

间充质干细胞分离方法的研究与进展

蔡金宏¹, 林春博², 杨 渊²(¹广西医科大学第一附属医院创伤骨科手外科, 广西壮族自治区南宁市 530021; ²广西骨伤医院, 广西壮族自治区南宁市 530001)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 全骨髓贴壁法虽然操作简单、成本低廉, 获得的间充质干细胞数量相对较多且干细胞特性保存较好, 但是原代获取细胞血液成分多, 需要进一步的纯化。组织消化法能获得与体内特性接近的大量活细胞, 但是受消化酶的选择和消化时间的把握的限制。密度梯度分选法相对分选出干细胞纯度较高, 介质对间充质干细胞无损伤并保持其增殖和分化特性, 是较理想的分离方法。免疫磁珠分选法能特异分离出高纯度的间充质干细胞, 由于设备、抗体等价格昂贵, 不适用于一般的试验和临床研究。

2 文章增加的新信息: ①研究者通过不同方法的改进提高全骨髓贴壁法原代获得间充质干细胞的纯度: a 设计出红细胞裂解法、低渗结合自然沉降法除去原代细胞悬液中的血细胞; b 设计免疫耗竭的方法去除骨髓组织中的血液系及内皮系细胞; c 从其他部位提取间充质干细胞, 避免血液系细胞的干扰。②组织消化法的优化, 目的是简化步骤、减少消化酶对间充质干细胞生物学特性的影响: a 应用半组织消化培养法可获得间充质干细胞; b 非消化液消化法具有省时低耗, 不破坏细胞生存环境等优点, 研究者直接将脂肪组织剪成小片, 以胎牛血清固定及孵化过夜, 以后用含胎牛血清的 DMEM 培养可获得间充质干细胞。③密度梯度法介质的选择 (Percoll、Ficoll) 不同研究者持不同的观点, 经比较后仅在原代细胞贴壁时间、集落数目存在差异, 传代后两者并无差别。研究证实间充质干细胞密度区间为 1.067~1.070 g/mL, 而采用密度为 1.073 g/mL 的 Ficoll 分离出的间充质干细胞在免疫荧光表达实验中较 1.077 g/mL 组更具活力, 成纤维细胞集落形成单位较前者高 1.5 倍, 并在第 4 代后间充质干细胞的产量达到其 1.8 倍。④免疫磁珠法根据间充质干细胞表面特异性抗原而进行高纯度分离, CD133、CD271、CD105 和 CD11b 可作为间充质干细胞分离的表面标记物, 仍需要一些阴性表达标记物 (CD3, CD14, CD19, CD34, CD38, CD66b) 作为辅助条件。⑤近年来的新方法: a 使用高特异性的 DNA 寡核苷酸适配子的间充质干细胞分离; b 采用 BD 真空采血细胞制备管收集间充质干细胞; c 直接铺种结合改良组织块培养法; d 传统方法间的相互结合运用。

3 临床应用的意义: 间充质干细胞具有很强自我更新并能向多种细胞分化的能力, 被认为是组织工程中的种子细胞, 因此临床各领域 (如骨关节疾病、神经退行性疾病、血液病、糖尿病、心血管疾病等) 的细胞治疗具有非常广泛的应用前景。

关键词:

干细胞; 培养; 间充质干细胞; 分选方法; 全骨髓贴壁法; 梯度密度离心法; 组织消化法; 免疫磁珠法

主题词:

间充质干细胞; 细胞培养技术; 细胞分离

摘要

背景: 间充质干细胞作为种子细胞广泛应用于组织工程和临床治疗, 而安全、高效的分离方法是间充质干细胞建系的前提。

目的: 综述近年来间充质干细胞分选方法的研究进展, 比较各方法的优缺点, 为安全、高效分离间充质干细胞提供理论依据。

方法: 第一作者检索 CNKI 数据库 (<http://epub.cnki.net/>) 和 PubMed 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 的相关文献。中文检索词为“间充质干细胞、分离方法”; 英文检索词为“mesenchymal stem cells (MSCs), isolation methods”。查阅 1965 至 2014 年来间充质干细胞分离方法的相关文献, 包括综述、临床研究 and 基础研究, 最终纳入 52 篇文献。

