-22
修回日期: 2012-11-30
(20120401011/G-C)

Guo Ji-qiang★, Master,
Medical Research Center,
Armed Police General Hospital,
Beijing 100039, China
guojiqiang6@163.com

Corresponding author: Liu
Ai-bing, Master's supervisor,
Chief physician, Professor,
Medical Research Center,
Armed Police General Hospital,
Beijing 100039, China
doctor_liuaibing@
yahoo.com.cn

Received: 2012-10-22

Accepted: 2012-11-30

gradient centrifugation, but there is no in-depth research on which method can obtain more stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the optimal density of separation medium for isolating human umbilical cord blood stem cells using density gradient centrifugation method, and to establish the isolation method of stem cells for clinical application.

METHODS: Umbilical cord blood was separated with two-step method. Firstly, hydroxyethyl starch was used to sediment cord blood erythrocyte, and the suspension was obtained, then the separation media with three kinds of concentrations (1.073 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1) and (1.077 0±0.000 1) g/mL was used to isolate the suspension and the mononuclear cells were obtained. The harvest rate and the survival rate of the cells were counted. Their surface markers of mononuclear cells were identified with flow cytometry; histogram or scatter plot of each subset was plotted to analyze their proportions and absolute numbers of sub-cell populations.

RESULTS AND CONCLUSION: The separation medium with the concentration of (1.073 0±0.000 1) g/mL could obtain the mesenchymal stem cell populations with the largest proportion, which was the optimal density for isolating the mesenchymal stem cells. The separation medium with the concentration of (1.075 0±0.000 1) g/mL could obtain the hemopoietic stem cell populations with the larger proportion, which was the optimal density for isolating the hemopoietic stem cells. The separation medium with the concentration of (1.077 0±0.000 1) g/mL could obtain the largest number of stem cells, but the obtained mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells had the lowest proportion. Application of two-step method for isolating stem cells and the establishment of strict laboratory conditions and standards are the optimal programs for isolating the human umbilical cord blood stem cells using density gradient centrifugation method.

Key Words: stem cells; umbilical cord/umbilical cord blood stem cells; human umbilical cord blood; density gradient; centrifugation; mononuclear cells; mesenchymal stem cells; hemopoietic stem cells; separation media; density; flow cytometry; standard operating procedure

Guo JQ, Liu AB, Wang DP, Wang LM. Density gradient centrifugation for isolation of umbilical cord blood stem cells: Screening of separation medium. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(23):4189-4195.

0 引言

脐血由于其来源容易,所含细胞种类和数量比较多,比骨髓和外周血中的细胞更为原始,且其临床应用不涉及社会、伦理、法律方面的限制等优势。应用脐血造血干细胞治疗血液系统疾病^[1-2],无论技术、方法,还是基础研究均比较成熟。脐血间充质干细胞可以分化为成骨、软骨、脂肪细胞等^[3],内皮干/祖细胞治疗缺血性疾病,已经在临床有突出的疗效^[4]。国内、外分离脐血干细胞方法常采用磁珠/流式细胞分选法、脐血库仪器/羟乙基淀粉沉淀法和密度梯度离心法^[5-7]。由于目的不同,各类方法有其自身特点。磁珠法或流式细胞分选法应用相应单克隆抗体分离得到较纯的细胞群体,但细胞收获率较低,适宜做分析及科研应用。脐血库分离干细胞常用羟乙基淀粉沉淀和仪器离心分离法,分离的细胞量大、成分较多但混有大量红细胞,适合用作大量分离、储存干细胞。密度梯度离心法多采用Percoll、Ficoll分离液分离细胞,得到单个核细胞群,该细胞群成分复杂,纯度不高^[8-9]。但密度梯度离心法分离脐血单个核细胞由于细胞得率高、方法简单等突出优点,有望成为制备临床级干细胞的优选方法,分离介质以聚蔗糖泛影葡胺最为常用。应用脐血分离干细胞的目的是获得以干细胞(间充质干细胞、造血干细胞)为主要群体的单个核细胞群。用聚蔗糖泛影葡胺为分离介质研究何种密度状态下获得的干细胞最多,目前尚未深入研究。文章在前期工作基础上^[10],探索密度梯度离心法用3种不同质量浓度分离液分离脐血单个核细胞,比较分离单个核细胞不同亚群的比例和纯度,试图找出用密度梯度离心法获得干细胞比例和纯度较高的分离介质。

