



脂肪干细胞分离纯化方法研究进展

刘 琴,王丽平,陈 芳,张 宜

(解放军广州军区武汉总医院医学实验科,武汉 430070)

【摘要】 脂肪干细胞作为种子细胞广泛应用于组织工程中,而获得足够量的、活性高的、高纯度的脂肪干细胞是其在组织工程中应用的前提。本文综述近几年来脂肪干细胞分离纯化方法的研究进展,比较各方法的优缺点,为分离纯化出理想的脂肪干细胞提供理论依据。

【关键词】 脂肪干细胞;分离;纯化;组织块贴壁法;酶消化法;免疫磁珠分选法;密度梯度离心法

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0069-05

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2015.007.015

Progress in the isolation and purification methods of adipose-derived stem cells

LIU Qin, WANG Li-ping, CHEN Fang, ZHANG Yi

(Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Adipose-derived stem cells (ASCs) as potential seeded cells have been widely used in tissue engineering. Thus to obtain enough, high activity, high purity adipose-derived stem cells is the particular important premise of the application in tissue engineering. In this paper, the isolation and purification methods of ASCs were reviewed and the merit and demerit of different methods were compared in order to provide theoretical basis for safe and high-effective isolation and purification of ASCs.

【Key words】 Adipose-derived stem cells; Isolation; Purification; Explants culture method; Enzymatic digestion method; Immunomagnetic beads sorting method; Density gradient centrifugation

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells)来源于脂肪组织,取材方便、对自体损伤较小,具有自我更新、多向分化能力、自体移植不发生排斥反应等特点,是组织工程中最有应用前景的种子细胞之一。然而有研究表明,脂肪组织中存在的脂肪干细胞含量很低,占3%左右,并且分离出来的细胞纯度不理想^[1]。因此如何获得足够量的、活性高的、高纯度的细胞极为重要。随着科研技术的不断发展,研究者提出了脂肪干细胞不同的分离纯化方法。本文

就近年来脂肪干细胞分离纯化方法的新研究进展作一综述。

1 脂肪干细胞分离方法

1.1 组织块贴壁法

组织块贴壁法即将脂肪组织剪成适宜大小的组织块,然后将组织块贴壁到培养瓶中进行培养^[2]。此法的核心是确保脂肪组织块贴壁,但在实际操作中很难保证每块组织块贴壁,尤其是在换液

[作者简介]刘琴(1986-),女,技师,硕士,从事细胞生物学和分子生物学方面的研究,E-mail: liuqin_0629@163.com

[通讯作者]张宜(1965-),男,硕士,主任药师,从事药学信息研究,E-mail: abcd1566@sina.com

过程中,组织块很容易漂浮,导致脂肪组织的浪费。

Jing W 等人^[3]采用组织块贴壁法分离培养 8 周龄 BALB/c 小鼠脂肪干细胞时,在脂肪组织剪碎之前,先吸取脂肪组织表面附着的多余水分,将脂肪组织块接种到培养瓶后让组织块贴壁一段时间后再加入细胞培养液,这样的处理可以使脂肪组织块更加牢固地贴在培养瓶上。本实验室采用此法分离脂肪干细胞时将组织块接种到培养瓶后置于培养箱内培养 30 min 后再加入培养液,使得组织块贴壁更加牢固^[4]。

1.2 酶消化法

酶消化法为原代细胞培养常用的方法之一,原理是利用新鲜离体组织的细胞生物学特性未发生明显的变化,仍具有二倍体遗传特性,通过消化液去除细胞间质,使细胞能够更好地吸收外界营养和排出代谢产物,短时间内获得大量的活细胞。脂肪组织酶消化法即脂肪组织被剪成碎块置于酶中消化,再通过过滤、洗涤和离心等步骤去除漂浮在上层的脂肪细胞和油脂,从而得到脂肪干细胞。Jiang A 等^[5]通过酶消化法从人脂肪组织中分离出脂肪干细胞,所培养的细胞贴壁生长、细胞形态为典型的长梭形成纤维样,表达脂肪干细胞特殊的表面标记物 CD29、CD44、CD105,阴性表达造血干细胞相关的表面标记物 CD34、CD45。

