

脐血的精确自动化处理

L. Dobrila¹, S. Jiang², J. Chapman², D. Marr², K. Kryston²,
and P. Rubinstein¹

¹ National Cord Blood Program at New York Blood Center,
New York, NY, USA

² ThermoGenesis Corp, Rancho Cordova, CA, USA

在对脐血的处理过程中最关键的一步就是要将脐血的体积缩减到统一的20ml的标准,这样才有利于冷冻速率的标准化以及在有限的冷冻空间内贮存尽可能多份数的脐血。针对这个过程ThermoGenesis公司开发出了 AXP AutoXpress™ 自动化平台以用于脐血的浓缩。本文展现了 AXP AutoXpress™ 平台的处理重复性达到 19.7 ± 0.3 ml, 并且处理后使 CD34+ 细胞的回收率达到 98.2%, 克隆形成单位(CFU)的回收率为 94.6%, 单核细胞(MNC)的回收率为 97.9%。

摘要

脐血(CB)库管理规范(cGTP)要求单核细胞(MNC)在经过贮存后要达到一定的复苏能力和可繁殖能力。自动化能比较容易的严格按照脐血库管理规范要求的操作。将脐血细胞的浓缩、控制冷冻过程以及贮存和复苏等过程都实现自动化可以有效避免操作过程中不必要的短暂升温事件的发生。在保证了干细胞高回收率的情况下将收集到的脐血(70-150 ml)浓缩至 20ml。减少了脐血体积才能使冷冻过程实现标准化操作,这种按一定顺序进行的冷冻过程是维持干细胞生存能力的要素之一。AXP AutoXpress是专为脐血细胞浓缩设计的一种全自动的封闭式的无菌的操作平台。我们已经评估了 AXP AutoXpress 平台在维持干细胞高回收率的情况下将体积浓缩至标准的20ml时它之所以被称作操作平台的能力。通用电气医疗集团(GE Healthcare)在世界范围内独家推出的这款 AXP AutoXpress 操作平台将会成为基于细胞水平的研究和疾病治疗领域内的最重要的产品之一。

AXP AutoXpress 操作平台

AXP AutoXpress操作平台包括 AXP 装置、低温暂存槽、细胞分离盒件和 XpressTRAK™ 软件(图 1)。AXP 装置是由微处理器控制的,它含有可以放置细胞分离盒件的腔和用来控制将单核细胞分离和浓缩到规定体积(一般 20ml)的流速控制光学感应器。AXP 装置可放于



图 1 AXP AutoXpress 平台的组成部件

大多数的血库使用的标准离心机的离心桶内,并且用一台标准离心机可同时处理多达六份脐血。

一次性的细胞分离盒件是一个带有无菌无热源流路的封闭系统,它包括一个带有无菌输入管线和凝块过滤器的血浆袋,一个红细胞袋,一个总容积为 25ml 的冷冻袋,一截带有无菌滤器的防冻管线和方便无菌样品收集的完整切割处。AXP AutoXpress 平台使用插图见图 2。

冷冻袋是与 BioArchive 系统兼容的, BioArchive™ 是一个低温贮藏系统,它可以控制冷冻的过程,最终使样品保存在液氮中,一个系统可以冷冻和复苏 3600 份脐血。

AXP AutoXpress 平台的 XpressTRAK 软件可产生一个反映该过程的符合 GMP 要求的报告。该软件纪录了每份脐血的 ID、用户 ID、离心机 ID 以及细胞分离盒件的批号/有效期,用一种可搜索可分类的数据贮存。

实验设计

我们设计了用带有 CD34 标记的细胞和克隆形成单位细胞(CFU)来作为衡量脐血中造血祖细胞被浓缩和冷冻在 AXP 过程装置中的效率的主要指标。每一份脐血(例如一个冷冻袋)在加入了 10% 的二甲基亚砜(DMSO)作为防冻保护剂后用 BioArchive 系统在液氮中冻存 2-4 个星期,然后用标准临床程序解冻复苏。通过统计连续 23 份脐血的在经过用 AXP 平台处理前后的体积、血球容量和有核细胞(TNC)、单核细胞(MNC)、CD34+ 细胞的总数量等数据来计算细胞回收率。我们还统计了在经过 BioArchive 系统冷冻和贮藏后的各项指标。

