

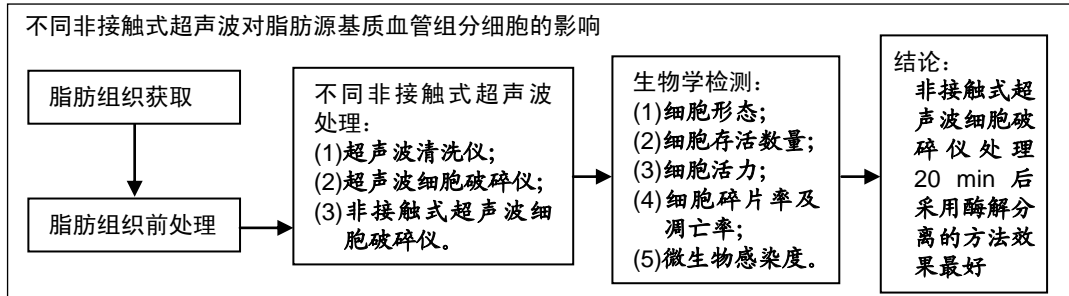
不同非接触式超声波处理获得脂肪源基质血管组分细胞方法的比较

魏嘉田¹, 卢沛伶¹, 黄婧¹, 柳雪¹, 蔡海明¹, 巫国辉², 张玲华¹, 聂云飞² (¹广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 华南农业大学生命科学院, 广东省广州市 510642; ²广州中家医家庭医生整形美容医院, 广东省广州市 510011)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1824

ORCID: 0000-0003-1692-6038(张玲华)

文章快速阅读:



魏嘉田, 男, 1999 年生, 广西壮族自治区贺州市人, 汉族, 就读于华南农业大学生命科学院, 主要从事免疫衰老方向研究。

通讯作者: 聂云飞, 医学硕士, 医师, 广州中家医家庭医生整形美容医院, 广东省广州市 510011

并列通讯作者: 张玲华, 博士, 教授, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 华南农业大学生命科学院, 广东省广州市 510642

文献标识码: B
稿件接受: 2019-06-10



Wei Jiatian, Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Corresponding author: Nie Yunfei, Master, Physician, Plastic Surgery Hospital of Chinese Family Physician, Guangzhou 510011, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhang Linghua, MD, Professor, Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

文题释义:

脂肪源基质血管组分: 是指源于脂肪组织的血管(或涉及携带血液的脉管)成分的细胞组分, 是脂肪组织去除成熟脂肪细胞后剩余的多种细胞及基质成分的组合, 主要包含脂肪来源干细胞、造血干细胞、内皮祖细胞、巨噬细胞等。

非接触式超声波: 非接触式超声波法具有安全、便捷、无额外添加物等特质, 可用于批量处理脂肪移植材料, 同时非接触式超声波破碎无需接触材料, 可以有效减少污染风险, 而且可以实现自动化, 无需人力进行操控, 显著减少人为误差, 故非接触式超声波破碎法制备生物材料更加快速、有效, 在干细胞疾病治疗领域具有广阔的应用前景。

摘要

背景: 探索能够高效、稳定获取基质血管组分细胞的方法对于临床应用有非常重要的价值。目前分离基质血管组分的方法主要包括酶解法、推注破碎法、接触式超声波破碎法等, 存在安全性和细胞存活率低、材料污染等不足, 而非接触式超声波破碎法则能很好的解决这个问题。

目的: 寻找一种最优的非接触式超声波处理获得脂肪源基质血管组分细胞的方法。

方法: 实验所用人体脂肪组织(皮下脂肪)由广州中家医家庭医生整形美容医院提供, 体检无其他基础疾病, 取材前均获知情同意并签署知情同意书。以 3 种不同的超声波仪器(超声波清洗仪功率约为 800 W、超声波细胞破碎仪功率约为 1 000 W、非接触式超声波细胞破碎仪功率约为 1 200 W)对脂肪材料进行非接触式超声处理 15、20、25 min, 以接触式超声波细胞破碎法为对照, 功率为 100 W, 超声处理 16 s, 分别检测基质血管组分细胞大小、存活数量、细胞活力、细胞碎片率和微生物感染度。该研究实施符合广州中家医家庭医生整形美容医院的相关伦理要求。

