

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.14.002

采集到制备的不同时长对脐带血干细胞冻前质量的影响*

罗绮薇^{1,2} 蔡燕丽³ 黄炎珍² 陈伟意² 严红金³ 林汉标³马天宝³ 许超³ 钟惠敏⁴ 魏伟^{3Δ}

(1 南方医科大学第二临床医学院 广东 广州 510515; 2 广州市番禺区何贤纪念医院妇产科 广东 广州 511400;

3 广东省脐带血造血干细胞库实验中心 广东 广州 510663; 4 广州医科大学附属第二医院产科 广东 广州 510260)

摘要 目的:分析采集到制备不同的时长对脐带血干细胞的冻前相关质量指标的影响,为确定合适的采集到制备时长提供依据。**方法:**选取 1712 份脐带血样本,按照采集到制备的时长分为 <12 h 组、(12-24) h 组、(24-36) h 组和 (36-48) h 组,分析脐带血干细胞冻前有核细胞数量、有核细胞活性、CD34⁺ 细胞百分比及 CFU-GM 集落数的变化。**结果:**(1)冻前有核细胞数量随着时间延长而下降,但各组冻前有核细胞数量的差异无统计学意义($P>0.05$);(2)各组的有核细胞活性结果比较发现,(12-24) h 组和 (24-36) h 组的有核细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组间有核细胞活性比较差异均有统计学意义($P<0.05$);(3)CD34⁺ 细胞百分比随时间延长有微弱的升高趋势,但是差异无统计学意义($P>0.05$);(4)各组的 CFU-GM 集落数比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**随着脐带血采集到制备的时长增加,有核细胞活性会逐渐下降。脐带血采集后在 36 小时内制备是安全的,其干细胞的质量指标可稳定保持在较高水平,脐带血在 36-48 小时制备虽然质量有微弱下降,其干细胞的冻前质量也满足临床出库需求。

关键词:脐带血;冻存;有核细胞活性;时长;质量**中图分类号:**R-33;R457.7;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)14-2609-05

Impact of Time Interval from Collection to Processing on Quality of Umbilical Cord Blood*

LUO Qi-wei^{1,2}, CAI Yan-li³, HUANG Yan-zhen², CHEN Wei-yi², YAN Hong-jin³, LIN Han-biao³,MA Tian-bao³, XU Chao³, ZHONG Hui-min⁴, WEI Wei^{3Δ}

(1 The Second Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China; 2 Department of Obstetrics and Gynecology, He Xian Memorial Hospital of Guangzhou Panyu District, Guangzhou, Guangdong, 511400, China;

3 Guangdong Experimental Center of Cord Blood Stem Cell Bank, Guangzhou, Guangdong, 510663, China;

4 Department of Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China)

ABSTRACT Objective: In order to provide the appropriate time intervals from collection to processing of umbilical cord blood (UCB), we analyzing the relevant quality indicators from distinct groups of time intervals and its relationship. **Methods:** The amount of 1712 UCBs divided into distinct groups based on different time interval (each 12 hours increment) were assessed by the indicators including pre-cryopreservation total nucleated cells, viability of nucleated cells, CD34⁺ cell rates and CFU-GM. **Results:** (1) The pre-cryopreservation total nucleated cells declined due to the extension of transportation time, and there was no statistical difference ($P>0.05$). (2) The viability of nucleated cells was affected by time interval between collection and processing, there was no significant difference in the activity of nuclear cells between (12-24) h group and (24-36) h group ($P>0.05$), and there was significant difference in the activity of nuclear cells between the other groups ($P<0.05$). (3) The CD34⁺ % had an slight upward trend with the extension of time interval without statistical difference ($P>0.05$). (4) CFU-GM was not affected by time interval from collection to processing in each group ($P>0.05$). **Conclusion:** The extension of the time from collection to processing of UCBs can reduce the quality by decreasing cell viability. UCBs was safe to cryopreservation within 36 hours, and its related quality indicators can be stably maintained at a high level. Though the quality of UCBs was slightly decreased in 36-48 hours, it was still fit the standards for clinical transplantation.