酶消化法实际上是一种费时、昂贵的方法,尤其是在需要分离大量脂肪组织的时候,其弊端显得更为突出;在酶的种类、浓度、消化时间上存在很大差异,缺乏统一的标准,大多数研究者采用 I 型胶原酶消化分离原代细胞^[6],少数采用 II 型胶原酶^[7]、IV 型胶原酶、VIII 型胶原酶^[8]、胰酶^[9]或者胶原酶联合应用胰酶^[10]进行消化分离,酶的使用浓度从 0.05 ~ 2.5 g/L 不等^[11-14],消化时间范围为 0.5 ~ 3 h^[15-17],从而使得分离出来细胞的活性、表型、潜能存在一定的差异;另一方面,市场上的胶原酶和胰酶纯度不高,可能包含有色素、内毒素、异种抗原、异种蛋白酶体^[18-19];消化法获得的脂肪干细胞不纯;人为操作过多,容易造成污染;此外,需要的脂肪组织量较大,当脂肪组织量较少时,采用此法无法扩增出足够量的脂肪干细胞用于后续分析^[20]。

Griesche N 等^[21]在常规胶原酶消化法分离脂肪干细胞的基础上作了一些改进,在消化获得的细胞接种培养 60 min 后马上进行换液,与常规胶原酶消化法相比,此法可以明显减少 desmin、smA 和 six2

的表达,提高干细胞标记物 nestin、oct-4 和 sall-1 的表达。Carvalho PP 等^[22]使用临床级的无异源蛋白的释放酶消化人脂肪组织,消化获得的脂肪干细胞活性和功能与使用科研级的胶原酶 I、胶原酶 A、胶原酶 NB4 相比无明显区别,表明高度纯化的释放酶可替代科研级的胶原酶,减少酶中异源蛋白对脂肪干细胞的污染。Güven S 等^[23]使用 sepax 装置自动分离脂肪干细胞,方法是将样品和胶原酶装入转移袋中,37℃ 孵育 1 h 后,转移袋与 CS-490.1 试剂盒相接,在 sepax 装置中启动 CS-490.1 试剂盒开始自动消化,收集消化所得细胞,此装置分离得到的脂肪干细胞比传统的手动消化法效率高、细胞产量高、人为干预少。胡金灵等^[24]分离 SD 大鼠脂肪干细胞时采用 0.25% I 型胶原酶消化脂肪组织 30 min,离心,将获得的细胞接种培养获得所需的细胞,此法提高了胶原酶浓度,缩短消化时间,可减少胶原酶对细胞活性的影响;省略了传统胶原酶消化法中筛网过滤和红细胞裂解两个步骤,降低人为操作、试剂对脂肪干细胞的损伤。

1.3 其他方法

近几年来,除了传统的脂肪干细胞分离方法,还有些寻求突破的新方法出现。

1.3.1 吸附柱法

Ito K 等^[25]于 2010 年首次使用由非织造织物组成的装置从骨髓中成功分离出间充质干细胞,分离出来的细胞表达间充质干细胞细胞表型标记物,具有成脂成骨潜能。Doi K 等^[26]参照上述方法设计出一个由无纺纤维和聚乙烯织物组成的网格直径为 100 μm 的吸附柱,此无纺纤维和聚乙烯织物对贴壁细胞具有亲和力,具体方法是将抽脂产物的液体部分通过吸附柱,贴壁细胞吸附到吸附柱中,再通过逆流冲洗出吸附柱中吸附的细胞,获得的细胞接种培养,扩大的细胞表达脂肪干细胞相关的表面标记物,具有向脂肪细胞与成骨细胞分化的能力,成功从抽脂产物液体部分中分离出脂肪干细胞。此法可以避免酶的使用,但是仅适用于抽脂产物的液体部分,而且需要大量的样品。