结果与结论: ①3 种方法所获得的基质血管组分细胞活性均高于接触式超声波破碎法($P < 0.05$); ②3 种方法所获得的基质血管组分细胞污染度均低于接触式超声波破碎法; ③3 种方法获得的基质血管组分细胞大小差异无显著性意义($P > 0.05$); ④3 种方法所获得的基质血管组分细胞碎片均少于接触式超声波破碎法($P < 0.05$), 其中非接触式超声波细胞破碎仪处理 20 min 后采用酶解方法获取基质血管组分细胞的效果最好。

关键词:

脂肪组织; 基质血管组分; 非接触式超声波; 纯物理破碎; 细胞活力

中图分类号: R494.2; R329.2; R318

基金资助:

国家级大学生创新创业训练计划(201810564021), 项目负责人: 卢沛伶; 广东省自然科学基金(2018A030313625), 项目负责人: 张玲华

Comparison of different non-contact ultrasound methods for obtaining adipose-derived stromal vascular fraction cells

Wei Jiatian¹, Lu Peiling¹, Huang Jing¹, Liu Xue¹, Cai Haiming¹, Wu Guohui², Zhang Linghua¹, Nie Yunfei² (¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China; ²Plastic Surgery Hospital of Chinese Family Physician, Guangzhou 510011, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It is of great clinical significance to explore methods for efficient and stable access to stromal

vascular component cells. Current methods for separating stromal vascular components mainly include enzymatic hydrolysis, bolus injection method, and contact ultrasonic pulverization method. For contact ultrasonic pulverization, there are many problems to be solved, such as low safety, low cell survival rate, and material contamination. Therefore, non-contact ultrasonic pulverization can solve these problems well.

OBJECTIVE: To find an optimal method for harvesting adipose-derived stromal vascular fraction cells by non-contact ultrasound approach.

METHODS: The human body fat tissue (subcutaneous fat) used was provided by the Plastic Surgery Hospital of Chinese Family Physician. Patients were eligible if they had no other basic diseases in the physical examination. All the patients were informed of study protocol and signed informed consent before sampling. The fat tissues were treated with three different ultrasonic instruments (approximately 800 W for ultrasonic cleaner, 1 000 W for ultrasonic cell crusher, and 1 200 W for non-contact ultrasonic cell crusher) for 15, 20, and 25 minutes. Contact ultrasonic crushing method (100 W, 16 seconds) was used as control. Stromal vascular fraction cell size, number of survived cells, cell viability, cell fragmentation rate and microbial infection were measured. The study was implemented in accordance with the relevant ethical requirements of Plastic Surgery Hospital of Chinese Family Physician.

RESULTS AND CONCLUSION: The viability of stromal vascular fraction cells obtained by the three methods was significantly higher than that by the contact ultrasonic crushing method ($P < 0.05$). The contamination degree of stromal vascular fraction cells obtained by the three methods was significantly lower than that obtained by the contact ultrasonic crushing method ($P < 0.05$). There was no significant difference in the size of stromal vascular fraction cells obtained by the three methods ($P > 0.05$). The cell fragments of stromal vascular fraction cells obtained by the three methods were significantly less than those by contact ultrasonic crushing method ($P < 0.05$). It is preferred to perform 20 minutes treatment by non-contact ultrasonic cell crusher followed by enzymatic separation.

