

· 论 著 ·

经粒系集落刺激因子刺激外周血 CD34⁺ 细胞动员效果相关因素的考察*

魏 丽, 吴 炜, 李兰娟, 汪超军△

(浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 浙江杭州 310003)

摘要: 目的 探讨粒系集落刺激因子(G-CSF)动员健康供者外周血造血干细胞效果的影响因素。方法 对 24 例健康供者皮下注射 G-CSF 动员造血干细胞, 检测外周血 T 淋巴细胞亚群和血常规数据。结果 经 G-CSF 刺激后, 外周血 CD3⁺(%)、CD3⁺CD4⁺(%)、白细胞计数、血小板均明显升高($P < 0.05$); 而动员第 4 天、第 5 天、第 6 天骨有核细胞密度、CD34⁺ 细胞百分比无明显差别。经相关性分析, 性别、年龄、体质量与 CD34⁺ 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$), 白细胞计数呈正相关($P < 0.01$)。结论 在一定范围内男性供者优于女性供者, 年龄越小, 体质量越轻, 白细胞计数越高, 经 G-CSF 动员的外周血造血干细胞 CD34⁺ 细胞百分比越高。

关键词: 造血干细胞; 外周血; G-CSF; CD34⁺ 细胞**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.003**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2015)07-0870-03

Investigation on related factors of CD34⁺ cells in peripheral blood mobilization effect by G-CSF stimulation*

Wei Li, Wu Wei, Li Lanjuan, Wang Chaojun△

(1. State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, First Affiliated Hospital College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

Abstract: Objective To investigate the influence factors of peripheral blood hematopoietic stem cell of healthy donor by granulocyte colony-stimulating-factors(G-CSF) mobilization. Methods G-CSF was subcutaneously injected in 24 cases of healthy donor for mobilizing hematopoietic stem cells. The T lymphocyte subgroup and blood routine data were detected. Results After G-CSF stimulation, peripheral blood CD3⁺(%), CD3⁺CD4⁺(%), white blood cell (WBC) count and platelet were significantly increased ($P < 0.05$). And nucleated cells density of bone, percentage of CD34⁺ cells on mobilized 4, 5, 6 d had no obvious difference. The correlation analysis showed that gender, age and weight were negatively correlated with CD34⁺ cells percentage ($P < 0.05$) and positively correlated with WBC count ($P < 0.01$). Conclusion Male donor is superior to female donor within a certain range, the smaller age, the lighter weight, the higher WBC count, the higher the percentage of CD34⁺ cells in peripheral blood hematopoietic stem cells after G-CSF mobilization.

Key words: hematopoietic stem cells; peripheral Blood; granulocyte colony-stimulating-factors; CD34⁺ cells

1989 年外周血干细胞移植获得成功以来, 异体或自体外周血干细胞移植技术正越来越多地应用于恶性肿瘤尤其是恶性血液病的治疗, 而外周血干/祖细胞的测定是移植成功的关键^[1]。粒系集落刺激因子(G-CSF)可以将骨髓的造血干/祖细胞动员到外周血中, G-CSF 作为造血干细胞的动员剂, 目前已广泛应用于临床。然而经 G-CSF 刺激后外周血 CD34⁺ 细胞动员效果与年龄、体质量等是否有相关性, 相关性如何? 目前尚无系统的研究。本文旨在对这些因素进行考察, 以期找到与动员效果相关的因素, 从而为临床外周血造血干细胞的采集提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1~12 月本院的异基因造血干细胞供者 24 例, 男 16 例, 女 8 例, 年龄 16~50 岁, 体质量 45~70 kg。

1.2 研究方法 24 例供者接受皮下注射 G-CSF 150 μg, 12 h 一次, 6 d, 动员第 4 天、第 5 天、第 6 天使用 COBES 血细胞分离机的 MNC 程序采集外周血干细胞; 每次采集预定循环血量

10 L, 分离前予供者 10% 葡萄糖酸钙 20 mL。采集供者动员前、动员第 4 天、第 5 天、第 6 天留取血样 2 份, 每份 2 mL, 做全血细胞计数及 T 淋巴细胞亚群的检测。分离产物做骨有核细胞计数和 CD34⁺ 细胞计数。

1.3 统计学处理 应用统计软件 SPSS19.0 对数据进行统计分析, 不同动员时间淋巴细胞亚群和血常规组间比较采用单因素方差检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。与 CD34⁺ 细胞百分比相关性分析采用偏相关分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