1 材料和方法

设计: 对比观察试验。

时间及地点: 于2010年10月到2011年3月在武警总医院医学实验中心细胞室完成。

材料: 选择武警总医院健康产妇的脐血用于试验, 年龄24-35岁, 产妇及其家属对实验知情同意, 检查无肝炎、梅毒、艾滋病及其他妊娠并发症。试验共使用脐血30份, 每份80-130 mL, 无菌采集后3 h内处理。

密度梯度离心法分离脐血干细胞实验的主要试剂和仪器设备:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
D-Hank's 液	北京华迈科生物技术有限责任公司
6%中分子羟乙基淀粉	哈尔滨三联药业有限公司
CD34-PE、CD45-FITC、 CD14-APC、CD90-FITC、 CD3-PerCP、CD29-APC、 CD73-PE、CD105-PE	美国 BD 公司
9%聚蔗糖液	上海试剂二厂
33.9%泛影葡胺	上海信谊制药厂
精密密度计、电子秤	DeltaRange 公司
光学显微镜	奥林帕斯
超净工作台	上海智成
pH 计	Orion 公司
医用离心机	湖南长沙湘智
大容量移液枪	美国 Thermo 公司
Millipore 超纯水制造系统	美国 Millipore 公司

方法:

3种质量浓度的分离液配制: 在室温18-20 °C下, 将9%聚蔗糖液与33.9%泛影葡胺液按比例混合, 充分混匀后, 用比重计测混合液相对密度, 得到(1.077 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1), (1.073 0±0.0001) g/mL 3种质量浓度的分离液。过滤除菌, 4 °C避光保存, 可保存3个月。

羟乙基淀粉沉淀红细胞: 取枸橼酸钠抗凝脐血80-130 mL, 无菌操作加入500 mL圆形沉降瓶中, 加脐血量2倍体积的PBS, 充分混匀。加脐血量2倍体积6%羟乙基淀粉, 充分混匀, 盖盖(不盖紧), 20 °C, 静置60 min。

密度梯度离心法分离单个核细胞: 吸取羟乙基淀粉沉淀红细胞后的上清液, 缓慢加至细胞分离液液面上(上清液: 细胞分离液为1:1)。置水平离心机上, 4 °C离心700×g, 离心30 min。离心后用移液管伸到单个核细胞(云雾层混浊带)层, 轻轻吸出, 加入到D-Hank's液中, 洗涤细胞3次。锥虫蓝拒染法检测细胞活性。取2滴细胞悬液加1滴2%锥虫蓝染液, 5-10 min后取样作湿片, 高倍镜检。死细胞被染成蓝色, 活细胞不着色, 总共计数200个细胞。

$$\text{活细胞百分率} = \frac{\text{活细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

流式细胞仪检测单个核细胞表面标志: 取100 μL 单个核细胞悬液(细胞浓度约 1×10^6), 加100 μL FITC、PE等标记的特异性荧光直标单抗, 包括CD34-PE、CD45-FITC、CD14-APC、CD3-PerCP、CD90-FITC、CD29-APC、CD73-PE、CD105-PE。另一份加入荧光标记的无关单抗, 作为同型对样品, 室温下避光反应15-30 min。加入500 μL PBS 重悬成单细胞悬液上机检测。

主要观察指标: 3种质量浓度分离液分离脐血单个核细胞的总数及细胞活力, 3种质量浓度分离液分离脐血单个核细胞亚群的比例。

统计学分析: 采用SPSS 17.0 软件包进行数据分析, 测定结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异的显著性检验用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度分离液分离脐血单个核细胞的总数及细胞活力 见表1。

表1 质量浓度为(1.077 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1), (1.073 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞总数及细胞存活率比较