Key words: adipose tissue; stromal vascular component; non-contact ultrasonic; pure physical disruption; cell viability

Funding: the National Students Innovation and Entrepreneurship Training Program, No. 201810564021 (to LPL); the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2018A030313625 (to ZLH)

0 引言 Introduction

短短十几年时间, 干细胞已成为了生命科学领域研究的热点前沿, 1999年和2000年, 《Science》杂志连续2年将干细胞和人类基因组计划列为当年的10大科学突破之首。间充质干细胞来源于发育早期的中胚层, 属于多能干细胞^[1-2], 因其具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。应用间充质干细胞治疗疾病不会出现排斥反应, 而且广泛存在于人体各器官和组织中^[3]。

脂肪组织经非接触式超声波处理离心后获得的细胞沉淀即基质血管组分, 已有报道从人类乳房和内脏脂肪组织中得到的基质血管组分含有内皮细胞、非特征性的基质细胞、血液细胞和组织型巨噬细胞^[4-5], 其中有核细胞包括37%白细胞(CD45⁺)、35%脂肪干细胞(CD31⁺CD34⁺CD45⁺), 2001年, Zuk等^[6]首次报道脂肪组织中存在多功能干细胞, 从抽脂手术废弃的脂肪组织中分离出脂肪源干细胞^[6], 因其与骨髓间充质干细胞形态相似, Zuk等将其命名为脂肪源性干细胞。人、兔、鼠等不同物种的脂肪组织均有发现脂肪干细胞, 具有较强增强能力^[7-8], 而且可以促进细胞再生^[9-12]。

目前分离基质血管组分的方法主要包括酶解法、推注破碎法等^[13-14]。酶解法在富集过程中加入了外源性消化酶, 存在安全性问题, 且需要在特定实验条件下进行, 在临床方面并无很大的利用价值^[15]。因此, 研究人员已经开发了各种非酶方法来分离基质血管组分, 但涉及强烈的涡旋和离心^[16], 导致活细胞比例低、细胞凋亡率高、细胞碎片高, 从而导致炎症反应比较明显。接触式超声波细胞破碎是利用超声波在液体中产生空化作用, 利用空化核的力量将其破碎^[17], 避免了上述不足之处, 但因超声时需将超声探头伸入组织中处理, 难以避免材料污染问题。非接触式超声波法具有安全、便捷、无额外添加物等特质, 可用于批量处理脂肪移植材料^[18-21], 同时非接触式超声波破碎无需接触材料, 可以有效减少污染风险, 而且可以实现自动化,

无需人力进行操控, 显著减少人为误差, 故非接触式超声波破碎法制备生物材料更加快速、有效, 在干细胞疾病治疗领域具有广阔的应用前景^[22-25]。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年6月至2018年12月在华南农业大学生命科学学院广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 脂肪组织 实验所用人体脂肪组织(皮下脂肪)由广州中家医家庭医生整形美容医院提供, 体检无其他基础疾病, 取材前均获知情同意并签署知情同意书, 均为脂肪抽吸术中取出的脂肪组织。

1.3.2 实验试剂、仪器 0.4%锥虫蓝、乳酸脱氢酶细胞活力检测试剂盒、DMEM(IBL公司); 细胞计数器(MARIENFELD公司); 超声波清洗机、超声波细胞破碎仪、非限制式超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 光学显微镜(OLYMPUS公司); 流式细胞仪(BD公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 基质血管组分细胞的获取 实验分别用超声波清洗机(额定功率800 W, 频率40 kHz)、超声波细胞破碎仪(功率0-1 200 W可调, 频率20 kHz)、非接触式超声波细胞破碎仪(额定功率1 200 W, 频率20 kHz)来实现非接触式超声波破碎, 共分为9个实验组, 采用3种不同的超声波仪器, 每种超声波仪器处理时间分别为15, 20, 25 min, 即为9组(3×3), 阴性对照为未经过任何处理组, 阳性对照为经过接触式超声波处理组, 每组3个重复。

1.4.2 超声波清洗机破碎 将脂肪抽吸术抽取的脂肪组织放入离心机, 2 000 r/min离心1 min, 离心后脂肪组织会出现分层, 最下层为血水, 将血水推出, 将剩余组织过筛(一层筛网, 筛孔尺寸: 0.425 mm, 标准目数: 40目), 过完筛之后再次离心2 000 r/min离心1 min, 离心后将上层液体