Key words: Umbilical cord blood; Cryopreservation; Viability of nucleated cells; Time interval; Quality**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R457.7; R331.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)14-2609-05

* 基金项目:广东省科技计划项目(2015B020227003)

作者简介:罗绮薇(1971-),女,本科,副主任医师,研究方向:妇产科,E-mail: gdcbbkeyan@163.com

Δ 通讯作者:魏伟(1967-),女,博士,助理研究员,研究方向:脐带血、干细胞、病理学检测,E-mail: wwwei@chinacord.org

(收稿日期:2020-01-23 接受日期:2020-02-17)

前言

脐带血富含造血干细胞,是骨髓和外周血以外重要的干细胞来源之一^[1,2]。自1988年Eliane Gluckman等成功实施了世界上首例儿童人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)相合的同胞脐带血移植后,脐带血干细胞移植治疗各种恶性与非恶性的血液病、遗传性及先天性疾病已在临床上得到广泛应用^[3,4]。脐带血因其来源的特殊性,制备后的造血干细胞需要以实物形式冻存在液氮环境下^[5]。由于单份脐带血的造血干细胞数量有限,且冻存前还需经过运输、制备等过程,其有核细胞数和活性可能会受到一定影响^[6]。为了减少干细胞的损失及活性下降,脐带血采集后需尽快送回脐带血库进行制备冻存^[7]。据报道,不同国家地区对于脐带血采集到制备时长制定的标准都不尽相同^[8,9]。本研究通过分析1712份脐带血不同时长下制备后的质量指标的变化,为制定冻存前脐带血允许存放的最长时长提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

脐带血采血袋(山东威高,含28 mL血液保存液),6%羟乙基淀粉(HESPA[®], B.BRAUN公司),甲基纤维素培养基(StemCell公司),RPMI-1640培养基(GIBCO),单抗CD45-FITC、单抗CD34-PE、IgG1-PE、7-AAD和1%溶血素均购自BD公司,计数相关试剂均购自Sysmex公司。医用低温离心机(RC 3BP+, Thermo Scientific公司),自动血液分析仪(XE-5000),热合机(SE250型,韩国森通),超净工作台(SW-CJ-2FD, 苏净安泰空气技术有限公司),CO₂培养箱(FORMA公司),倒置显微镜(CK40和CKX41, OLYMPUS公司),流式细胞仪(FACSCalibur, BD公司)。

1.2 脐带血来源

脐带血来自广东省内二甲以上医院,采集前产妇均已签署脐带血采集知情同意书,填写产前化验检查结果、健康调查表,以记录产妇本人及家属的家族病史和遗传病史。所有产妇产前进查乙肝表面抗原(HBsAg)、丙肝抗体(HCV-Ab)、梅毒抗体(TP-Ab)、艾滋病抗体(HIV-Ab)均为阴性,地中海贫血及G-6-PD缺乏症均为正常。脐带血采集于包含28 mL血液保存液(即含枸橼酸盐、磷酸盐、葡萄糖和腺嘌呤等物质的抗凝剂)的采血袋中,通过相同的运输条件送回脐带血库。

1.3 脐带血制备及检测

1.3.1 收血 每份脐带血由两人复核产妇的生产时间、产前化验、健康调查等信息,热合去除采血针及多余管路后,血袋称重并计算脐带血量、羟乙基淀粉添加量(按照血量与羟乙基淀粉以5:1的比例添加)。每份脐带血编码其唯一的编号,然后对血袋表面进行消毒,再送脐带血制备间处理。本研究使用的脐带血量范围在50-80 mL。

1.3.2 脐血分离 脐带血先取1 mL全血血样用于计算制备前的有核细胞总数。根据Rubinstein等^[10]建立的标准分离方法分离脐带血,浓缩后的脐带血用注射器测量体积(浓缩血量),留取0.5 mL血样用于计算冻前有核细胞总数,另留取0.5 mL血样用于CFU-GM集落细胞培养及有核细胞活性、CD34⁺细胞

含量分析。

1.3.3 采集到制备时长的分组 脐带血的采集时间点以新生儿出生时间为节点,制备时间点则以脐带血制备结束为节点,计算两个节点的时长作为采集到制备的时长,根据时长范围划分为四组样本,分别为<12 h组、(12-24) h组、(24-36) h组和(36-48) h组。