结果与结论: ①全骨髓贴壁法可快速获得大量间充质干细胞, 但需要进一步纯化。②梯度密度离心法选择密度为 1.073 g/mL 的介质在原代能得到相对较纯的间充质干细胞。③组织消化法适用于脂肪、脐带等组织进行消化分离, 选用胶原酶 II 消化效果更佳, 但是均存在操作技术要求高的缺陷。④免疫磁珠法适用于研究表达特定细胞表面标记物的某一个间充质干细胞亚群的生物学特性。⑤各种分离方法相结合也是一种理想选择。⑥对于近年来出现的分离新方法, 由于案例有限, 其可靠性有待进一步研究。

蔡金宏, 林春博, 杨渊. 间充质干细胞分离方法的研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7375-7380.

Isolation methods of mesenchymal stem cells

Cai Jin-hong¹, Lin Chun-bo², Yang Yuan² (¹Department of Hand Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Guangxi Orthopedics Hospital, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

蔡金宏, 男, 1986 年生, 广西壮族自治区北海市人, 在读硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞研究。

通讯作者: 杨渊, 教授, 广西骨伤医院, 广西壮族自治区南宁市 530001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.029

<http://www.crter.org>

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)45-07375-06

稿件接受: 2014-10-13

Cai Jin-hong, Studying for master's degree, Department of Hand Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Yang Yuan, Professor, Guangxi Orthopedics Hospital, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Accepted: 2014-10-13

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells as potential seeded cells have been widely used in tissue engineering and clinic therapy; thus, the precise, safe, effective isolation of mesenchymal stem cells is the particular important premise to build culture system.

OBJECTIVE: To review the methods of isolating mesenchymal stem cells and to compare the merit and demerit of different methods, thereby providing theoretical basis for safe and high-effective isolation of mesenchymal stem cells.

METHODS: A computer-based online research of CNKI and PubMed databases was performed to collect articles, which included reviews, clinical trials and experiments, published between 1965 and 2014 with the key words of "mesenchymal stem cells (MSCs), isolation methods" in Chinese and English. A total of 52 articles were included according inclusion and exclusion criteria

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The whole bone marrow culture method can derive a mass of mesenchymal stem cells, which need to be purified. (2) The density gradient centrifugation method which uses the media with the density of 1.073 g/mL can be used to harvest more purified cells. (3) The tissue digestion method is suitable for digestion and isolation of adipose tissue and umbilical cord tissue. Type II collagenase digestion is better, but they are both limited by a high demand for operative techniques. (4) Immunomagnetic bead separation is appropriate to study the biological characteristics of a kind of subpopulation of mesenchymal stem cells which express special surface markers. (5) The combination method is also an optimal way. (6) Some new methods limited by few dates require further studies.

Subject headings: mesenchymal stem cells; cell culture techniques; cell separation

Cai JH, Lin CB, Yang Y. Isolation methods of mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(45):7375-7380.

0 引言 Introduction

间充质干细胞来源于中胚层,是一种具有自我更新和多向分化潜能的多能细胞。在20世纪70年代Friedenstein等^[1]首先从骨髓中成功分离出间充质干细胞。间充质干细胞具有来源广泛、取材方便、扩增迅速、可自体移植等特点,因此被认为是组织工程中理想的种子细胞并作为临床细胞替代治疗的一种途径应用于研究中。然而有研究表明,组织中存在的间充质干细胞含量很低,因此如何分离获得高纯度的细胞并有效扩增极为重要^[2-3]。随着科研技术的不断改进,研究者提出了不同的间充质干细胞的分离方法^[1, 4-6]。目前常用的间充质干细胞分选方法有:免疫磁珠分选法^[5]、密度梯度分选法^[7]、全骨髓贴壁法^[2]、组织消化法^[8]。本文就常用分选方法近年来一些新的研究进展进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索CNKI数据库(<http://epub.cnki.net/>)和PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)的相关文献。中文检索词为“间充质干细胞、分离方法”;英文检索词为“mesenchymal stem cells (mscs), isolation methods”。查阅近年来间充质干细胞分离方法的相关文献,包括综述、临床研究和基础研究。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: ①所采用的分选方法具有原创性,论点论据可靠的文章。②各种方法之间相互对比的文章。③同一或相似内容选择近期发表或权威期刊发表的文章。

