

## 不同降温速率对脐血干细胞冷冻复苏后生物学特性的影响

沈华萍 丁春梅 迟占有 康自珍 谭文松\*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

**摘 要** 考察了不同降温速率对脐血造血干细胞各种生物学特性的影响。在 4℃ ~ -40℃ 的降温范围内,分别选择 -0.5℃/min, -1℃/min, -5℃/min 的降温速率进行降温,对复苏后的脐血单个核细胞的回收率、活性和 CD34<sup>+</sup> 含量的变化以及 BFU-E、CFU-GM 和 CFU-MK 集落的回收率进行了考察,发现在 -1℃/min 的降温速率下,脐血 MNC 回收率可达 93.3% ± 1.8%,活性可达 95.0% ± 3.9%,CD34<sup>+</sup> 细胞回收率达 80.0% ± 17.9%,BFU-E 回收率为 87.1% ± 5.5%,CFU-GM 回收率达 88.5% ± 8.9%,CFU-MK 的回收率也达到 86.2% ± 7.4%。并且对复苏后的细胞进一步进行体外培养,发现在 -1℃/min 的降温速率下复苏的细胞仍然具有与未经冷冻细胞相似的扩增能力,而 -0.5℃/min 和 -5℃/min 这两种降温速率条件下复苏的细胞与未经冷冻的细胞相比差距较大。因而 -1℃/min 的降温速率对冻存脐血干细胞比较合适。

**关键词** 脐血库,脐血干/祖细胞,冷冻保存

中图分类号 Q953.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0489-04

目前已通过临床证明,脐血造血干细胞移植是治疗白血病、恶性肿瘤等多种疾病的有效方法<sup>[1-3]</sup>。但脐血样本一般采集量较少,通过体外扩增的方法可以满足临床应用的需要。如果能够建立完善的脐血库<sup>[4]</sup>,使复苏后的细胞同样能够达到体外扩增的需求,那么就可以彻底解决脐血样本不足的问题<sup>[5,6]</sup>。而建立脐血库关键是要尽可能地保证脐血干细胞在冷冻复苏后各种生物学特性不受损伤<sup>[7]</sup>。冻存过程中影响脐血干细胞复苏后各种性能的因素很多<sup>[8,9]</sup>,比如:冷冻速率、冷冻保护剂的选择,以及复苏的程序等等。其中冷冻速率是影响脐血造血干细胞冻存效果的最关键因素之一。合适的降温速率可以最大限度地减少造血干细胞在冷冻过程中的损伤。本实验详细比较了 3 种不同的降温速率 0.5℃/min、1℃/min 和 5℃/min 之间的冻存效果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 脐血的采集和制备

脐血由上海国际妇婴保健医院提供。无菌条件下采集单个核细胞(MNC),洗涤备用。

#### 1.2 细胞的冷冻复苏

将单个核细胞(MNC)(用 FBS 悬浮)与配制 FBS 保护剂

1:1 在 4℃ 混合,使 DMSO 终浓度 10%,在程序降温仪的程控下,以 0.5℃/min、1℃/min 和 5℃/min 的速率分别进行降温至 -40℃,再以 -5℃/min 的速率快速降至 -100℃,然后直接投入液氮中保存 1 周。

将细胞从液氮中取出,直接投入 37℃ 水浴复温<sup>[10]</sup>,并加入 10% Albumin 的 IMDM 培养液进行稀释,洗涤后进行计数、检测、培养。

#### 1.3 MNC 体外扩增体系

IMDM(Gibco)培养基添加 20% FBS、2mmol/L 谷氨酰胺,其中细胞因子组合为:SCF(50 ng/mL)、IL-3(5 ng/mL)、IL-6(20 ng/mL)。培养实验在 24 孔板中进行,每孔 1 mL 培养液,MNC 活细胞接种密度为  $5 \times 10^5$  cells/mL,培养至第 7d 开始 MNC 活细胞计数、半量稀释换液(即取出一半的培养基和细胞,补加入相同体积的新鲜培养基和细胞因子),培养第 10 天时进行 MNC 活细胞计数、流式细胞分析及集落检测,并再次半量稀释换液,14d 时 MNC 活细胞计数。

#### 1.4 造血干/祖细胞集落检测

CFU-GM、BFU-E 集落检测在含 1.0% 甲基纤维素的 IMDM 半固体培养体系中进行。CFU-MK 是采用血浆法检测。MNC 活细胞以  $4 \times 10^4$  cells/mL 的接种密度接种于 24 孔