1.3.2 直接离心法

直接离心法的原理是通过离心收集吸脂时吸脂产物中混有的游离脂肪干细胞,将离心得到的脂肪干细胞接种培养。Shah FS 等^[27]将得到的吸脂产物用磷酸盐缓冲液洗涤,离心,分别收集上层漂浮物和下层沉淀物,上层漂浮物加入磷酸盐缓冲液再

次洗涤,离心,此过程重复 3 ~ 4 次,将每次获得的下层沉淀物接种到培养瓶则可获得脂肪干细胞。此法仅适用于吸脂手术获得的脂肪组织,并且需要大量的吸脂产物。

1.3.3 胶原酶消化法结合组织块贴壁法

侯晓琳等^[28]分离 C57BL/6J 小鼠脂肪干细胞时将 I 型胶原酶消化获得的单细胞以及未消化完全的脂肪组织块一起接种到培养皿中,8 ~ 9 d 时细胞即铺满皿底。此法将胶原酶消化法与组织块贴壁法两种方法有机结合起来,在短时间内适度消化降低胶原酶对细胞活力损伤,同时把剩余未消化的脂肪组织块一起接种,可以充分利用脂肪组织。不足之处是此法未与单独采用 I 型胶原酶消化法、组织块贴壁法所获得的脂肪干细胞在细胞产量、活性、分化潜能等方面进行比较。

2 脂肪干细胞纯化方法

为获得纯度较高的脂肪干细胞,目前有学者在分离的基础上结合相应的纯化方法,以获得研究需要的细胞,现有的脂肪干细胞纯化方法如下。

2.1 免疫磁珠分选法

免疫磁珠分选法分离纯化细胞的原理是基于细胞表面抗原与连在磁珠上相应的特异性单抗结合,当单细胞悬液通过特定的外加磁场时,与磁珠相结合的细胞被吸附滞留在磁场中,未与磁珠结合的细胞则不能被吸附在分选柱内,从而使细胞得以分离。免疫磁珠分选法将细胞生物学、磁力学和免疫学等知识融于一体,具有高度特异性分选细胞的特点。Gierloff M 等^[29]使用免疫磁珠分离法从培养的大鼠脂肪干细胞中分离纯化出 CD29⁺、CD71⁺、CD73⁺、CD90⁺ 各脂肪干细胞亚群,各干细胞亚群均具向脂肪细胞分化的能力,但是 CD29⁺ 干细胞亚群的成脂能力强于 CD71⁺、CD73⁺、CD90⁺ 各干细胞亚群。

免疫磁珠分选法纯化脂肪干细胞顺利进行的重点侧重于标记磁珠时相应抗体的选择,若只用单一特异性标记物原则上会造成其他脂肪干细胞亚群的丢失。目前有报道用 CD29、CD44、CD49d、CD73、CD105 等作为纯化脂肪干细胞的表面标记物^[30]。然而,至今为止研究者们对于脂肪干细胞的特异性标记物还存在一定的争议,尤其是 CD34。2006 年国际细胞治疗协会规定 CD34 为脂肪干细胞的阴性标记物^[31]。随后许多研究者也同样认为脂

肪干细胞不表达 CD34。最近几年,越来越多的研究者发现早期培养的脂肪干细胞表达 CD34^[32-35]。Baer PC^[36]认为脂肪干细胞的细胞表型在体外是动态的,随着传代次数的增多有的细胞表型消失,有的细胞表型增加。故采用免疫磁珠法纯化脂肪干细胞时选择的抗体和细胞传代次数很重要。此外,常用的免疫磁珠分选法如亲和吸附柱、FACS 组织培养瓶铺展贴壁、MACS 都存在一些不足之处,如实验设备昂贵、试验成本高、技术要求高、分离出来的细胞容易污染、对细胞活力有一定的损伤等。重要的是分离出来的细胞仍然具有人工修饰的非自身的 Ig 片段,进行细胞移植治疗时可能会引发一系列宿主反应,尤其是会产生活性氧,活性氧进一步引起炎症反应,同时影响脂肪干细胞自身的修复能力^[37]。