排除标准: 重复或类似的同一研究。

1.3 质量评估 阅读文献的标题和摘要进行初筛,排除与研究目的不符和重复性文章;查阅全文,判断与纳入

标准一致的文章,最后选择52篇符合标准的文献。

2 结果 Results

2.1 全骨髓贴壁法及改良方法 骨髓中包含造血细胞系和非造血细胞系,体外培养的造血细胞多是悬浮生长,而间充质干细胞则易于贴附在塑料培养瓶底部生长^[9]。该方法就是利用间充质干细胞的这一特性,通过多次换液将干细胞从悬浮生长的造血细胞中分离出来。

1970年Friedenstein等^[1]第一次从骨髓中成功分离出类成纤维样集落,通过贴壁法分离的间充质干细胞具有完整的形态并可长期培养扩增,而且成本低廉,因此被广泛应用于干细胞的培养,但从骨髓中得到的原代细胞成分复杂,需通过多次换液纯化细胞,一定程度上会影响间充质干细胞的分化。有文献报道骨髓中间充质干细胞比例小于1:10 000^[2-3],去除骨髓中血液系细胞的污染可提高原代骨髓间充质干细胞的纯度。邓近平等^[10]、张卫东等^[11]采用红细胞裂解法,林春博等^[12]采用低渗结合自然沉降法除去原代细胞悬液中的血细胞,初步纯化间充质干细胞,减少细胞换液次数,避免过于频繁的刺激影响间充质干细胞的特性。也有研究者总结出在培养24 h进行首次换液的间充质干细胞纯度较高^[13]。Phinney等^[14]从免疫学角度出发,设计了免疫耗竭(immunodepletion)这一方法从大鼠骨髓中提取得到的成纤维基质细胞中分离去掉血液系及内皮系细胞,集落形成实验、免疫染色及流式细胞仪均证明这个方法效果明显。免疫耗竭方法为收集鼠骨髓间充质干细胞提供了一种途径,而这些细胞具有和已被证明的间充质干细胞的分子和生物学特性相同。同时,免疫耗竭法不需要长时间的细胞体外贴壁增殖,从而避免了永生细胞系的产生。对于全骨髓贴壁法使用时带入的异种细胞污染,也

有研究者认为可改变取材部位以达到纯化效果, Lindsay等^[15]从嗅黏膜固有层中提取的间充质干细胞与从骨髓中提取的间充质干细胞具有相同的表面分子标记物表达, 可分化为骨及脂肪, 并且黏膜固有层间充质干细胞对于脊髓损伤中髓核形成具有意义, 而骨髓间充质干细胞则未发现。经不同部位取材的间充质干细胞的共性及特性, 尚有待进一步的研究。

全骨髓贴壁法具有操作简单、成本低廉, 获得的间充质干细胞数量相对较多且细胞贴壁时间早, 分化潜能保存完好等优点。但是无论从骨髓还是其他组织所获得的细胞成分均较杂, 需要通过多次换液传代才能达到纯化。在这个过程中部分细胞不可避免会受到刺激而提前分化, 导致微环境的改变而影响干细胞的定向分化。多次换液传代后, 用于消化间充质干细胞的胰酶、EDTA等物质残留于细胞间, 影响细胞的增殖和分化潜能, 甚至导致干细胞特性的消失。

2.2 组织消化法 组织消化法为原代培养常用的方法, 原理是利用刚刚离体的组织和细胞生物学特性未发生很大的变化, 仍然具有二倍体遗传特性。通过消化液将妨碍细胞生长的细胞间质(如基质、纤维等)去除, 使细胞能更好吸收外界营养和排出代谢产物, 短时间内获得大量活细胞。