不同动员时间外周血 T 淋巴细胞亚群和血常规的变化见表 1, 不同动员时间骨有核细胞密度与 CD34⁺ 细胞百分比变化见图 1、图 2; 与 CD34⁺ 细胞百分比相关性分析见表 2。

由表 1 可见, 与动员前相比, 动员第 4 天、动员第 5 天、动员第 6 天的 CD3⁺(%)、CD3⁺CD4⁺(%)、白细胞计数均明显升高($P < 0.05$); 动员第 5 天、动员第 6 天血小板明显升高($P < 0.05$)。

* 基金项目: 钱江人才计划项目资助(2012R10G2010210)。 作者简介: 魏丽, 女, 实验员, 主要从事临床流式检测研究。 △ 通讯作者, E-mail: wangchaojundf@hotmail.com。

表 1 不同动员时间外周血 T 淋巴细胞亚群和血常规的变化(±s)

项目	动员前	动员第 4 天	动员第 5 天	动员第 6 天
CD3 ⁺ (%)	57.05±3.47	70.73±8.51**	66.48±7.51**	69.61±7.84**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	29.54±6.92	35.44±6.75**	34.73±7.24*	39.48±5.43**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	24.80±6.89	30.28±6.90	27.14±7.44	26.34±5.17
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	1.38±0.79	1.27±0.44	1.41±0.58	1.56±0.39
白细胞计数(10E9/L)	6.27±1.85	47.25±10.96**	47.78±11.87**	51.45±11.77**
血红蛋白(g/L)	145.83±17.76	145.13±16.38	141.67±14.64	146.92±16.43
血小板(10E9/L)	233.67±72.66	205.25±72.29	156.71±76.63**	138.67±52.06**

* : 与动员前比较, $P < 0.05$; ** : 与动员前比较, $P < 0.01$ 。

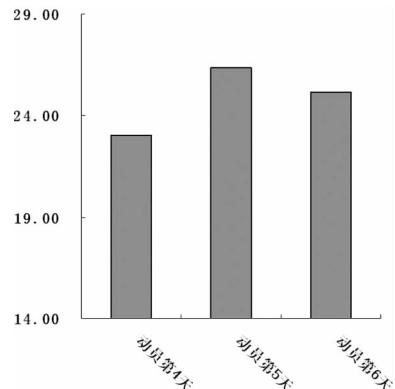
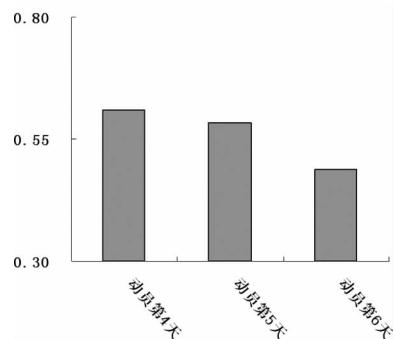


图 1 动员不同时间骨有核细胞密度变化

图 2 动员不同时间 CD34⁺ 细胞百分比变化

由图 1、2 可见动员第 4 天、动员第 5 天、动员第 6 天骨有核细胞密度、CD34⁺ 细胞百分比无明显差别。

表 2 与 CD34⁺ 细胞百分比相关指标相关性检验结果

因素	相关系数	P
性别	-0.473**	$P < 0.01$
年龄	-0.273*	$P < 0.05$
体质量	-0.399**	$P < 0.01$
骨有核细胞密度	0.023	$P > 0.05$
CD3 ⁺ (%)	0.192	$P > 0.05$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	0.001	$P > 0.05$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	-0.135	$P > 0.05$
白细胞计数	0.425**	$P < 0.01$
血红蛋白	-0.070	$P > 0.05$
血小板	-0.147	$P > 0.05$

由表 2 可见, 性别、年龄、体质量与 CD34⁺ 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$), 白细胞计数呈正相关($P < 0.01$)。综上所述: 经 G-CSF 刺激后, 外周血 CD3⁺(%)、CD3⁺CD4⁺(%)、白细胞计数、血小板均明显升高($P < 0.05$); 而动员第 4 天、动员第 5 天、动员第 6 天骨有核细胞数、CD34⁺ 细胞百分比无明显差别。经相关性分析, 性别、年龄、体质量与 CD34⁺ 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$), 白细胞计数呈正相关($P < 0.01$)。