Table 1 Total number and survival rate of mononuclear cells in umbilical cord blood isolated from separation media with the concentrations of (1.073 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1) and (1.077 0±0.000 1) g/mL ($\bar{x} \pm s, n=30$)

分离液质量浓度(g/mL)	细胞数($\times 10^6$)	平均细胞存活率(%)
1.073 0±0.000 1	1.65±0.21	99.1±0.75
1.075 0±0.000 1	2.03±0.16	98.4±0.89
1.077 0±0.000 1	2.68±0.17 ^a	99.2±0.64

与质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL 相比, ^a $t = 2.98, P < 0.01$ 。

从表1可见, 单个核细胞总数在分离液质量浓度为(1.077 0±0.000 1) g/mL时最多, 随着分离液质量浓度的下降, 细胞总数呈现下降趋势; 质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL时获得的细胞数最低, 与质量浓度为(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液获得的细胞数相比, 少39.18% ($P < 0.01$); 3种质量浓度分离液获得的细胞存活率均较高。

2.2 流式细胞仪检测不同质量浓度分离液分离脐血单个核细胞亚群比例 用3种质量浓度细胞分离液分离所得的单个核细胞中, CD34⁺CD45⁺双阳性细胞所占比例

在质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL时最高, CD14⁺、CD3⁺细胞在质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL时最高, 而CD73⁺、CD105⁺、CD29⁺、CD90⁺细胞表型在质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL时最高, 见表2。

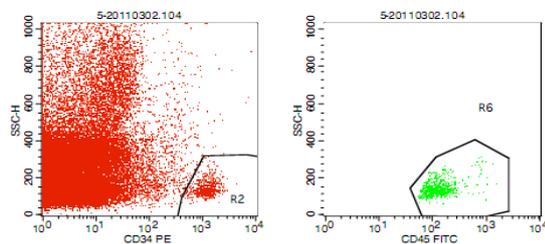
表 2 质量浓度为(1.077 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1), (1.073 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞 CD34⁺CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺, CD90⁺的表达率比较

Table 2 Expression rate of CD34⁺CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺ and CD90⁺ in the mononuclear cells of umbilical cord blood isolated from separation media with the concentrations of (1.073 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1) and (1.077 0±0.000 1) g/mL ($\bar{x}\pm s$, n=30, %)

项目	分离液质量浓度(g/mL)		
	1.073 0±0.000 1	1.075 0±0.000 1	1.077 0±0.000 1
CD34 ⁺ CD45 ⁺	5.99±0.18	9.66±0.11 ^a	2.97±0.12
CD14 ⁺	4.33±0.19	20.41±0.21	10.60±0.18
CD3 ⁺	19.92±1.03	23.24±1.19	21.86±1.15
CD73 ⁺	2.86±0.1 ^b	1.31±0.09	1.34±0.10
CD29 ⁺	30.96±1.68	26.65±1.82	26.48±1.76
CD105 ⁺	19.00±0.84 ^c	12.08±0.76	13.26±0.69
CD90 ⁺	0.84±0.09	0.59±0.08	0.64±0.11

与质量浓度(1.073 0±0.000 1)、(1.077 0±0.000 1) g/mL 相比, ^at=3.25, P<0.01; 与质量浓度(1.075 0±0.000 1)、(1.077 0±0.000 1) g/mL 相比, ^bt=3.27, 2.83, P<0.01; ^ct=2.36, 2.17, P<0.05。

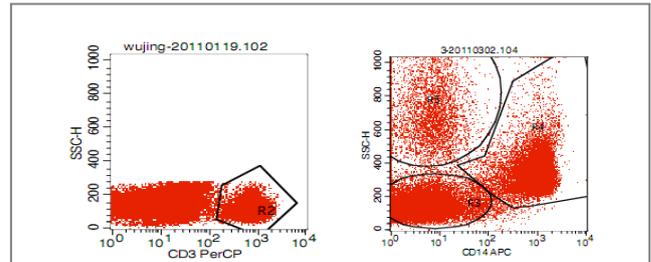
2.3 质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL分离液分离脐血单个核细胞CD34⁺CD45⁺、CD3⁺、CD14⁺表达散点图及质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL分离液分离脐血单个核细胞CD73⁺、CD105⁺、CD29⁺和CD90⁺表达直方图 见图1-3。