收稿日期 2003-01-28,修回日期 2003-03-24。

基金项目:国家 863 计划生物领域项目和上海市现代生物与医药项目基金资助(No.102-12-08-01, No.004319003)。

\* 通讯作者。 Tel 86-21-64253394; Fax 86-21-64250948; E-mail swstan@ecust.edu.cn

板中培养 10~12d 后检测。

### 1.5 流式细胞分析

$1.0 \times 10^6$  未扩增或扩增后的细胞用 PBS 洗 2 遍, 标记 CD34<sup>+</sup> 细胞抗体, 用 FACSscan (BD 公司) 流式细胞仪分析, 结果用 lysis-II 软件处理。

### 1.6 细胞、集落计数

MNC 计数: 用白细胞稀释液稀释后, 采用血球计数板计数, 取 4 次计数平均值。

活细胞计数: 用台盼蓝染色后, 采用血球计数板计活细胞数, 取 4 次计数平均值。

集落计数在倒置显微镜 (Nikon) 下直接观察, 取 4 个平行孔的平均值。

集落密度: 即每  $10^4$  个细胞形成的集落数。

MNC 回收率 = 复苏后 MNC 总数 / 冷冻前 MNC 总数  $\times$  100%

CD34<sup>+</sup> 细胞回收率 = 复苏后 MNC 回收率  $\times$  (复苏后 CD34<sup>+</sup> 细胞含量 / 冷冻前 CD34<sup>+</sup> 细胞含量)

MNC 集落回收率 = 复苏后 MNC 回收率  $\times$  复苏后集落密度得率

### 1.7 统计学分析

结果以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm S$ ,  $N = 3$ ) 表示, 差异性分析采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MNC 收率与细胞活性比较

脐血造血细胞在冷冻保护剂和复苏方法相同而降温速率不同的情况下 MNC 回收率和细胞活性如表 1 所示, 可以看出采用  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  和  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率, MNC 收率和细胞活性分别达到了  $96.4\% \pm 1.1\%$ 、 $94.9\% \pm 4.3\%$  和  $93.3\% \pm 1.8\%$ 、 $95.0\% \pm 3.9\%$ , 而  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率, 其 MNC 收率只有  $87.1\% \pm 1.4\%$ , 与前两者相比均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而且细胞的活性也不如前两者。这说明  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率可能由于降温速率太快, 在细胞体内会形成较大的冰晶, 从而使造血干细胞损伤很大, 冷冻复苏后裂解、死亡率较高, 同时注意到,  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  降温速率下 MNC 收率最高, 与  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率相比, 有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 但细胞活性却无显著差异。

表 1 不同降温速率下细胞回收率和活性比较

Table 1 Influence of different cooling rates on recovery and viability of MNC and CD34<sup>+</sup> cells

Cooling rate	MNC recovery	MNC viability	CD34 <sup>+</sup> cell recovery
-0.5°C/min	96.4% $\pm$ 1.1%	94.9% $\pm$ 4.3%	80.1% $\pm$ 9.0%
-1.0°C/min	93.3% $\pm$ 1.8%	95.0% $\pm$ 3.9%	80.0% $\pm$ 17.9%
-5.0°C/min	87.1% $\pm$ 1.4%	91.8% $\pm$ 7.9%	72.2% $\pm$ 11.8%

### 2.2 MNC 扩增分析

图 1 是冷冻前后细胞在 24 孔板中培养 14d MNC 扩增倍

数的比较, 从中可以发现以  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  和  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的速率降温后的细胞, 在整个培养过程中, 其生长情况一直比较接近未经冷冻的细胞, 其 14d 的扩增倍数分别达到了未经冷冻细胞扩增倍数的 0.875 和 0.909 倍, 而采用  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  降温的细胞在复苏后整个培养过程中扩增情况均不如前两者, 到第 14d 时的扩增倍数只能达到原来水平的 0.530 倍, 与  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的条件比  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  和  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的条件相比均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。显而易见,  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率不仅直接使细胞在复苏后裂解、死亡, 还在本质上严重损伤了细胞的增殖潜能。相比之下, 用  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率来冻存细胞对细胞损伤最小,  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  其次, 比较培养 10d 时的扩增倍数, 发现两者有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 这一点与细胞的回收率相比较, 结果相反, 但也正说明  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率虽然可以得到较高的细胞收率, 却对细胞的扩增能力有了更大的损伤。