结果

AXP处理后使单核细胞组分体积达到 19.7 ± 0.3 ml水平, 并且最终的平均血球容量为 $29.8 \pm 2.6\%$ (Table1)。见表1用 AXP 浓度前后的体积

样品	结果 ¹
处理前脐血体积	93.4 ± 12.5 ml
浓缩后的脐血体积 (目标 20ml)	19.7 ± 0.3 ml
处理后的血球容量	$29.8 \pm 2.6\%$

1 结果为平均值 \pm sd N=23

理后 CD34+ 细胞的回收率为 $98.2 \pm 8.0\%$, 克隆形成单位细胞(CFU)回收率为 $94.6 \pm 7.0\%$, 单核细胞 (MNC) 回收率为 $97.9 \pm 4.9\%$, 有核细胞 (TNC) 回收率为 $84.8 \pm 9.2\%$ (Table 2)。少于 1% 的有核细胞 (TNC) 遗失在多余的血浆袋中(Table3)。15% 数量的有核细胞 (TNC) 和少于 0.5% 的 CD34+ 细胞等粒细胞遗失在红细胞袋中。解冻后 CFU 和存活的 CD34+ 细胞的回收率分别是 $96 \pm 4.8\%$ 和 $94 \pm 2.1\%$ 。

结论

AXP AutoXpress平台对于将脐血单核细胞和CD34+细胞分离成一致的标准的体积具有有效性和可重复性。在经过BioArchive系统冷冻贮藏和复苏后细胞保留了活性(>94%)。因此 AXP AutoXpress 平台配合 BioArchive 系统可使自动化处理脐血过程达到很高的质量水准。

若了解更详细的信息, 参见以下网址: www.gehealthcare.com/cellprep



图 2 用 AXP AutoXpress 平台处理脐血的过程(A):用带条码的袋子收集胎盘血 (60-200ml)。(B):将收集袋中的血转移至 AXP 细胞分离盒件中。(C):将细胞分离盒件放入 AXP 装置中。(D): AXP 装置在1400g下离心20min,使白细胞沉降于红细胞/血浆之间的表面,然后在80g下离心20min快速将红细胞转移至红细胞袋中将白细胞转移至冷冻袋中。(E):将细胞分离盒件从 AXP 装置中取出。(F):将冷冻袋和防冻管线同细胞分离盒件其他部分分离,向冷冻袋中加入 5ml DMSO/ 右旋糖苷 40。(G):从防冻管线处密封并把防冻管线同冷冻袋分离。

表 2: 脐血体积浓缩前后有核和 CFU 细胞的数量¹

细胞数量	处理前 (脐血)	处理后 (收获的单核细胞组分)	% 回收率
有核细胞的数量 $\times 10^6$	1150 ± 273.4	969 ± 225.3	84.8 ± 9.2
单核细胞的数量 $\times 10^6$	453 ± 134.6	442 ± 126.6	97.9 ± 4.9
CD34+ 细胞的数量 $\times 10^3$	3364 ± 1594.0	3256 ± 1412.7	98.2 ± 8.0
(活细胞的百分比 %)	(99.7 ± 0.3)	(99.8 ± 0.2)	
CFU $\times 10^6$	2.6 ± 1.1	2.5 ± 1.0	94.6 ± 7.0

1 结果为平均值 +sd N=23

表 3: 在红细胞袋和血浆袋中有核细胞的遗失情况 (% 总有核细胞)¹

组分	有核细胞的遗失率 (% 总有核细胞)	单核细胞的遗失率 (% 总有核细胞)	CD34+ 细胞的遗失率 (% 总有核细胞)
红细胞袋	15.4 ± 8.4	1.1 ± 1.5	0.3 ± 0.3
血浆袋	0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.7	—

1 结果为平均值 +sd N=23

订购资料

产品	货号
AXP Startup Kit (Includes: 1 AXP Device with Weight Compensation Cap, Docking Station-Main, XpresTRAK Software, Device Stand, Counterweight, Weight Kit, Wireless Barcode Scanner, Operator Manual)	28-4044-63
AXP Device (includes Weight Compensation Cap)	28-4044-58
Docking Station, Main	28-4044-59
Docking Station, Satellite	28-4044-65
Processing Set (24/box)	28-4044-64
BioArchive Cryopreservation System, 100-120 VAC	28-4044-44
BioArchive Cryopreservation System, 200-240 VAC	28-4044-43