注: 左图为 CD34⁺, 横坐标代表藻红蛋白, 纵坐标代表前向散射光; 右图为 CD45⁺, 横坐标代表异硫氰酸荧光素, 纵坐标代表前向散射光。

图 1 质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞 CD34⁺CD45⁺表达散点图

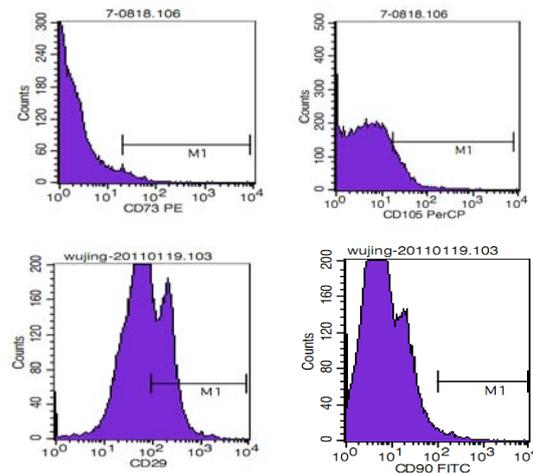
Figure 1 Expression scatterplot of CD34⁺CD45⁺ in the mononuclear cells of umbilical cord blood isolated from (1.075 0±0.000 1) g/mL separation medium



注: 左图 CD3⁺, 横坐标代表多甲藻叶绿素蛋白, 纵坐标代表前向散射光; 右图为 CD14⁺, 横坐标代表别藻青蛋白, 纵坐标代表前向散射光。

图 2 质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞 CD3⁺、CD14⁺表达散点图

Figure 2 Expression scatterplot of CD3⁺ and CD14⁺ in the mononuclear cells of umbilical cord blood isolated from (1.075 0±0.000 1) g/mL separation medium



注: 横坐标表示散射光或荧光信号相对强度值, 纵坐标表示细胞数。

图 3 质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞 CD73⁺、CD105⁺、CD29⁺和 CD90⁺表达直方图

Figure 3 Histogram of CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺ and CD90⁺ in the mononuclear cells of umbilical cord blood isolated from (1.073 0±0.000 1) g/mL separation medium

如图1-3散点图和直方图所示, 使用质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液分离的脐血单个核细胞中, CD34⁺CD45⁺细胞占9.66%, CD3⁺细胞占23.24%, CD14⁺细胞占20.41%。

使用质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液分离的脐血单个核细胞中, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺和 CD90⁺细胞分别占2.86%, 19.00%, 30.96%和0.84%。

2.4 综合比较 比较(1.073 0±0.000 1)、(1.075 0±0.000 1)、(1.077 0±0.000 1) g/mL 3种质量浓度分离液分离脐血单个核细胞CD34⁺CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺和CD90⁺细胞表达百分率并绘制成直方图, 见图4。

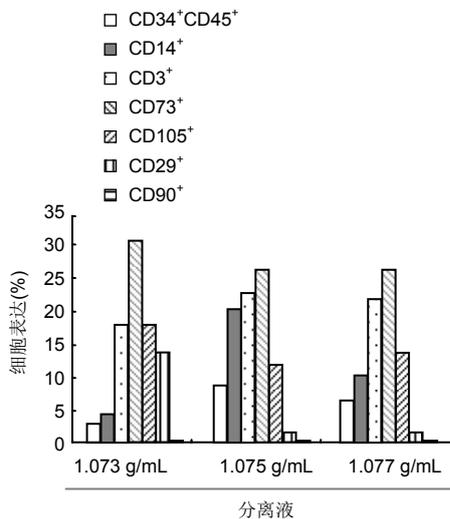


图4 质量浓度为(1.073 0±0.000 1)、(1.075 0±0.000 1)和(1.077 0±0.000 1) g/mL 的分离液分离脐血单个核细胞 CD34⁺CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺, CD90⁺表达直方图