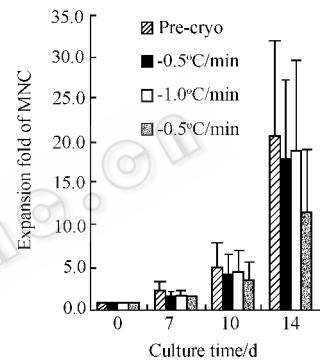


图 1 冷冻速率对 MNC 体外扩增的影响

Fig. 1 Influence of different cooling rates on expansion of MNC

### 2.3 集落分析

集落形成能力是评价造血干细胞扩增潜能的重要指标之一, 尤其是 CFU-GM 的形成能力。实验中考察了脐血造血干细胞在冻存前后 BFU-E、CFU-GM 和 CFU-MK 的集落形成能力, 首先从集落密度来看, 从图 2 可以发现,  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率下其 CFU-GM 的初始集落得率最高,  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  得率次之, 分别达到了 99.0% 和 93.1%, 而  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率下, CFU-GM 的集落密度得率只有 73.2%, 分别与  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  和  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率下的 CFU-GM 集落密度相比, 均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 同样比较三者的 BFU-E 的集落密度得率, 也得出相同结果。这一结论说明了  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率对造血干细胞的集落形成能力也造成了巨大的损伤。细胞经体外培养 10d 后 CFU 的扩增能力如图 3 所示, 可以看到用  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的降温速率冻存后的细胞集落扩增倍数为: BFU-E 4.72 倍, CFU-GM 7.20 倍, CFU-MK 2.83 倍, 最接近于未经冷冻细胞的集落扩增倍数。在  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  的条件下, 集落扩增能力要比  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  差一些, 尤其是 CFU-GM 的扩增倍数与  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  的条件下相比, 有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的条件下扩增倍数最低, 与前两者均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 说明在冷冻过程中, 造血干细胞受到损伤, 影响了其自我更新和多向分化的能力, 从而表现为集落形成能力差。综合考虑细胞的回收率以及细胞的增殖潜能, 用体外培养 10d 所能

形成的总的集落数来考察 3 个条件的差异。从表 2 可以看到 1℃/min 的降温速率对细胞的损伤最小,培养 10d 后 BFU-E、CFU-GM、CFU-MK 的总集落形成数分别可以达到未经冷冻细胞的 86.2%、88.1% 以及 70.3%,是最为理想的降温速率。

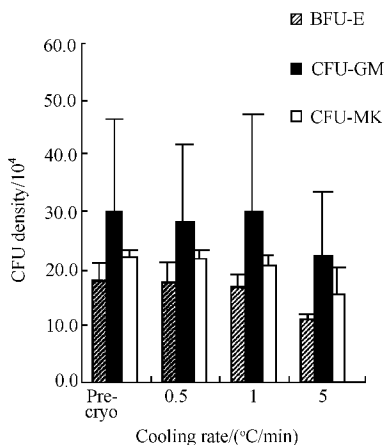


图 2 不同冷冻速率下培养 0d CFU 集落密度的比较

Fig.2 Influence of different cooling rates on CFU density before culture

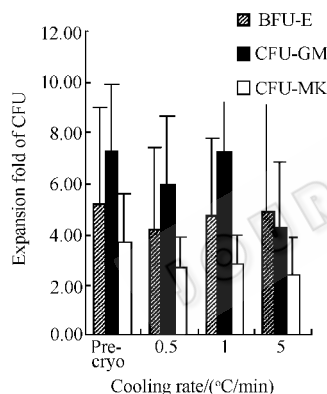


图 3 体外培养 10d 后 CFU 的扩增倍数比较

Fig.3 Fold expansion of CFU from MNC when cultured 10 days

表 2 不同降温速率对细胞形成的总集落数的得率的影响

Table 2 Influence of different cooling rates on yield of total CFUs from MNC

Cooling rate	BFU-E (10d)	CFU-GM (10d)	CFU-MK (10d)
-0.5℃/min	75.6% ± 3.7%	72.6% ± 3.8%	72.8% ± 12.1%
-1.0℃/min	86.2% ± 31.6%	88.1% ± 3.8%	70.3% ± 13.3%
-5.0℃/min	49.1% ± 8.8%	35.5% ± 2.3%	38.0% ± 13.1%