对于消化酶的选择及消化时间的把握是组织消化法的技术关键。研究表明不同消化酶消化效果不一^[16-17], 胶原酶II对于间充质干细胞的分离较为理想。Lee等^[8]通过胶原酶消化法成功从犬脐带基质中分离出间充质干细胞并且行进一步鉴定其生物学特点证实: 所培养的细胞为贴壁生长、梭型类成纤维样细胞。在长期增殖培养中染色体数目与表达的多能性标记物(如Oct3/4, Nanog, Sox-2, SSEA-4等)一致。该细胞表达间充质干细胞特殊的表面标记物, 包括CD44, CD90, CD105和CD184, 但不包括CD29, CD33, CD34和CD45。更重要的是, 脐带间充质干细胞与中胚层(脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞)和外胚层(神经细胞)具有不同特性, 表明组织消化法在分离提取多能间充质干细胞上对细胞特性表达的影响实际上较小, 具有很好的可行性。而Liu等^[6]则选用半组织消化法从脐带提取间充质干细胞, 他们使用温和消化液消化脐带以便从组织中获得间充质干细胞, 同时将未完全消化的组织放入塑料培养瓶中培养, 组织中的干细胞爬出到瓶底并且增殖。同时, 他们改进消化酶的成分, 加入透明脂酸酶和中性蛋白酶来防止细胞悬液中产生的不必要的凝集伤害。在早期的24 h内观察到贴壁细胞呈类成纤维样, 1周内形成漩涡样单层均匀分布双极纺锤样的细胞集落。通过检测细胞的免疫表型, 鉴定其为间充质干细胞。此外他们还证实干细胞可以调节免疫细胞的活性。在实验中发现间充质干细胞可分泌可溶性因子来发挥其免疫抑制的特性, 如白细胞介素6、转

化生长因子 β 和COX-2。同时证实了与纯化的人类T细胞共同培养72 h后, 脐血间充质干细胞抑制了对促细胞分裂剂治疗有反应的T细胞的增殖。这种方法可快速得到大量的间充质干细胞, 并且整体的实验步骤和耗时均较传统方法简洁。Ghorbani等^[18]则摒弃消化液的使用, 直接将脂肪组织剪成小片, 以胎牛血清固定及孵化过夜, 后使用含胎牛血清的DMEM培养, 数天后可见类成纤维细胞样细胞爬出, 传3代后行免疫表型检测、诱导分化及流式细胞仪鉴定, 提示为所需的多能间充质干细胞。由此可见, 非消化液消化法具有省时低耗, 不破坏细胞生存环境等优点。

组织消化法能短时间从活体上获得大量活细胞, 且细胞特性与体内接近并能反映生长特性, 很适合做药物测试、细胞分化等实验研究。不过其缺点也比较明显: 消化法不但步骤繁琐、易污染, 若操作者对消化时间把握不当, 直接影响原代获得的间充质干细胞的纯度及其生物学特性, 并且破坏细胞结构、干扰细胞增殖及分化, 甚至得到异种的细胞群。另外, 一些消化酶价格昂贵, 不可避免提高了实验成本。

2.3 梯度密度离心法 梯度密度离心法是根据不同颗粒之间密度和直径不同, 它们在溶液中的沉降速度也不同, 在一定的离心力作用下, 颗粒各自以一定的速度沉降, 在密度梯度不同区域上形成区带的原理分离不同密度的细胞。因此在细胞分选前预先在离心管内加入一定的介质形成连续或不连续的密度梯度, 将细胞混悬液置于介质的顶部, 利用重力及离心力的作用分选细胞。

梯度密度离心法研究的重点侧重于介质的选择和介质最佳密度的确定上。目前常用的介质有聚蔗糖(Ficoll)和经过聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒混悬液(Percoll)。1967年Noble等^[19]采用Ficoll分离出白细胞以来, Ficoll就成为多种细胞分选的常用介质。2007年, Koch等^[20]首次从新鲜马脐血中分离出具有分化成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞潜能的间充质样干细胞。Percoll用于细胞分离则是在1978年, Schumacher等^[21]利用Percoll完整快速分离出小鼠睾丸间质细胞。1997年Kadiyala等^[22]用Percoll从犬类的骨髓中分离出间充质干细胞并分析其体内体外的成骨特性。Ficoll与Percoll都为梯度密度离心法常用的分离介质, 两者是否在分离效果上有区别? Chang等^[7]利用Ficoll和Percoll对人类间充质干细胞进行分选并比较其成骨潜能, 结果发现Ficoll法分离出的成核细胞数目及集落形成率均高于Percoll法, Ficoll法的细胞显著高表达CD166(+)/CD34(-), CD90(+)/CD34(-), SH3(+)/CD34(-)和CD105(+)/CD34(-), 但是两组的成骨潜能并无区别, 得到Ficoll更适用于制备人间充质干细胞的结论。同时Bourzac等^[4]也对常用介质Ficoll和Percoll进行了比较, 发现Percoll对于间充质干细胞产量及自我更新潜能最佳, 而Ficoll提取