1.3.4 冻前有核细胞计数 计数浓缩后脐带血有核细胞的浓度,根据浓缩血量与有核细胞的浓度乘积计算冻前有核细胞总数。

1.3.5 CFU-GM 集落计数^[11] 浓缩后脐带血样本抽取约0.1 mL加入RPMI-1640培养液制备成稀释约10倍的细胞悬液,充分混匀细胞悬液后取出200 μ L于XE-5000(Sysmex)型自动血液分析仪计算冻前TNCs。根据标本细胞悬液浓度及最终培养体系为3.3 mL,结合计算所需加入的甲基纤维素培养基及细胞悬液的各自体积,制成有核细胞终浓度定量为 5×10^4 /mL的培养体系。将培养体系平均加入6孔培养板的3个孔中,保证每孔都有1 mL。将培养板放入37℃、5% CO₂、湿度>95%的CO₂培养箱中培养14天。培养结束取出培养板在倒置显微镜下观察,统计每份脐带血培养的3个孔的集落数,取其均值作为该份脐带血的CFU-GM细胞计数结果。

1.3.6 CD34⁺ 细胞含量及有核细胞活性 干细胞培养室取样后的剩余血样作为待检样本。每份标本准备2支试管,1管为对照管,1管为测试管。往对照管中依次加入单抗CD45-FITC 5 μ L、IgG1-PE(CD34-PE阴性对照)5 μ L,测试管依次加入单抗CD45-FITC 5 μ L、单抗CD34-PE 5 μ L,加完后放入2℃-8℃冰箱内避光暂存。取出已加入CD45-FITC、CD34-PE和IgG1-PE的试管架,往测试管中依次加入7-AAD 10 μ L。去红去浆的浓缩血样依次往对照管和测试管各加入100 μ L血量。涡旋振荡器上充分混匀,室温避光孵育16分钟。孵育完成后,分别往2个试管加入2.5 mL 1%溶血素并轻轻混匀,室温避光反应10分钟-15分钟后500 $\times$ g离心力下室温离心3分钟,弃上清液并用纸巾控干管口。再分别用1.5 mL PBS洗涤细胞、离心、去上清,最后各加0.5 mL PBS轻轻混匀,检查是否有凝块,则待上机样本制备完成。

流式细胞仪检测已标记好的样本,根据ISHAGE标准^[12],利用CD45、CD34单克隆抗体(CD45是有核细胞的特异性标志物,CD34是造血干祖细胞的特异性标志物)来对脐带血进行检测。根据造血干祖细胞的4个特征(CD34阳性,CD45弱阳性,低SSC,FSC与淋巴细胞相似)圈选出造血干祖细胞占有核细胞的含量,即得到CD34⁺细胞含量^[13]。根据7-AAD可使死细胞染色的原理来检测脐带血中活细胞占有核细胞的含量,即有核细胞活性^[14]。

1.4 数据统计

数据分析采用SPSS 22.0软件,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,两组间差异的比较采用t检验,多组间的比较采用单因素方差分析。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 采集到制备时长对脐带血冻前有核细胞数和有核细胞活性的影响

冻前有核细胞数量随着采集到制备时间延长呈现轻微下

降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),有核细胞活性随着采集到制备时间延长呈现轻微下降趋势,但是均值仍保持在90%以上,不同时组长组间分别比较发现,除了(12-24)h组和(24-36)

h组的差异无统计学意义($P>0.05$),其余组别比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1;各组有核细胞活性的分布如表2所示,时长越短,有核细胞活性 $>95\%$ 的比例越高。

表1 各组冻前有核细胞的数量和有核细胞活性比较

Table 1 Comparisons of pre-cryopreservation total nucleated cells numbers and viability of nucleated cells

Groups	n	Pre-cryopreservation total nucleated cells($\times 10^8$)	Viability of nucleated cells(%)
<12 h group	209	7.08 $\pm$ 1.94	97.86 $\pm$ 2.15
(12-24) h group	814	6.99 $\pm$ 2.11	96.47 $\pm$ 2.70 ^a
(24-36) h group	642	6.87 $\pm$ 2.09	96.44 $\pm$ 2.32 ^a
(36-48) h group	47	6.76 $\pm$ 2.00	94.89 $\pm$ 2.13 ^{abc}
F	-	1.658	6.328
P	-	0.369	0.005

Notes: Compared with <12 h group, ^a $P<0.05$, compared with (12-24) h group, ^b $P<0.05$, compared with (24-36)h group, ^c $P<0.05$.