## 2.4 CD34<sup>+</sup> 细胞含量分析

CD34 抗原是检测造血干细胞的重要指标。本实验通过流式细胞仪检测了冷冻前后细胞在培养 0d 和 10d 的 CD34<sup>+</sup> 细胞含量,并检测了 CD34<sup>+</sup> 细胞培养 10d 后的扩增倍数。结果见表 3 对比 0d 和 10d 的含量结果,可以看出采用 1℃/min

的降温速率对 CD34<sup>+</sup> 细胞损伤最小。而且经体外培养 10d 以后,CD34<sup>+</sup> 细胞的扩增倍数达到了  $3.59 \pm 2.22$ ,与未经冷冻的相比,得率为 88.2%,无显著差异 ( $P > 0.05$ )。且对比相同培养时间的冷冻前后细胞,可以看到细胞经过冷冻之后,细胞形态基本保持不变。而 0.5℃/min 和 5℃/min 的降温速率对 CD34<sup>+</sup> 细胞的影响相对比较大,CD34<sup>+</sup> 细胞的含量在培养 10d 后只有未经冷冻的 60%~70%,与未经冷冻的细胞相比,均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。这一点更是有力地证明了无论是过慢或是过快的降温速率都会对细胞的扩增潜力造成很大的损伤,而 1℃/min 这个冷冻速率是比较理想的。

表 3 冷冻速率对 CD34<sup>+</sup> 含量以及扩增倍数的影响

Table 3 Influence of cooling rate on the proportion and expansion of CD34<sup>+</sup> cells

N=3	CD34 <sup>+</sup> (0d)	CD34 <sup>+</sup> (10d)	Expansion fold	Expansion fold of CD34 <sup>+</sup> cell(10d)
Pre-cryo	5.29% ± 1.0%	4.25% ± 1.1%	5.19 ± 2.99	4.07 ± 2.35
-0.5℃/min	4.36% ± 0.4%	2.93% ± 1.0%	4.34 ± 2.42	2.79 ± 1.74
-1.0℃/min	4.51% ± 0.9%	3.35% ± 0.7%	4.63 ± 2.52	3.59 ± 2.22
-5.0℃/min	4.35% ± 0.7%	2.76% ± 0.9%	3.64 ± 2.14	2.44 ± 1.83

## 3 讨论

细胞在冷冻过程中,会因为过快或者过慢的降温速率导致细胞在复苏时裂解、死亡或者是丧失活性。利用程序降温仪,可以较稳定地控制合理的降温速率,使细胞处在一个循序渐进的、自身能够平衡的降温过程中,尽可能保证细胞在冷冻过程中不受任何损伤。根据实验结果,可以发现冷冻造血干细胞时速率的确存在着一个适宜值,过慢或者过快都将对细胞产生伤害。5℃/min 的降温速率由于在胞内形成大冰晶而直接导致细胞破碎、裂解,使得细胞的回收率和细胞活性显著降低,并且从根本上损伤了细胞的潜在增殖能力,无论是集落形成能力还是 MNC 扩增能力以及集落的扩增能力,都无法达到与未经冷冻细胞相接近的状态。而 0.5℃/min 的降温速率在复苏后虽然表现出较高的回收率,但培养过程中的扩增情况却不甚理想。考虑过慢的冷冻速率增加了细胞与 DMSO 在冷冻初期的接触时间,使得细胞在高浓度的溶液中暴露时间过长而遭受损伤,这种损伤在细胞复苏后不直接体现为裂解和死亡,却在细胞增殖潜能上表现出一定的致命伤,同时考虑到降温速率过慢增加经济成本,因而 1℃/min 的降温速率从各方面来讲是一个比较合理的降温速率。