的原代细胞自我修复能力低,但传代后两者无差异,可推断Percoll用于分离间充质干细胞时可缩短传代时间,进一步猜测不同介质分离对于体外原代细胞的增殖各有不同程度的影响。同时,相同介质的不同密度也会对细胞的培养造成不同的影响,是否不同密度同种介质分离出的间充质干细胞的活性和分化潜能不同? Grisendi等^[23]用两种不同密度的Ficoll分离间充质干细胞,结果显示相对于1.077 g/mL组,1.073 g/mL组分离出的干细胞在免疫荧光表达实验中更具活力,成纤维细胞集落形成单位较前者高1.5倍,并在第4代后间充质干细胞的产量达到其1.8倍。同时,1.073 g/mL组CD90, CD146高表达。但是,两组的分化能力并无差异。因此,不同的介质及介质的不同密度对间充质干细胞的分离具有重要意义。

研究表明梯度密度离心法可有效分选出间充质干细胞并具有成骨分化的潜能。Rosca等^[24]对梯度密度离心后各密度层内的细胞进行分析,发现在1.067-1.070 g/mL的密度区间存在间充质干细胞,占骨髓细胞的11.86%。由此可以推断,使用适合密度的介质进行分离可获得纯度较高的间充质干细胞。

2.4 免疫磁珠分选法 免疫磁珠分离系统的主要组成成分为磁珠、分选柱和分选器。免疫磁珠分选法分选细胞的原理是基于细胞表面抗原能与连接在磁珠上的特异性单抗结合。当单细胞悬液在通过特定的磁场时,抗体与磁珠相连的细胞被吸附于磁式分选柱内,而无该种表面抗原的细胞则不在磁场中停留,从而分离细胞^[25-26]。根据其免疫学原理,免疫磁珠分离法分为正选法和负选法^[27-28]。

早在1983年, Poynton等^[29]利用免疫磁珠法从骨髓中分离出马蹄莲病毒(CALLA)的阳性细胞。1990年Miltenyi等建立磁激活分选法(MACS)并证实运用该方法不影响分离出细胞的生存和增殖能力后,免疫磁珠分离法广泛应用于免疫吸附、免疫检测、细胞分离和培养等领域^[30-33]。采用负选法分离的细胞不受磁珠的干扰,因此较为常见。2002年Lodie等^[34]通过免疫磁珠标记CD105(+)/CD45(-)GlyA(-)的方法分离成人骨髓源干细胞,原代培养时细胞增殖缓慢,10-14 d后细胞贴壁并以相似的比例增殖,随后进行细胞表面标记分析表明超过95%的细胞表达假定的间充质干细胞标记CD105(+),而表达CD34、CD31和CD133均为阴性,它们分别是造血干细胞、内皮干细胞和神经干细胞的标记物。2010年Liu等^[35]利用免疫磁珠法标记阴性CD271和CD133从脐血中成功分离出间充质干细胞。Rada等^[36]在2011年使用免疫磁珠法在涂有不同抗体(CD29, CD44, CD49d, CD73, CD90, CD105, Stro-1, p75)的人类脂肪源干细胞细胞中分离出差异常干细胞亚群并通过RT-PCR分析间充质干细胞的表面标记物(CD44,

CD73, Stro-1, CD105, CD90)、软骨标记物(Sox 9, Collagen II)和成骨系标记物(骨桥蛋白, 骨钙蛋白)。结果表明,脂肪源干细胞由几个亚群组成,每个亚群表达的标记物和分化的潜能都不同。

免疫磁珠分离法具有高度特异性细胞分选的特点,将细胞生物学、免疫学和磁力学等知识结合于一体,其高度特异性来自抗体对抗原的特异性识别^[37]。上述的研究都表明免疫磁珠标记法同时使用多种阳性及阴性抗体标记筛选,对分选间充质干细胞具有可行性及可靠性,而相关免疫特异性单克隆抗体的选择和磁珠的大小(磁性)是该技术的关键^[28]。在明确细胞表面相关免疫特异性单克隆抗体的前提下,免疫磁珠法具有特异性分离出高纯度目的细胞的优点,因此在牙周膜干细胞^[38]、神经干细胞^[39]、乳腺干细胞^[37]、人脑胶质瘤干细胞中广泛应用^[40]。FACS组织培养瓶铺展贴壁(Collector培养瓶)、亲和吸附柱(CEPRATE)、MACS为目前常用的免疫磁珠分选法,都存在技术要求高、实验设备昂贵、分离出的细胞易于污染等不足^[41]。对于间充质干细胞的特异性表面标记物,目前有报道用CD133、CD271、CD105和CD11b作为间充质干细胞分离的表面标记物^[42-44],仍需要一些阴性表达标记物(CD3, CD14, CD19, CD34, CD38, CD66b)作为辅助条件。若只用单一特异性标记物原则会造成其他间充质干细胞亚群的丢失,若同时使用多种特异性标记物则显著提高了试验成本。