油吸出, 剩余组织放入2 mL离心管中, 一共9管, 每管1 500 μL , 将9个离心管随机平均分为3组, 每组分别超声处理15, 20, 25 min, 然后将离心管用硬物压在超声波清洗仪的镇子上, 清洗仪液面高度20 cm, 清洗仪内介质为冰水, 清洗仪功率约为800 W, 超声处理之后2 000 r/min离心5 min(离心后分3层, 上层为液体油脂, 中间为基质血管组分胶, 下层为少量未推完全的血水及血细胞沉淀), 弃掉上层油脂。

1.4.3 超声波细胞破碎机破碎 脂肪组织前处理 请见1.4.2, 将离心管固定在装有水的底部, 用探头垂直对准离心管处, 留约1 mm空隙进行超声, 功率为1 000 W, 超声10 s停止5 s, 烧杯容量为1 L, 液面高度大约10 cm, 且烧杯内为冰水, 超声处理2 000 r/min离心5 min(离心后分3层, 上层为液体油脂, 中间为基质血管组分胶, 下层为少量未推完全的血水及血细胞沉淀), 弃掉上层油脂。

1.4.4 非接触式超声波细胞破碎机破碎 脂肪组织前处理 请见1.4.2, 将离心管放入非接触式超声波清洗仪中进行超声, 功率为1 200 W, 超声30 s暂停30 s, 冷凝水温度为4 $^{\circ}\text{C}$, 液面完全浸没离心管, 超声处理2 000 r/min离心5 min(离心后分3层, 上层为液体油脂, 中间为基质血管组分胶, 下层为少量未推完全的血水及血细胞沉淀), 弃掉上层油脂。

1.4.5 接触式超声波细胞破碎法 脂肪组织前处理 请见1.4.2, 将超声波探头伸入装有脂肪材料的离心管中在冰浴条件下进行超声, 功率为120 W, 超声4 s暂停4 s, 共超声处理16 s, 超声处理后2 000 r/min离心5 min(离心后分3层, 上层为液体油脂, 中间为基质血管组分胶, 下层为少量未推完全的血水及血细胞沉淀), 弃掉上层油脂。

1.4.6 基质血管组分细胞的分离 ①离心分离: 经超声波处理完且2 000 r/min离心5 min后, 弃上层油脂, 取中间基质血管组分胶500 μL 于新离心管中, 加入等体积的DMEM溶液, 上下颠倒混匀, 2 000 r/min离心5 min(离心后分2层, 上层为油脂层, 下层为DMEM溶液以及细胞沉淀), 见图1, 弃上层油脂, 用移液枪小心吸取下层DMEM溶液(注意不要吸到细胞沉淀, 尽可能把DMEM都吸走), 吸完后加入500 μL DMEM溶液重悬细胞沉淀; ②酶解分离: 将吸脂手术抽取的脂肪组织放入离心机, 2 000 r/min离心1 min后脂肪组织出现分层, 将底层血水推出, 剩余组织过筛(一层筛网, 筛孔尺寸: 0.425 mm, 标准目数: 40目)。将油脂混合物转移到离心管中, 加入等体积的0.4% I型胶原酶, 振荡混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱消化60 min; 加入等体积的含体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM终止消化, 1 000 r/min离心10 min(离心后分3层, 上层油脂或部分未消化完全的脂肪组织, 中间为细胞培养液, 下层为脂肪干细胞或红细胞等混合细胞沉淀), 见图2。弃上层和中层, 在细胞沉淀中加入完全培养液(含体积分数为10%胎牛血清、双抗的DMEM/F12培养液)重悬细胞沉淀, 过200目的细胞筛, 收集滤液。

1.5 主要观察指标

1.5.1 形态学观察 将原始脂肪直接涂布在载玻片上用



图注: 上层黄色物质为油脂, 中层为 DMEM 培养液, 下层沉淀为血管组分细胞。

图 1 人基质血管组分细胞沉淀(离心分离法)

Figure 1 Human stromal vascular fraction cell precipitation (centrifugation method)



图注: 上层黄色物质为油脂, 中层为 I 型胶原酶, 下层沉淀为血管组分细胞。

图 2 人基质血管组分细胞沉淀(酶解分离法)

Figure 2 Human stromal vascular fraction cell precipitation (enzymatic separation method)