Figure 4 Histogram of CD34⁺CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD29⁺ and CD90⁺ in the mononuclear cells of umbilical cord blood isolated from separation media with the concentrations of (1.073 0±0.000 1), (1.075 0±0.000 1) and (1.077 0±0.000 1) g/mL

从图4可知, 3种质量浓度的分离液所分离的单个核细胞, 以CD29⁺, CD105⁺, CD3⁺和CD14⁺ 4个细胞组分所占比例较大; CD73⁺, CD90⁺, CD34⁺CD45⁺ 3个细胞组分所占比例较小。

在3种质量浓度的分离液中, 质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL分离液获得CD29⁺, CD105⁺和CD3⁺ 3个细胞群中, CD29⁺比例最大; 质量浓度为(1.073 0±0.000 1), (1.077 0±0.000 1) g/mL分离液获得CD14⁺, CD3⁺, CD29⁺和CD105⁺ 4个细胞群, CD29⁺比例均低于质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液。

3 讨论

脐血是目前治疗糖尿病、肝硬化、血液病等疾病的干细胞主要来源, 现已用于临床研究或临床应用。脐血

分离技术是脐血移植研究的关键环节, 关于脐血干细胞提取分离方法, 尚无统一和标准方法。目前, 常用密度梯度离心法分离脐血单个核细胞^[11], 并可查到1个美国专利和1个中国专利^[12-13]。所有报道中, 分离液的质量浓度均为1.077 g/mL。质量浓度为(1.077 0±0.000 1) g/mL的淋巴细胞分离液主要成分为聚蔗糖(Ficoll)或葡聚糖与泛影酸葡甲胺或泛影酸钠, 可分离比人淋巴细胞密度小的单个核细胞群体。使用其分离得到的实际上是一组包括淋巴细胞、单核细胞、间充质干细胞、造血干细胞及少量分叶核细胞在内的细胞群。在再生医学领域研究中, 希望从脐血中得到间充质干细胞或造血干细胞, 以备直接应用或进一步培养、分化, 大量扩增细胞^[14-15]。

脐血单个核细胞中含有多种干/祖细胞, 如造血干/祖细胞、间充质干细胞、内皮前体细胞和非限制性干细胞等。这些干细胞有其特异的表面标志^[16]。造血干细胞的表面标志随着个体发育时期的不同而不同, 但具有共同的标志: CD34⁺、CD45⁺、CD133⁺、HLA-DR⁻、Sca-1⁺、ABCG2⁺、CD38⁺等。CD34抗原是仅存在于造血干/祖细胞表面的分化群抗原, 也有不少文献证实在大多数造血组织中, 造血干细胞在CD34⁺细胞中所占的比例是恒定的^[17]。也有文献报道CD14⁺为造血干细胞标志物^[18]。间充质干细胞表达CD73、CD105、CD29、CD44、CD90、CD166等, 而不表达造血干细胞标志CD34、CD45和内皮细胞特异性标志——CD31和vW^[19-21]。到目前为止没有一个很统一的间充质干细胞的表面标志, 选择用于鉴定间充质干细胞表面标志各家报道略有不同。

实验选择CD34⁺和CD45⁺作为造血干细胞的标志物; CD73⁺、CD105⁺、CD29⁺、CD90⁺作为鉴定间充质干细胞的标志物; CD14⁺作为单核细胞标志物, CD3⁺作为淋巴细胞标志物, 用于分析密度梯度离心法用3种质量浓度分离液分离得到间充质干细胞的最佳效果。

实验结果表明: ①使用质量浓度为(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液获得的单个核细胞总数高于质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL和(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液获得的单个核细胞总数, 与质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/L的分离液获得的细胞数相比, 高39.18%。说明质量浓度为(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液获得的单个核细胞中含有较多的单核细胞和淋巴细胞; 而质量浓度为(1.0730 ±0.000 1) g/mL的分离液获得的单个核细胞中含有较少的单核细胞和淋巴细胞, 相应的间充