3 讨 论

G-CSF 可以改变骨髓中造血干细胞表面的黏附分子, 使造血干细胞突破骨髓屏障迁移到外周血中, 其结果是造血干细胞在体内进行了再分布, 使外周血造血干细胞移植成为可能^[2]。CD34 抗原主要表达在早期造血干/祖细胞上, 占正常人骨髓单个核细胞的 1.5% 左右, 外周血中浓度极低。它具有很强的扩增能力及自我更新能力, 是实现造血重建的细胞^[3]。应用 G-CSF 后可使其浓度增加, 并且自我更新、复制能力增强^[4]。一般情况下, 在给予 G-CSF 4~5 d 后外周血造血干细胞的数量可增加 40~80 倍, 而在停用后 4~6 d 外周血造血干细胞数量恢复到用药前的水平^[5]。因此, 本文收集动员第 4~6 天的外周血造血干细胞进行检测, 以期找到与动员效果相关的因素, 从而为临床外周血造血干细胞的采集提供参考。

有文献报道, 细胞因子动员造血干细胞峰值多出现在第 5 天, 其后造血干细胞数开始下降^[6]。本文研究与之有所不同, 本文研究发现在动员后 4~6 d, 骨有核细胞密度、CD34⁺ 细胞百分比无明显差别, 考虑可能与本文只研究了健康供者的标本有关。

本文研究发现与动员前相比: 动员第 4 天、动员第 5 天、动员第 6 天的 CD3⁺(%)、CD3⁺CD4⁺(%)、白细胞计数均明显升高($P < 0.05$); 提示应用 G-CSF 动员对外周血的 T 淋巴细胞亚群有影响, 且可使供者的白细胞升高。在外周血造血干细胞采集过程中, T 淋巴细胞亚群和血常规规则无明显差别。

G-CSF 作为动员剂首先是用于化疗后稳定期肿瘤患者的自体外周血造血干细胞动员及移植方面。1992 年 Sheridan 等首次报道了以 G-CSF 动员的外周血干细胞进行自体移植, 并成功地使造血重建, G-CSF 近年来还用于异基因外周血造血干细胞移植中健康供者的动员。根据美国国家肿瘤研究所的研究报告, 要在正常供者采集到足够的 CD34 细胞必须进行动员, 而化疗的方法肯定是不行的, 只有采用单纯细胞因子动员的方法^[7]。

然而在采用 G-CSF 动员外周血造血干细胞的过程中, 哪些因素会影响造血干细胞的采集呢? 本文对(下转第 874 页)

人球蛋白试验阳性强度较强,直接抗人球蛋白试验对区别ABO-HDN 和 Rh-HDN 有重要作用^[8-9]。游离试验是检测新生儿血清中是否存在与自身红细胞不匹配的 IgG 抗 A、B 或是 AB 系统以外的抗体,该试验阳性提示继续溶血的可能;因为产妇在分娩前后,患儿致敏红细胞破坏加速,而患儿的游离抗体也只在出生后几天内存在。因此,有新生儿黄疸症状的患儿标本应尽早送检,以提高阳性检出率^[10-11]。本院送检的 HDN 标本其患儿出生时间为 30 min 至 23 d,出生后 4 天内阳性检出率最高,随着时间的延长阳性检出率逐渐下降。放散试验是先将新生儿红细胞表面可能结合的抗体释放出来,再进行间接抗人球蛋白试验;因有大量压积红细胞释放使抗体浓缩提高检出率,所以放散试验是 3 项试验中敏感性最高的,此试验一旦出现阳性结果就表明患儿红细胞上覆有 IgG 类血型抗体,即可明确诊断为 HDN^[12-13]。

本研究中有一例母婴血型均为 O 型、RhD 阳性且临床症状较重的病例,其 HDN 3 项试验均为阳性,为研究患儿是何种原因引起的 HDN,故用 Rh 血型抗原检测卡分别检测母婴的 Rh 血型抗原,其中母亲 RhD(+)、RhC(+)、Rhc(+)、RhE(-)、Rhe(+);患儿 RhD(+)、RhC(+)、Rhc(+)、RhE(+)、Rhe(+);由此可见是患儿与母亲 RhE 血型不合引起的 HDN。

由于 HDN 患儿通常病情危急,需要尽快明确诊断,故标本采集后要尽早送检,红细胞标本一定不能被细菌污染,否则易出现微柱法检测假阳性结果;血清标本必须充分去除纤维蛋白,以免阻碍阴性红细胞沉淀,呈假阳性反应;应严格按试验的质量控制程序进行操作,避免干扰因素、交叉反应及潜在误差来源对结果造成影响。