相差显微镜观察成熟脂肪细胞形态及大小。上述各组非接触式超声波破碎法破碎后将基质血管组分胶直接涂布在载玻片上观察基质血管组分细胞的形态及大小。

1.5.2 存活率检测 取90 μL 稀释细胞加入10 μL 0.4%锥虫蓝, 混匀, 加入细胞计数器, 进行镜下存活率判读。

1.5.3 细胞活力和增殖率 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 按每孔100 μL 接种到96孔板中, 培养过夜后, 按照CCK-8(细胞增殖)和LDH(细胞活力)试剂盒进行检测。

CCK-8实验: 加入10 μL CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 测定吸光度值(450 nm)。

LDH实验: 加入11 μL LDH释放液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 加混合液60 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5 h, 测定吸光度(490 nm)。

1.5.4 细胞碎片及死亡检测 将培养液离心(1 200 r/min离心5 min), 吸弃上清, 加入100 μL PBS重悬细胞, 1 200 r/min离心5 min, 收集 $(1-5) \times 10^5$ 个细胞, 加入500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞, 加入5 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温避光反应5-15 min, 1 200 r/min离心5 min, 用500 μL PBS重新悬浮, 采用流式细胞仪检测细胞碎片率及死亡率。

实验结果按照以下方式处理, 在以FL3-A为纵坐标, FSH为横坐标的对数坐标轴中, 调节坐标轴参数, 使细胞群处于坐标轴中央区域, 按照如下原则进行画门: ①活细胞表现出较大的FS值和较弱的荧光强度; ②坏死的细胞碎片, 由于丢失部分DNA, 具有较小的FS值和较弱的荧光强度; ③凋亡细胞的细胞膜具有通透性, 细胞虽然聚缩变小, 但核保持完整, 所以显示出较小的FS值和较强的荧光强度。

通过计算活细胞占有所有细胞的百分率, 即可得知细胞存活率, 也可以同时计算碎片率。

1.5.5 微生物感染检测 将培养液离心(1 200 r/min离心5 min), 吸弃上清, 用100 μL 无菌生理盐水重悬细胞, 转移到10 mL离心管中并加入 $9.9 \times 10^3 \mu\text{L}$ 无菌水, 取1 000 μL 稀释液涂布平板, 最终通过菌落数计算细菌数^[26]。

1.6 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 所有数据值均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 用于多组间或两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

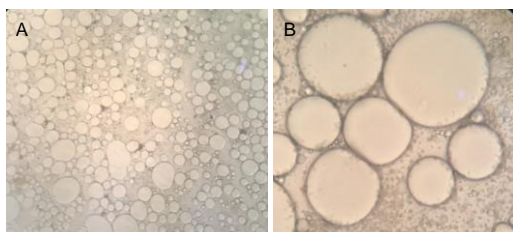
2 结果 Results

2.1 细胞形态学 将原始脂肪组织直接镜检观测, 成熟脂肪细胞呈单个或者成群的存在于人体脂肪组织中, 其体积大, 直径一般为50-150 μm , 大小与人体肥胖程度成正比, 呈现圆球形或者被挤压成多边形, 见图3, 细胞内含有大脂滴, 将非脂类脂质和细胞核挤向边缘。经超声波处理后的基质血管组分细胞略小, 见图4和表1。

表1 人脂肪基质血管组分细胞大小 ($\bar{x}\pm s, n=3, \mu\text{m}$)
Table 1 Human adipose-derived stromal vascular fraction cell size

处理方法	工作时间(min)	15			20			25			
		离心	酶解	离心	酶解	离心	酶解	离心	酶解	离心	酶解
超声波清洗仪	离心	4.97±0.08	5.16±0.01	5.11±0.08							
	酶解	5.00±0.02	5.12±0.03	5.11±0.02							
超声波细胞破碎仪	离心	4.97±0.12	5.07±0.12	5.27±0.12							
	酶解	5.01±0.05	5.10±0.04	5.20±0.09							
非接触式超声波细胞破碎仪	离心	5.11±0.12	5.17±0.10	5.23±0.08							
	酶解	5.10±0.04	5.18±0.12	5.22±0.10							
阴性对照	离心	5.17±0.05									
	酶解	5.16±0.01									
阳性对照	离心	5.11±0.02									
	酶解	5.10±0.02									