质干细胞和造血干细胞比例较高。②按流式细胞仪检测得细胞表面标志物结果, 将CD34⁺、CD45⁺和CD14⁺列为造血干细胞群; CD73⁺、CD105⁺、CD29⁺和CD90⁺列为间充质干细胞群; CD3⁺作为淋巴细胞群。进一步分析质量浓度为(1.073 0±0.000 1)、(1.075 0±0.000 1)、(1.077 0±0.000 1) g/mL分离得到这3个细胞群的结果。

从表1可以看出, 质量浓度为1.077 g/mL的分离液获得的细胞总数最多。不同质量浓度的分离液对细胞存活率没有影响。从表2可以看出, 质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液分离得到约6%造血干细胞群、31%间充质干细胞群和20%淋巴细胞群。质量浓度(1.075 0±0.000 1) g/mL分离得到约10%造血干细胞群、27%间充质干细胞群和23%淋巴细胞群。质量浓度(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液分离得到约3%造血干细胞群、26%间充质干细胞群和22%淋巴细胞群。从图4直方图结果还可看出, 质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液获得间充质干细胞和淋巴细胞两个主要细胞群, 以间充质干细胞比例最大。质量浓度为(1.075 0±0.000 1)、(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液获得造血干细胞和淋巴细胞3个主要细胞群, 且间充质干细胞比例较低。质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液获得造血干细胞比例较高。上述结果表明, 质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液分离得到间充质干细胞群比例较高、造血干细胞群比例最低, 达到分离间充质干细胞最佳效果。

由于造血干细胞和间充质干细胞的体积、悬浮密度相似, 应用密度梯度离心法不能把两个细胞群分开, 该方法也含有约20%淋巴细胞。但使用质量浓度(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液也得到了分离间充质干细胞的较好结果。在方法学上, 密度梯度离心前, 富含单个核细胞的上清液与淋巴细胞分离液容积比按1:1加入, 可获得最佳分离单个核细胞效果。密度梯度离心时, 4℃, 700×g, 30 min所得单个核细胞效果最好。体现在分层后单个核细胞层较厚, 洗涤细胞后管底细胞沉淀中红细胞较少, 单个核细胞背景中混杂细胞如红细胞及其他细胞碎片也少, 平均细胞密度和细胞活力也很高。离心分层时, 温度控制在4℃为最佳, 否则单个核细胞层很薄、影响细胞得率, 此温度的细胞活力在97%以上。

从实验结果可看出, 选择使用质量浓度为(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液分离单个核细胞作为临床级脐

血来源的间充质干细胞直接用于治疗, 或进一步扩增、分化, 效果最佳, 该方法为进一步研究奠定了基础。

在实践中, 作者已建立两步法分离脐血单个核细胞操作流程, 第一步采用羟乙基淀粉沉淀红细胞, 再用密度梯度离心法分离单个核细胞。对羟乙基淀粉沉淀红细胞的各个环节进行了优化, 建立了最佳实验条件。已另文报道^[18], 这篇文章不再赘述。

结论: 应用质量浓度(1.073 0±0.000 1) g/mL的分离液可得到最大比例间充质干细胞群, 是分离间充质干细胞的最佳介质。使用质量浓度为(1.075 0±0.000 1) g/mL的分离液可得到较高比例的造血干细胞群, 是分离造血干细胞的最佳介质。使用质量浓度(1.077 0±0.000 1) g/mL的分离液得到细胞总数最高, 但获得的间充质干细胞、造血干细胞比例最低。建立两步法分离脐血流程, 是获得脐血干细胞的优化方案。

致谢: 感谢武警总医院实验中心的全体老师在实验过程中给予的支持和帮助。

作者贡献: 刘爱兵负责设计课题, 指导实验, 指导论文撰写, 对该项工作负全责; 郭继强为该实验直接完成者, 王东平参与大部分实验工作, 王黎明参与部分实验工作。该文的主干内容已申请中华人民共和国发明专利, 专利(申请)号: 201210079202.0。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验用脐血为产妇自愿捐献, 均知情同意并签署知情同意书, 且得到医院医学伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Spellman S, Hurley CK, Brady C, et al. Guidelines for the development and validation of new potency assays for the evaluation of umbilical cord blood. *Cytotherapy*. 2010;30(3): 376-378.
- [2] Yamamoto S, Ikeda H, Toyama D, et al. Quality of long-term cryo-preserved umbilical cord blood units for hematopoietic cell transplantation. *Int J Hematol*. 2010;93(1):99-105.
- [3] Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. 2010;12(5): 576-578.