2.2 密度梯度离心法

密度梯度离心法是根据不同颗粒之间的沉降系数不同,在一定离心力作用下,不同颗粒以自己的速度沉降,在密度梯度不同区域上形成区带,从而不同密度的细胞得到分离。杜明昌等^[38]采用密度梯度离心法分离由真空负压抽脂法吸取的猪皮下脂肪 50 g,可获得 $(2.1 \sim 2.7) \times 10^6$ 个脂肪干细胞。

密度梯度离心法能够顺利进行在于介质的选择和介质最佳密度的确定上,目前常用的离心介质为聚蔗糖(Ficoll)和经过聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒混悬液(Percoll)。Chang 等^[39]研究发现利用 Ficoll 分离纯化出来的人骨髓间充质干细胞在成核细胞数目及集落形成率均高于 Percoll 法,且 Ficoll 法纯化出来的细胞显著高表达 CD90⁺、CD105⁺、CD166⁺ 和 SH3⁺,认为 Ficoll 更适用于制备人骨髓间充质干细胞。Bourzac 等^[40]的研究表明采用 Percoll 法分离纯化马骨髓间充质干细胞的细胞产量及自我更新潜能优于 Ficoll 法。Grisendi 等^[41]用 1.073 g/mL、1.077 g/mL 两种不同密度的 Ficoll 分离纯化骨髓间充质干细胞,结果显示,前者所得细胞在免疫荧光表达实验中更具有活力,成纤维细胞集落形成单位高出后者 1.5 倍,细胞产量高出后者 1.8 倍。上述研究表明使用不同介质、不同密度的同一种介质体外分离纯化骨髓间充质干细胞时对细胞的活性、产量、表型有着不同程度的影响,然而密度梯度离心常用介质是否对脂肪干细胞的各方面存在影响还不得而知。

3 小结

寻找一种操作简单、可控性强、经济的脂肪干细胞分离方法一直是学者们研究的重要内容。现有脂肪干细胞的分离方法种类较多,都存在一些缺点。组织块贴壁法在操作中保证脂肪组织块牢固贴壁是一个难题。酶消化法需要在酶的种类、浓度、消化时间上制定统一标准。有研究表明采用组织块贴壁法分离出来的脂肪干细胞产量高于酶消化法,所得细胞活性、细胞表型、成脂成骨分化能力与酶消化法相比无明显区别^[3,20]。若能解决组织块贴壁法组织块贴壁难的问题,那么组织块贴壁法将是一种前景可观的脂肪干细胞分离方法,因为组织块贴壁法既可避免酶的使用对细胞各方面造成的潜在影响,又具有经济实惠、可控性比酶消化法强的特点。其他脂肪干细胞的分离方法虽然在一定程度上可以弥补传统方法的一些缺点,但是仍然不能解决现有脂肪干细胞分离方法存在的不足。要获得高纯度的脂肪干细胞,紧接细胞分离后即可进行细胞纯化,免疫磁珠分选法所使用的设备和抗体比较昂贵,不适用于一般的科研试验和临床研究。密度梯度离心法所使用的试剂和设备比免疫磁珠分选法所采用的试剂和设备相对来说便宜很多,而且分离出来的脂肪干细胞纯度较高,若能弄清楚离心介质是否对脂肪干细胞各方面造成影响,则密度梯度离心法将是比较理想的脂肪干细胞纯化方法。

参考文献:

- [1] Fraser JK, Zhu M, Wulur I, *et al.* Adipose-derived stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 449:59-67.
- [2] Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, *et al.* Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 27:1-9.
- [3] Jing W, Xiao J, Xiong Z, *et al.* Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering[J]. *Artif Organs*, 2011, 35(2):105-112.
- [4] 刘琴,王丽平,喻晶,等. 组织块贴壁法扩增兔脂肪干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1):88-93.
- [5] Jiang A, Li M, Duan W, *et al.* Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF [J]. *Scientific World Journal*, 2015, 2015:968057.
- [6] Kim DS, Lee MW, Yoo KH, *et al.* Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83363.
- [7] Cakici C, Buyrukcü B, Duruksu G, *et al.* Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:529589.
- [8] Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, *et al.* Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4):701-709.
- [9] Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4):693-702.
- [10] He F, Pei M. Extracellular matrix enhances differentiation of adipose stem cells from infrapatellar fat pad toward chondrogenesis [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(1):73-84.
- [11] Razmkhah M, Jaberipour M, Ghaderi A. Downregulation of MMP2 and Bcl-2 in Adipose Derived Stem Cells (ASCs) following Transfection with IP-10 Gene [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2014, 6(1):27-37.
- [12] Sunay O, Can G, Cakir Z, *et al.* Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis [J]. *Cytherapy*, 2013, 15(6):690-702.
- [13] Fu BC, Gao JH, Lu F, *et al.* Experimental study of the effect of adipose stromal vascular fraction cells on the survival rate of fat transplantation [J]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2010, 26(4):289-94.
- [14] Pak J, Lee JH, Lee SH. Regenerative repair of damaged meniscus with autologous adipose tissue-derived stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:436029.
- [15] Bhang SH, Park J, Yang HS, *et al.* Platelet-rich plasma enhances the dermal regeneration efficacy of human adipose-derived stromal cells administered to skin wounds [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(3):437-445.
- [16] Jiang M, Wang X, Liu H, *et al.* Bone formation in adipose-derived stem cells isolated from elderly patients with osteoporosis: a preliminary study [J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(1):97-105.
- [17] Hoke NN, Salloum FN, Kass DA, *et al.* Preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibition improves therapeutic efficacy of adipose-derived stem cells following myocardial infarction in mice [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2):326-335.
- [18] Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, *et al.* Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficolin [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(1):118-120.
- [19] Yamamoto T, Ricordi C, Messinger S, *et al.* Deterioration and variability of highly purified collagenase blends used in clinical islet isolation [J]. *Transplantation*, 2007, 84(8):997-1002.
- [20] Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method [J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(1):54-58.
- [21] Griesche N, Luttmann W, Luttmann A, *et al.* A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of

- adipose-derived stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 192(2):106-115.
- [22] Carvalho PP, Gimble JM, Dias IR, *et al.* Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(6):473-478.
- [23] Güven S, Karagianni M, Schwalbe M, *et al.* Validation of an automated procedure to isolate human adipose tissue-derived cells by using the Sepax® technology [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(8):575-582.
- [24] 胡金灵, 邵世魁, 梁廷波. 脂肪干细胞提取方法的改良[J]. *浙江临床医学*, 2015, 17(2):215-217.
- [25] Ito K, Aoyama T, Fukiage K, *et al.* A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by nonwoven fabric[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(1):81-91.
- [26] Doi K, Kuno S, Kobayashi A, *et al.* Enrichment isolation of adipose-derived stem/stromal cells from the liquid portion of liposuction aspirates with the use of an adherent column [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(3):381-391.
- [27] Shah FS, Wu X, Dietrich M, *et al.* A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(8):979-985.
- [28] 侯晓琳, 郁卫东, 崔梅花, 等. 小鼠脂肪间充质干细胞的分离培养及肠道归巢[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(6):854-860.
- [29] Gierloff M, Petersen L, Oberg HH, *et al.* Adipogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived subpopulations of stromal cells [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2014, 67(10):1427-1435.
- [30] Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1):64-76.
- [31] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells [J]. The international Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-317.
- [32] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers [J]. *Stem Cells* 2006, 24:376-385
- [33] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208:64-76
- [34] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, *et al.* Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16:91-104.
- [35] Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue [J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5:1-8.
- [36] Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(3):256-265.
- [37] Hunt JA, Fok M, Bryan N. Impact of cell purification technique of autologous human adult stem cells on inflammatory reaction [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(31):7626-7631.
- [38] 杜明昌, 刘宪民, 祖启明, 等. 自体脂肪干细胞复合不同初始浓度诱导支架修复猪膝关节软骨缺损的初步观察 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(6):2523-2527
- [39] Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential [J]. *Chang Gung Med J*, 2009, 32(3):264-275.
- [40] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, *et al.* Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols [J]. *Equine Vet J*. 2010, 42(6):519-527.
- [41] Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L, *et al.* GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(4):466-477.