表注: 阴性对照是未经任何处理所得出的数据, 阳性对照是接触式超声波细胞破碎法处理 16 s 所得出的数据。



图注: 图中 A 为人体成熟脂肪细胞($\times 10$); B 为人体成熟脂肪细胞($\times 40$)。

图3 人成熟脂肪细胞的形态
Figure 3 Morphology of mature human adipocytes



图4 人脂肪基质血管组分细胞形态($\times 40$)
Figure 4 Morphology of human adipose-derived stromal vascular fraction cells ($\times 40$)

2.2 细胞存活率 超声波处理工作时间越长, 所得到的存活细胞数量越多, 3种非接触式超声波方法所得到的细胞活力均显著高于阴性对照($P < 0.05$), 其中酶解获得的基质血管组分细胞比离心法略多, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 各组基质血管组分细胞存活数量 ($\bar{x}\pm s, n=3, \times 10^5$)
Table 2 Number of survived human adipose-derived stromal vascular fraction cells

处理方法	离心	工作时间(min)		
		15	20	25
超声波清洗仪	离心	45.87±51.61 ^a	58.13±9.43 ^a	67.73±8.78 ^a
	酶解	48.80±14.26 ^a	60.82±8.45 ^a	67.80±4.91 ^a
超声波细胞破碎仪	离心	30.40±12.31 ^a	32.00±14.24 ^a	35.20±19.65 ^a
	酶解	30.80±14.51 ^a	33.52±15.34 ^a	37.80±11.34 ^a
非接触式超声波细胞破碎仪	离心	19.60±4.31 ^a	22.80±11.77 ^a	25.60±5.61 ^a
	酶解	20.70±2.01 ^a	24.80±10.82 ^a	25.80±15.31 ^a
阴性对照	离心	9.60±3.97		
	酶解	10.80±4.31		
阳性对照	离心	40.12±6.86 ^a		
	酶解	42.80±3.35 ^a		

表注: 阴性对照是未经任何处理所得出的数据, 阳性对照是接触式超声波细胞破碎法处理 16 s 所得出的数据, 与阴性对照进行比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 细胞活力和增殖率 细胞活力是脂肪源性干细胞用于临床的一项重要指标, 关系到移植后的有效性, 同时增殖能力是干细胞重要生物特性之一。结果显示, 超声波处理时间越长, 其细胞平均活力越低, 同等条件下, 酶解所获得的细胞活力略高于离心所获得的细胞活力, 见表3。

表3 各组基质血管组分细胞活力 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Cell viability of human adipose-derived stromal vascular fraction cells

处理方法	离心	工作时间(min)		
		15	20	25
超声波清洗仪	离心	0.604±0.010	0.484±0.001 ^a	0.361±0.002 ^a
	酶解	0.625±0.012	0.538±0.010 ^a	0.439±0.007 ^a
超声波细胞破碎仪	离心	0.604±0.009 ^a	0.558±0.004 ^a	0.546±0.002 ^a
	酶解	0.688±0.006	0.655±0.004	0.578±0.012 ^a
非接触式超声波细胞破碎仪	离心	0.587±0.008	0.533±0.001 ^a	0.511±0
	酶解	0.614±0.009	0.635±0.002	0.517±0.03 ^a
阴性对照	离心	0.710±0.006		
	酶解	0.723±0.005		
阳性对照	离心	0.410±0.006 ^a		
	酶解	0.523±0.004 ^a		

表注: 阴性对照是未经任何处理所得出的数据, 阳性对照是接触式超声波细胞破碎法处理 16 s 所得出的数据, 与阴性对照进行比较, ^a $P < 0.05$ 。