表2 各组有核细胞活性的分布

Table 2 Viability of nucleated cells distribution in each group

Groups		<12h group	(12-24) h group	(24-36) h group	(36-48) h group
		(n=209)	(n=814)	(n=642)	(n=47)
Viability of nucleated cells(%)	>95	92.34%(193/209)	78.01%(635/814)	77.73%(499/642)	48.94%(23/47)
	90-95	5.74%(12/209)	18.92%(154/814)	20.4%(131/642)	46.81%(22/47)
	<90	1.91%(4/209)	3.07%(25/814)	1.87%(12/642)	4.26%(2/47)

2.2 采集到制备时长对脐带血 CD34⁺ 细胞含量的影响

各组的脐带血在制备后,CD34⁺ 细胞含量的均值达到0.30%及以上,各组间比较未有显著差异($P>0.05$),见表3;各

组 CD34⁺ 细胞含量在 $>0.5\%$ 、 $(0.2-0.5)\%$ 和 $<0.2\%$ 的区间分布趋势基本一致,见表4。

表3 各组 CD34⁺ 细胞含量比较Table 3 Comparisons of CD34⁺ cells contents in each group

Groups	n	CD34 ⁺ (%)
<12 h group	209	0.33 $\pm$ 0.24
(12-24) h group	814	0.31 $\pm$ 0.23
(24-36) h group	642	0.31 $\pm$ 0.21
(36-48) h group	47	0.34 $\pm$ 0.32
F	-	1.887
P	-	0.201

表4 各组 CD34⁺ 细胞含量的分布比例Table 4 Distribute ratio of CD34⁺ cells contents in each group

Groups		<12h group	(12-24) h group	(24-36) h group	(36-48) h group
		(n=209)	(n=814)	(n=642)	(n=47)
CD34 ⁺ cells contents (%)	>0.5	21.05%(44/209)	19.04%(155/814)	17.44%(112/642)	29.78%(14/47)
	0.2-0.5	62.2%(130/209)	59.58%(485/814)	60.12%(386/642)	53.19%(25/47)
	<0.2	16.76%(35/209)	21.37%(174/814)	22.42%(144/642)	17.00%(8/47)

2.3 采集到制备时长对脐带血细胞 CFU-GM 集落数的影响

各组的脐带血在制备后,CFU-GM 集落数均值达到 120

($\times 10^5$)及以上,各组间的差异均无统计学意义($P>0.05$),见表5。

表 5 各组 CFU-GM 集落数比较
Table 5 Comparisons of CFU-GM colony number in each group

Groups	n	CFU-GM(× 10 ⁵)
<12 h group	209	124.24± 47.31
(12-24) h group	814	123.31± 48.30
(24-36) h group	642	122.28± 48.29
(36-48) h group	47	123.29± 47.32
F	-	2.854
P	-	0.068

3 讨论

随着脐带血研究的不断深入,未来脐带血的应用数量及范围将逐步上升,脐带血的质量是其临床应用价值的关键^[15,16]。移植前对脐带血的筛选,除了 HLA 配型结果及血型以外,有核细胞数、CD34⁺ 细胞含量、有核细胞活性及 CFU-GM 集落计数也是评价脐带血制备冻存质量的重要指标^[17-19]。脐带血从医院采集后到血库制备冻存之间存在时间间隔,该时间长短与医院到血库之间的距离呈现正相关。国际上对于脐带血从采集到冻存时长制定的标准并未统一,各学者研究采集到制备的时长对脐带血质量的影响仍存在争议,例如:德国对脐带血的质量标准要求为应在采集后 48 小时之内制备冻存^[20];NetCord-FACT 规定公共库脐带血需在 48 小时内制备,自体库需在 72 小时内制备^[21]。Louis I 等研究发现脐带血制备前室温下最多可存放 3 天,建议保存在室温下 48 小时内完成加工^[22];Pereira-Cunha 等发现脐带血可延迟至 96 小时内冻存,其 CD34⁺ 细胞数量的损失与功能下降仍在可接受范围内^[23]。

本研究共分析 1712 份脐带血样本,统计采集到制备时长分别为 <12 h、(12-24)h、(24-36)h 及 (36-48)h,考察脐带血的冻前有核细胞的数量、有核细胞活性、CD34⁺ 细胞百分比和 CFU-GM 集落数等指标的变化,从大样本数据中探索脐带血储存时长与制备质量的关系。