同时通过温度记录仪同步跟踪样品温度。发现当温度降到 -6℃ 附近,样品温度会突然出现 1~4℃ 的回升,随后温度下降缓慢,直到 -12 ± 2℃ 时,温度下降才恢复正常(数据未发表)这一阶段可能是细胞内结冰释放潜热阶段,也是细胞最脆弱、最容易受到损伤的阶段。因而控制好这一阶段的冷冻速率尤其关键,需要根据实际情况来调节能控降温速率,使实际降温速率达到 1℃/min 左右。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Gluckman E ,Broxmeyer H E ,Auerbach A D *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi 's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* ,1989 **321** : 1174 - 1178
- [ 2 ] Gluckman E ,Wagner J ,Hows J *et al.* Special report :cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant* ,1993 **11** :199 - 200
- [ 3 ] Rubinstein P ,Carrier C ,Scaradavou A *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* ,1998 **339** :1565 - 1577
- [ 4 ] LIAO ( 廖 灿 ) ,LIU ( 刘 斌 ) ,HUANG Y ( 黄 以 宁 ) *et al.* Establishment of cord blood stem cell bank and its clinical application. *Chin J Hemato( 中华血液学杂志 )* ,2001 **22** ( 8 ) :411 - 414
- [ 5 ] Armitage S ,Fehily D ,Dickinson A *et al.* Cord blood banking :volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant* ,1999 **23** :505 - 509
- [ 6 ] Ademokun A ,Chapman C ,Dunn J *et al.* Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking. *Bone Marrow Transplant* ,1997 **19** :1023 - 1028
- [ 7 ] Donaldson C ,Armitage W J ,Denning-Kendall P A *et al.* Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* ,1996 **18** :725 - 731
- [ 8 ] Harris D T ,Schumacher M J ,Rychlik S *et al.* Collection , separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* ,1994 **13** :135 - 143
- [ 9 ] Almici C ,Carlo-stella C ,Wagner J E *et al.* Clonogenic capacity and *ex vivo* expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells are not impaired by cryopreservation. *Bone Marrow Transplant* ,1997 **19** :1079 - 1084
- [ 10 ] Kogler G ,Callejas J ,Sorg R V *et al.* The effect of different thawing methods , growth factor combinations and media on the *ex vivo* expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant* ,1998 **21** :233 - 241

## Effects of Different Cooling Rates on Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells from Cord Blood

SHEN Hua-Ping DING Chun-Mei CHI Zhan-You KANG Zi-Zhen TAN Wen-Song\*

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,East China University of Science and Technology , Shanghai 200237 ,China )

**Abstract** Clinical evidence of hematopoietic restoration with umbilical cord blood (UCB) grafts indicates the UCB can be a useful source of hematopoietic stem cells for routine bone marrow reconstitution. Considering  $(10 \pm 5) \times 10^8$  nucleated cells per cord blood unit, there is a potential limitation for the use of cord blood in adults, which, however, can be overcome by *ex vivo* expansion of cells. A prerequisite for expansion is the significantly higher recovery of MNC, CD34<sup>+</sup> cells and colony-forming cells (CFC) by thawing cryopreserved MNC. Cooling rate always acts as a critical factor that can affect the recovery of cells. Although the rate of  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  is adopted in most of the cryopreservations, no data has been reported about the detailed effects of different cooling rates. The aim of the study was to reveal the different effects of cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood. UCB samples were collected, and cryopreserved as mononuclear cells (MNC) with different cooling rates of  $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ , and the recovery and viability of MNC and CD34<sup>+</sup> cells, the clonogenic capacity and the *ex vivo* expansion potential of UCB progenitor cells were evaluated after thawing. With  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  cooling rate, the recovery of MNC reached  $93.3\% \pm 1.8\%$ , viability  $95.0\% \pm 3.9\%$ , recovery of CD34<sup>+</sup> cells  $80.0\% \pm 17.9\%$ , and clonogenic recovery were  $87.1\% \pm 5.5\%$ ,  $88.5\% \pm 8.9\%$ ,  $86.2\% \pm 7.4\%$  for BFU-E, CFU-GM, CFU-MK, respectively. After 14 days of liquid culture, no significant difference was detected in CFC expansion between fresh and cryopreserved MNC cells with  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  cooling rate, but this was not the case with  $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  and  $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ . In conclusion, it was demonstrated that controlling the rate at  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  is more suitable for cryopreservation of hematopoietic stem cells than  $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  and  $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ .

**Key words** umbilical cord blood bank, hematopoietic cells, cryopreservation

Received : 01-28-2003

This work was supported by Grant from the state "863" High Technology R&D Project of China (No. 102-12-08-01) and the Shanghai Modern Biology and Medicine Program (No. 004319003).

\* Corresponding author. Tel 86-21-64253394; Fax 86-21-64250948; E-mail: stan@usst.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>