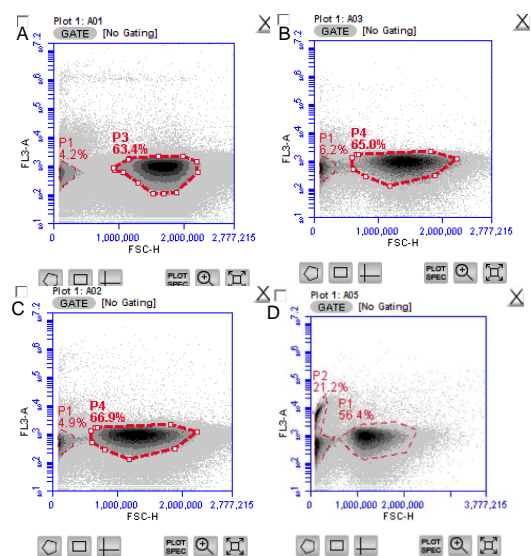
2.4 细胞碎片率和活细胞率 采用流式细胞术对基质血管组分细胞进行检测^[27-28], 见表4, 非接触式超声波处理后的细胞碎片均显著少于接触式超声波破碎法处理的细胞碎片($P < 0.05$), 不同的非接触式超声波处理所得到的基质血管组分细胞碎片比例无明显差别, 见图5。

2.5 细菌的感染度 3种非接触式超声波细胞破碎法处理的基质血管组分细胞稀释液所涂布出来的菌落数远远少于接触式超声波细胞破碎法, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表5, 该结果表明非接触式超声波细胞破碎法处理的基质血管组分细胞污染情况远远低于接触式超声波细胞破碎法处理的基质血管组分细胞。

表 4 各组基质血管组分细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)
Table 4 Apoptotic rate of human adipose-derived stromal vascular fraction cells

处理方法		工作时间(min)		
		15	20	25
超声波清洗仪	离心	4.9±0.8 ^a	6.2±0.8 ^a	7.5±0.8 ^a
	酶解	4.5±0.3 ^a	5.9±0.8 ^a	7.1±0.2 ^a
超声波细胞破碎仪	离心	4.3±0.3 ^a	4.9±0.4 ^a	5.7±0.5 ^a
	酶解	4.1±0.4 ^a	4.9±0.4 ^a	5.2±0.9 ^a
非接触式超声波细胞破碎仪	离心	3.3±0.2 ^a	4.2±1.10 ^a	6.2±0.8 ^a
	酶解	3.1±0.5 ^a	4.1±0.2 ^a	6.0±0.7 ^a
阳性对照	离心	21.2±2.1		
	酶解	20.9±5.2		

表注：阳性对照是接触式超声波细胞破碎法处理 16 s 所得出的数据，与阳性对照进行比较，^aP < 0.05。



图注：图中 A-C 为非接触式超声波破碎法在 20 min 时的数据代表图 (A: 非接触式超声波细胞破碎仪; B: 超声波清洗仪; C: 超声波细胞破碎仪); D 为接触式超声波破碎法。

图 5 流式细胞仪检测细胞碎片率和细胞凋亡率
Figure 5 Cell fragmentation rate and apoptotic rate detected by flow cytometry

表 5 各组基质血管组分细胞稀释液涂布的细菌数($\bar{x}\pm s, n=3, \text{CFU/mL}$)
Table 5 Bacterial count of human adipose-derived stromal vascular fraction cells

处理方法		工作时间(min)		
		15	20	25
超声波清洗仪	离心	0 ^a	0 ^a	0.33±0.38 ^a
	酶解	0 ^a	0 ^a	0 ^a
超声波细胞破碎仪	离心	0 ^a	0.33±0.38 ^a	1 ^a
	酶解	0 ^a	0 ^a	0 ^a
非接触式超声波细胞破碎仪	离心	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	酶解	0 ^a	0 ^a	0.33±0.38 ^a
阳性对照	离心	60.3±4.3		
	酶解	69.3±5.3		
阴性对照	离心	0 ^a		
	酶解	0 ^a		