2.5 其他方法 近年来,除了传统的间充质干细胞分离法,尚有些寻求突破的方法出现。

2.5.1 使用高特异性的DNA寡核苷酸适配子的间充质干细胞分离 Guo等^[45]根据间充质干细胞缺乏表面特殊标记物的特点,使用高特异性的DNA寡核苷酸适配子从猪骨髓细胞液中把间充质干细胞抽取分离。该方法具有以下优点:①相对于传统方法更为快速、有效,且分离出的细胞更原始,具有较强的向成骨和成脂的分化能力。②较贴壁黏附法,既避免了原代获取的间充质干细胞成分纯度低的问题,又具有培养周期短的效果。③较免疫筛选法,可以避免大量不符合筛选规则的间充质干细胞的丢失。因为据不同的文献记载^[46-47],不同的分离筛选及培养环境,会产生不同亚群的间充质干细胞,这些间充质干细胞都具有成骨成脂的分化潜能,但是表面标记物存在细微的差别,如CD90的缺失^[46], CD45的缺失^[47],以及DNA寡核苷酸适配子法分离出的有CD29上调的趋势等。这些不同亚群的间充质干细胞在使用特定的表面分子标记物进行免疫筛选的同时,势必丢失大量的不符合筛选规则的间充质干细胞,而DNA适配子则可以避免这种免疫法难以避免的丢失,但是猪等哺乳动物蛋白文库的缺乏为本法最大的缺点。

2.5.2 采用BD真空采血细胞制备管收集间充质干细胞 Pierini等^[48]收集了两组骨髓样本,分别用传统的

Ficoll-Paque梯度密度法及BD真空采血细胞制备管进行分离, 分离出的单核细胞数目两组无明显差异, 两组的间充质干细胞的细胞表型, 生存、分化能力等均无明显区别, 但是其中成纤维细胞集落生成单位实验指出, 细胞制备管组所收集的间充干细胞是另一组的1.8倍, 表明细胞制备管同样适用于骨髓间充干细胞的分离。

2.5.3 多种方法相结合获得纯度较高间充质干细胞 Xing等^[49]则使用了直接铺种结合改良组织块培养法, 简单而高效的从人骨髓中提取出了间充质干细胞, 并且通过了表面标记物及分化诱导的相关鉴定。另外传统方法间的联合应用^[50-51], 取长补短, 同样能分选出纯度较高的间充质干细胞。这些方法为间充质干细胞的分离提供了新的方向。

3 小结 Conclusions

如何获得高纯度的间充质干细胞一直是国内外学者的研究重点, 间充质干细胞的分选方法多种多样, 各有优缺点。全骨髓贴壁法虽然操作简单、成本低廉, 获得的间充质干细胞数量相对较多且干细胞特性保存较好, 但是原代获取细胞血液成分多, 需要进一步的纯化。组织消化法能获得与体内特性接近的大量活细胞, 但是受消化酶的选择和消化时间把握的限制。密度梯度分选法相对分选出干细胞纯度较高, 介质对间充质干细胞无损伤并保持其增殖和分化特性, 是较理想的分离方法。免疫磁珠分选法能特异分离出高纯度的间充质干细胞, 由于设备、抗体等价格昂贵, 不适用于一般的试验和临床研究。

近年来研究者不断改进间充质干细胞的分选方法, 并对不同的方法进行对比, 以达到快速、有效的分选目的。杨芬等^[52]对全骨髓贴壁法与Percoll分离法对比, 证实全骨髓贴壁法贴壁、传代时间较Percoll分离法短, 虽然原代细胞形态不如Percoll分离法均一, 但二三代以后纯度明显增高, 且相关鉴定表面两者并无差别, 认为全骨髓贴壁法相对于Percoll分离法, 即简单快捷又能有效获得间充质干细胞。