本研究发现,在 36 小时以内制备完毕的脐带血,冻前有核细胞活性均值保持在 96%以上;36 至 48 小时内制备完毕的有核细胞活性虽有轻微下降,但是仍保持在 94.89%左右,均高于美国食品药品监督管理局提议的脐带血冻前有核细胞活性水平需达到 85%以上的标准^[24]。在 CD34⁺ 细胞含量上,48 小时以内制备完毕的脐带血该指标的均值都高于 0.30%,且各组 CD34⁺ 细胞含量在 >0.5%、(0.2-0.5)% 和 <0.2% 的区间分布趋势基本一致,说明虽然脐血的 CD34⁺ 细胞含量具有个体差异,但是总体上并未受到储存时间的长短的影响。CFU-GM 集落数在各组的差异无统计学意义,说明在采集后 48 小时内制备的脐带血,其造血干细胞的增殖能力没有受到明显的影响,印证了 CD34⁺ 细胞的活性水平较稳定的结果。Chin-Yee 等的研究发现,CD34⁺ 细胞群在采集后 48 小时内分析,其数量及活性仍然保持稳定^[25]。Kurtzberg 等的研究表明脐带血采集后在 48 小时内制备,其有核细胞数及 CD34⁺ 细胞活性仍维持在正常水平^[26]。Louis 等学者发现,脐带血在采集后 72 小时内制备,其 CD34⁺ 细胞活性和增殖能力并没有受到影响^[22]。Radke 等人的研究分

析了 CD34⁺ 细胞的增殖活性对 CFU-GM 集落数的影响,发现集落的形成效率与干细胞的种子密度有较强的相关性^[27],由此可见脐带血 CFU-GM 集落数与 CD34⁺ 细胞含量有一定的关联。本研究在 48 小时内 CFU-GM 集落数的变化水平与 CD34⁺ 细胞含量的变化趋势一致,也显示了两者的具有一定的关系。

此外,本研究后续仍可增加测量的指标,以分析储存时长对脐带血质量的影响。例如:增加储存温度的变化对脐带血制备后质量的影响;增加解冻后脐带血干细胞的上述指标的检测,以对比冻前及冻后的差异,进一步分析脐带血制备前的储存时长对后续的质量的影响^[28-30]。

综上所述,脐带血采集后 48 小时内制备完毕,其冻前有核细胞数量、CFU-GM 集落计数、CD34⁺ 细胞含量等质量指标均处在较为一致的水平,只有随着脐带血采集到冻存的时长增加,有核细胞活性会出现微弱的下降趋势;整体上看脐带血在 36 小时内完成制备冻存,其有核细胞数量、有核细胞活性、CFU-GM 集落计数以及 CD34⁺ 细胞率等质量指标仍可保持较高水平,满足脐带血临床出库的需求。而脐带血采集后在 36-48 h 内冻存,有核细胞活性、CD34⁺ 细胞率和 CFU-GM 集落计数等指标仍显示满足其质量的需求。因此脐带血在 36 小时内冻存是安全的,其相关的质量指标可稳定保持在较高水平,36-48 小时冻存质量有轻微下降,在移植应用前需结合有核细胞活性、CD34⁺ 细胞含量和 CFU-GM 集落计数等指标评估造血干细胞的数量。

参 考 文 献(References)

- [1] Portnoy S, Milligan N, Seed M, et al. Human umbilical cord blood relaxation times and susceptibility at 3 T [J]. Magn Reson Med, 2018, 79(6): 3194-3206
- [2] Portnoy S, Osmond M, Zhu MY, et al. Relaxation properties of human umbilical cord blood at 1.5 Tesla [J]. Magn Reson Med, 2017, 77(4): 1678-1690
- [3] Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling[J]. N Engl J Med, 1989, 321(17): 1174-1178
- [4] Mousavi SH, Zarrabi M, Abroun S, et al. Umbilical cord blood quality and quantity: Collection up to transplantation [J]. Asian J Transfus Sci, 2019, 13(2): 79-89
- [5] Huang Y, Chapal Hossain SM, Memon K, et al. A Simple and Reliable Cooling Approach for the Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: the Passive Cooling Rate-controlled Technique[J]. Cryo Letters,