- [4] Barcelos LS, Duplaa C, Kränkel N, et al. Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res.* 2009;104(8): 1095-1102.
- [5] Tracy ET, Zhang CY, Gentry T, et al. Isolation and expansion of oligodendrocyte progenitor cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Cytotherapy.* 2011;13(6): 722-729.
- [6] Zhu ML, Wu XR, Chen RG, et al. *Zhongguo Shuxue Zazhi.* 2002; 15(3):179-180.
朱美玲, 伍新尧, 陈汝光, 等. 不同分离方法分离脐血造血细胞效率的比较[J]. *中国输血杂志*, 2002, 15(3):179-180.
- [7] Basford C, Forraz N, Habibollah S, et al. Umbilical cord blood processing using Prepacyte-CB increases haematopoietic progenitor cell availability over conventional Hetastarch separation. *Cell Prolif.* 2009, 42(6):751-761.
- [8] Zhang SH, Lin DD, Zhang MJ, et al. *Zhongguo Xuexichongbing Fangzhi Zazhi.* 2007;19(3):192-195.
张素华, 林丹丹, 张美娟, 等. Ficoll 密度梯度离心法分离猪外周血单个核细胞条件的探讨[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2007, 19(3): 192-195.
- [9] Ma Li, Liu DJ, Li DT, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2008;12(38):7401-7406.
马力, 刘大军, 李德天, 等. 不同分离方法及培养条件对兔骨髓间充质干细胞生长增殖及生物学特性的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(38):7401-7406.
- [10] Guo JQ, Liu AB, Shen D. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011;15(45):8447-8450.
郭继强, 刘爱兵, 沈丹. 两步法分离脐带血单个核细胞的最佳条件[J]. *中国组织工程研究与临床康复杂志*, 2011, 15(45): 8447-8450.
- [11] Han H, Hanyang APT, Maeul YJ, et al. Method of isolating and culturing mesenchymal stem cell derived from Umbilical cord blood. U S Patent. US 7704739B2. Apr. 27, 2010.
- [12] 王怀林. 骨髓脐带血干细胞体外分离试剂盒及其应用方法. 中国专利, 发明, CN101144070, 2008.03.
- [13] Lam GK, Subramanyam L, Orton S, et al. Minimizing red blood cell contamination while isolating mononuclear cells from whole blood: the next step for the treatment of severe hemolytic. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(4):1012-1016.
- [14] Rocha V, Sanz G, Gluckman E, et al. Umbilical Cord Blood Transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2004;11(6):375-385.
- [15] Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India.* 2010;58(2):201-208.
- [16] Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, et al. Stem Cell Therapy for Cardiac Repair Ready for the Next Step. *Circulation.* 2006; 114(25):339-352.
- [17] Chitteti BR, Liu Y, Srouf EF. Srouf Genomic and Proteomic Analysis of the Impact of Mitotic Quiescence on the Engraftment of Human CD34⁺ Cells. *PLoS One.* 2011; 6(3):e17498.
- [18] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet.* 2010; 42(6):519-527.
- [19] Singh K, Srivastava A, Mathur N, et al. Evaluation of four methods for processing human cord blood and subsequent study of the expansion of progenitor stem cells isolated using the best method. *Cytotherapy.* 2009;11(6):768-777.
- [20] Phuc PV, Nhung TH, Loan DT, et al. Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011; 47(1):54-63.
- [21] Peters R, Wolf MJ, van den Broek M, et al. Efficient Generation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood in Stroma-Free Liquid Culture. *PLoS One.* 2010;5(12):1-14.