综上所述, 得出结论: ①全骨髓贴壁法可快速获得大量间充质干细胞, 但需要进一步纯化。②梯度密度离心法简易高效, 选择密度为1.073 g/mL的介质在原代可能得到相对较纯的间充质干细胞。③消化法适用于脂肪、脐带等组织进行消化分离, 选用胶原酶II消化效果更佳, 但是均存在操作要求高的缺陷。④免疫磁珠法适用于研究表达特定细胞表面标记物的某一个间充质干细胞亚群的生物学特性。⑤各种分离方法相结合也是一种理想选择。⑥对于近年来出现的分离新方法, 由于案例有限, 其可靠性有待进一步研究。因此, 具体分离法的选择应根据不同的实验目的及实验条件进行。

作者贡献: 构思并设计本综述为第一作者, 资料收集为第

一作者, 分析并解析数据为第一作者。第一作者成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 免疫耗竭-在艾滋病感染中, 艾滋病毒可以分泌一种蛋白, 可以黏附在正常 CD4 细胞上, 让机体的吞噬细胞去吞噬, 造成正常的 CD4 细胞减少, 而骨髓中的造血干细胞可以继续分化出 CD4 细胞, 补充血液和其他组织中的 CD4 细胞, 但是这个分化能力不是无限的, 最终会枯竭。当机体所有的能分化 CD4 细胞的干细胞都消耗完了, 血液和其他组织中的 CD4 细胞会很快下降, 机体失去抵抗力, 就到了免疫耗竭的状态, 一旦有任何感染, 都可以致命。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Friedenstejn AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
- [2] Friedenstejn A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation.* 1971; 12(2):99-108.
- [3] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980; 56(2):289-301.
- [4] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* 2010;42(6):519-527.
- [5] Fong CY, Peh GS, Gauthaman K, et al. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev.* 2009;5(1):72-80.
- [6] Liu L, Zhao X, Li P, et al. A novel way to isolate MSCs from umbilical cords. *Eur J Immunol.* 2012;42(8):2190-2193.
- [7] 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. *Chang Gung Med J.* 2009;32(3):264-275.
- [8] Lee KS, Nah JJ, Lee BC, et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. *Res Vet Sci.* 2013;94(1):144-151.
- [9] Han YF, Tao R, Sun TJ, et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology.* 2013;65(5):819-827.
- [10] 邓近平, 戴钟铨, 刘收, 等. 红细胞裂解法分离及培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(3): 579-582.
- [11] 张卫东, 章方彪, 史宏灿, 等. 红细胞裂解液体外分离培养兔骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(49): 8468-8473.
- [12] 林春博, 杨渊, 陈维平. 低渗结合自然沉降法分离兔骨髓间充质干细胞及其鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(1): 12-16.