- 2019, 40(3): 181-186
- [6] Panch SR, Szymanski J, Savani BN, et al. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2017, 23(8): 1241-1249
- [7] Mata MF, Hernandez D, Rologi E, et al. A modified CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cell isolation strategy from cryopreserved human umbilical cord blood [J]. Transfusion, 2019, 59(12): 3560-3569
- [8] 楚晓婷, 李天宇, 周新, 等. 人脐带血体外扩增和临床应用的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2017, 12(5): 434-440
- [9] Bravo-Acevedo A, Barquera R, Bekker-Méndez C, et al. HLA concordance between hematopoietic stem cell transplantation patients and umbilical cord blood units: Implications for cord blood banking in admixed populations[J]. Hum Immunol, 2019, 80(9): 714-722
- [10] Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(22): 10119-10122
- [11] Hussein E, DeFor T, Wagner JE, et al. Evaluation of post-thaw CFU-GM: clinical utility and role in quality assessment of umbilical cord blood in patients receiving single unit transplant[J]. Transfusion, 2020, 60(1): 144-154
- [12] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering [J]. J Hematother, 1996, 5(3): 213-226
- [13] Wathiong B, Deville S, Jacobs A, et al. Role of nanoparticle size and sialic acids in the distinct time-evolution profiles of nanoparticle uptake in hematopoietic progenitor cells and monocytes [J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17(1): 62
- [14] 蔡思齐, 邓志辉. 流式细胞术检测 NK 细胞的细胞毒作用的两种方法比较[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(3): 325-330
- [15] Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future[J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(6): 691-699
- [16] 贾静, 余俊, 王少帅, 等. 人脐带血中内皮克隆形成细胞的分离和培养[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(10): 1812-1815
- [17] S-Y Ong, C Phipps, P Chu, et al. Cord blood unit factors influencing transplant outcomes from the Asian multiethnic Singapore Cord Blood Bank [J]. Bone Marrow Transplantation, 2015, 50(9): 1256-1258
- [18] Hanadi Rafii, Françoise Bernaudin, Helene Rouard, et al. Family cord blood banking for sickle cell disease: a twenty-year experience in two dedicated public cord blood banks [J]. Haematologica, 2017, 102(6): 976-983
- [19] Diana Vanegas, Lady Triviño, Cristian Galindo, et al. A new strategy for umbilical cord blood collection developed at the first Colombian public cord blood bank increases total nucleated cell content [J]. Transfusion, 2017, 57(9): 2225-2233
- [20] Strobel J, Brenner L, Zimmermann R, et al. Influence of Duration and Temperature of Transport and Storage Prior to Processing on Cell Quality of Cord Blood Units--A German Experience[J]. Clinical laboratory, 2015, 61(10): 1453-1461
- [21] Pasha R, Halpenny M, Pineault N. Overcoming the deceptively low viability of CD45⁺ cells in thawed cord blood unit segments [J]. Vox Sang, 2019, 114(8): 876-883
- [22] Louis I, Wagner E, Dieng MM, et al. Impact of storage temperature and processing delays on cord blood quality: discrepancy between functional in vitro and in vivo assays [J]. Transfusion, 2012, 52(11): 2401-2405
- [23] Pereira-Cunha FG, Duarte ASS, Reis-Alves SC, et al. Umbilical cord blood CD34⁺ stem cells and other mononuclear cell subtypes processed up to 96 h from collection and stored at room temperature maintain a satisfactory functionality for cell therapy [J]. Vox Sanguinis, 2015, 108(1): 72-81
- [24] Matsumoto MM, Matthews KR. A Need for Renewed and Cohesive US Policy on Cord Blood Banking [J]. Stem Cell Rev Rep, 2015, 11(6): 789-797
- [25] Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, et al. Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. Canadian QASE Study Group[J]. Cytometry, 1997, 30(6): 296-303
- [26] Kurtzberg J, Cairo MS, Fraser JK, et al. Results of the Cord Blood Transplantation (COBLT) Study unrelated donor banking program[J]. Transfusion, 2005, 45(6): 842-855
- [27] Radke TF, Barbosa D, Duggleby RC, et al. The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Appliance of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays[J]. Stem Cells International, 2013, 20(13): 1-10
- [28] 曾桂芳, 曾伟杰, 蔡菲子, 等. 脐血与老人外周血中 TIMP2 蛋白检测的影响因素及意义[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2019, 9(4): 211-215
- [29] Romanov YA, Balashova EE, Volgina NE, et al. Changes in Cell Composition of Umbilical Cord Blood and Functional Activity of Hematopoietic Stem Cells during Cryogenic Storage and Repeated Freezing/Thawing Cycles [J]. Bull Exp Biol Med, 2016, 160(4): 571-574
- [30] Schwandt S, Liedtke S, Kogler G. The influence of temperature treatment before cryopreservation on the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34⁺ and CD45⁺ cord blood cells[J]. Cytotherapy, 2017, 19(8): 962-977