综上所述,将微柱凝胶免疫技术应用到 HDN 的检测中,能对 HDN 进行准确而快速地诊断,有利于给予患儿及时有效的治疗,具有良好的临床应用价值。

参考文献

- [1] 卢磊,刘燕. 微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用[J]. 中

(上接第 871 页)

性别、年龄、体质量等因素进行了相关性分析,发现性别、年龄、体质量与 CD34⁺ 细胞百分比呈负相关($P < 0.05$),白细胞计数呈正相关($P < 0.01$),即在一定范围内男性供者优于女性供者,年龄越小、体质量越轻,白细胞计数越高,经 G-CSF 动员的外周血造血干细胞 CD34⁺ 细胞百分比越高。

综上所述,在采用 G-CSF 动员外周血造血干细胞的过程中,外周血 T 淋巴细胞亚群、血常规与动员前相比差别明显,而在动员后采集过程中则无明显差别。同时在一定范围内男性供者优于女性供者,年龄越小、体质量越轻,白细胞计数越高,经 G-CSF 动员的外周血造血干细胞 CD34⁺ 细胞百分比越高。

参考文献

- [1] 王存邦,陈幸华,等. G-CSF 对不同人群 CD34 细胞及 T 细胞亚群影响的动态变化研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(12): 1271.
- [2] Fruehauf S, Veldwijk M R, Kramer A, et al. Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human

国现代医生,2010,48(1):38-39.

- [2] 唐任光,黄庆,李荣颜,等. 微柱凝胶卡式法和传统试管法检测新生儿溶血病 3 项结果的比较[J]. 中国输血杂志,2009,22(11): 913-914.
- [3] 王滨芬. 微柱凝胶技术在新生儿溶血病检测中的应用[J]. 中外健康文摘,2010,7(1):83-84.
- [4] 钟月华,谭静,黄华华,等. 微柱凝胶技术在新生儿溶血性疾病诊断中的应用[J]. 临床和实验医学杂志,2011,10(8):613-614.
- [5] Shin SY, Kwon KC, Koo SH, et al. Evaluation of two automated instruments for pre-transfusion testing: AutoVue Innova and Techno TwinStation[J]. Korean J Lab Med, 2008, 28(3): 214-220.
- [6] 丛玉隆,王鸿利,仲人前,等. 实用检验医学上册[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:246.
- [7] 陈昌达,李就文,陈超群,等. 微柱凝胶技术检测红细胞免疫性抗体的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,5(2):342-343.
- [8] 邓想民,刘丙现,雷菊花. 132 份母婴 ABO 血型不合新生儿溶血样本检测结果[J]. 实用医技杂志,2007,14(6):743-744.
- [9] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:136.
- [10] 杨文勇,和润泞,蔡德康. 血型血清学诊断 ABO 新生儿溶血病的实验研究[J]. 医学理论与实践,2012,25(8):892-894.
- [11] 李勇,马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术[M]. 北京:科学出版社,2006:420-421.
- [12] 高峰. 输血与输血技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:101.
- [13] Brumit MC, Stubbs JR. Conventional tube agglutination with polyethylene glycol versus Red Cell Affinity Column Technology (ReACT): a comparison of antibody detection methods[J]. Ann Clin Lab Sci, 2002, 32(2): 155-158.

(收稿日期:2014-12-15)

CD34 cells from steady state bone marrow and peripheral blood mobilized following G + CSF + supported chemotherapy Stem Cells, 1998, 16(2): 271-279.

- [3] 李强,张之南,潘华珍. CD34 抗原的结构、功能和临床应用[J]. 中华血液学杂志,1997,18(5):278-281.
- [4] 白海,达万明,欧英贤. 造血干细胞研究进展[J]. 西北国防医学杂志,2000,21(1):3-5.
- [5] Duhrsen U, Villevie, Boya J, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients[J]. Blood, 1988, 72(20): 2074-2081.
- [6] 唐纬,沈志祥. 造血干细胞移植的临床应用[M]. 血液肿瘤学. 北京:人民卫生出版社,1999:130-138.
- [7] Sudhir S, Thomas A, Vowells S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34 progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency disease patients[J]. Blood, 1996, 88(10): 1104-1112.

(收稿日期:2014-11-10)