- [13] 杨辉,蔡光先,刘柏炎,等.首次换液时间对贴壁法培养骨髓间充质干细胞纯度及增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(20): 3868-3871.
- [14] Phinney DG.Isolation of mesenchymal stem cells from murine bone marrow by immunodepletion.Methods Mol Biol. 2008; 449:171-186.
- [15] Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC,et al.Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro.Glia. 2013;61(3): 368-382.
- [16] 陆琰,陈丽,张涓.人胎盘间充质干细胞4种消化分离方法的效果比较[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(6): 1017-1020.
- [17] 肖盼,陈剑,王彦平,等.不同消化分离方法分离人羊膜间充质干细胞效果比较[J].中国病理生理杂志,2010,26(5): 1033-1037.
- [18] Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M.Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method.Tissue Cell. 2014;46(1):54-58.
- [19] Noble PB, Cutts JH.Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient.Can Vet J. 1967;8(5):110-111.
- [20] Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, et al.Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. BMC Biotechnol. 2007;7:26.
- [21] Schumacher M, Schäfer G, Holstein AF,et al.Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity.FEBS Lett. 1978;91(2):333-338.
- [22] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA,et al.Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro.Cell Transplant. 1997;6(2):125-134.
- [23] Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L,et al.GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion.Cytotherapy. 2010;12(4): 466-477.
- [24] Rosca AM, Burlacu A.Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient.Biotechnol Appl Biochem. 2010;55(4):199-208.
- [25] de Wynter EA, Coutinho LH, Pei X,et al.Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems.Stem Cells. 1995;13(5):524-532.
- [26] Nishi H, Nishimura S, Higashiura M,et al.A new method for histamine release from purified peripheral blood basophils using monoclonal antibody-coated magnetic beads.J Immunol Methods. 2000;240(1-2):39-46.
- [27] 徐鹏,舒畅,赵子义,等.免疫磁珠法分离纯化骨髓间充质干细胞及向神经细胞定向分化[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(20): 3872-3875.
- [28] 韩圣,夏照帆,韦多,等.应用免疫磁珠负选法分离与纯化小鼠骨髓间充质干细胞[J].中国临床康复,2006,10(41): 28-30.
- [29] Poynton CH, Dicke KA, Culbert S,et al.Immunomagnetic removal of CALLA positive cells from human bone marrow. Lancet. 1983;1(8323):524.
- [30] 牛微,杨墨,尚小云,等.免疫磁珠法分离人外周血CD4+CD25+调节性T细胞[J].免疫学杂志,2007,23(4):449-451,455.
- [31] 舒赛男,魏来,方峰,等.免疫磁珠分选系统在分离大鼠骨髓干细胞群中的应用[J].标记免疫分析与临床, 2006,13(1): 35-37.
- [32] 杨宁,王文秀,赫文,等.免疫磁珠技术检测胃癌患者腹腔微小转移的研究[J].哈尔滨医科大学学报, 2006,40(6): 486-488.
- [33] 张宏伟,郑玉梅.免疫磁珠性质及其应用[J].国外医学:免疫学分册,2000,23(1):7-10.
- [34] Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ,et al.Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction.Tissue Eng. 2002;8(5):739-751.
- [35] Liu QH, Ge J, Liu KY.Are CD133 and CD271 useful in positive selection to enrich umbilical cord blood mesenchymal stem cells.Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2010;18(5): 1286-1291.
- [36] Rada T, Reis RL, Gomes ME.Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. Stem Cell Rev. 2011;7(1):64-76.
- [37] 张科伟,刘国津,范志民,等.乳腺干细胞的体外培养及免疫磁珠法分离[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(8):1497-1500.
- [38] 高秦,刘宏伟,金岩.免疫磁珠法分离纯化人牙周膜干细胞[J].临床口腔医学杂志,2006,22(9):520-522.
- [39] 高国一,卢亦成,江基尧,等.免疫磁珠法分选胚胎大鼠脑神经干细胞的初步研究[J].第二军医大学学报,2000,21(11):1092-1094.
- [40] 武汉,魏宇佳,赵洪洋,等.免疫磁珠法分离、培养人脑胶质瘤干细胞[J].中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(5):426-430.
- [41] 杨定华.免疫磁珠法分离提纯骨髓造血干细胞方法的建立[J].广西医科大学学报,2004,21(4):478-480.
- [42] Conconi MT, Burra P, Di Liddo R,et al.CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential.Int J Mol Med. 2006;18(6):1089-1096.
- [43] Tondreau T, Meuleman N, Delforge A,et al.Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity.Stem Cells. 2005;23(8):1105-1112.
- [44] Battula VL, Trembl S, Bareiss PM,et al.Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. Haematologica. 2009;94(2):173-184.
- [45] Guo KT, SchAfer R, Paul A,et al.A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. Stem Cells. 2006;24(10):2220-2231.
- [46] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM,et al.Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(7): 3213-3218.
- [47] Pittenger MF, Martin BJ.Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.Circ Res. 2004;95(1):9-20.
- [48] Pierini M, Dozza B, Lucarelli E, et al.Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. Cytotherapy. 2012;14(6):686-693.
- [49] Xing W, Pang AM, Yao JF,et al.Efficient isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow by direct plating method combined with modified primary explant culture.Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2013;21(2): 451-454.
- [50] 曾瑞霞,单伟,房艳,等.密度梯度离心法结合贴壁法体外分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J].解剖科学进展, 2012,18(5):438-441.
- [51] 王英慧,郑瑞,陈莉.密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J].中国组织工程研究, 2014,18(28): 4463-4468.
- [52] 杨芬,杨乃龙.两种体外分离成人骨髓间充质干细胞方法的比较[J].中国组织工程研究与临床康复,200,12(3):473-476.