表注：阴性对照是未经任何处理所得出的数据，阳性对照是接触式超声波细胞破碎法处理 16 s 所得出的数据，与阳性对照进行比较，^aP < 0.05。

3 讨论 Discussion

目前，干细胞主要来源有2种，即胚胎干细胞和成体干细胞^[29]，与胚胎干细胞相比，基质血管组分中的成体干细胞广泛存在于身体的各个组织和器官，同样具有高度可塑性、自我更新和定向分化的潜力^[30-31]，且来源自体，避免了伦理道德问题^[32]，成为了目前组织工程和再生医学中理想的种子细胞，为一些传统药物治疗困难的疾病带来新希望^[33]。

近年来，基质血管组分和脂肪间充质干细胞已经用于心血管系统、呼吸系统、骨骼肌肌肉系统、乳房和软组织系统、肝脏和胃肠系统、泌尿生殖系统、神经系统、免疫系统、内分泌系统等治疗^[34-35]。

目前分离脂肪源性干细胞的方法主要包括酶解法、推注破碎法等。酶解法是利用胶原酶对脂肪组织进行处理，虽得到的基质血管组分细胞数量多、细胞碎片少、细胞活性高，但在富集过程中加入了外源性消化酶，安全性存在问题，且需要在特定实验条件下进行，在临床方面的应用空间不大^[36]；推注破碎法是一种纯物理破碎的方法，虽不加入外源性消化酶，但该方法得到的基质血管组分细胞碎片多，且细胞活性低；接触式超声波细胞破碎法虽是纯物理破碎，但需要将超声探头伸入脂肪组织内，避免不了医学上的污染难题。

根据Schendel^[37]报道的方法，在流动的细胞中以60%功率和14.4 Hz的频率超声空化处理脂肪组织2.5 min，然后用研钵和杵进行低温研磨。该方法提取率低，100 mL材料最后只能分离出1 mL基质血管组分干胶，且该方法步骤繁琐，超声探头与脂肪组织有直接接触，所以难以避免污染的问题。

根据Priglinger等^[38]报道的方法，先使用冲击波进行初破碎，然后用胶原酶处理，虽然最后获得的基质血管组分细胞各项生物学检测指标较好，但因处理过程中加入了外源性物质，所以无法应用在临床上。

非接触式超声波破碎法能避免污染，因为非接触式超声波破碎法只在无污染的离心管里对脂肪组织进行处理，不添加外源物质，移植后定植于局部的干细胞数量较多，作为干细胞疗法有更广阔的临床应用前景。该实验发现非接触式超声波破碎法处理获得脂肪源基质血管组分细胞的活性相对较高，感染率低，细胞碎片率低，其中非接触式超声波细胞破碎仪处理20 min后采用酶解方法获取基质血管组分细胞的效果最好。

与传统分离脂肪源性干细胞的方法(酶解法和推注破碎法)相比，非接触式超声波处理获得脂肪源基质血管组分细胞虽然得到的基质血管组分细胞数量少，但生物活性和安全性更高。

综上所述，利用非接触式超声波破碎法处理获得脂肪源基质血管组分细胞能更好地制备高度浓缩的脂肪来源干细胞和细胞外基质，利用超声波的空化作用，将脂肪组织中大多数成熟脂肪细胞破碎，且该方法为纯物理方法，不添加外源物质，移植后定植于局部的干细胞数量较多，具有广阔的临床应用前景。

作者贡献：实验设计为聂云飞、张玲华、巫国辉，实验实施为魏嘉田、黄

婧、卢沛伶、柳雪, 实验评估为魏嘉田、黄婧、卢沛伶、柳雪、蔡海明, 资料收集为魏嘉田、巫国辉、黄婧、卢沛伶、柳雪、蔡海明。

经费支持: 该文章接受了“国家级大学生创新创业训练计划(201810564021)”“广东省自然科学基金(2018A030313625)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合广州中家医家庭医生整形美容医院的相关伦理要求, 伦理批件: 广州中家医家庭医生整形美容医院 2017[6 号]文件。

知情同意问题: 实验所用脂肪组织(皮下脂肪)由广州中家医家庭医生整形美容医院提供, 均为脂肪抽吸术中取出的脂肪组织, 体检无其他基础疾病, 取材前均获知情同意。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过华南农业大学生命科学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Friedenstain AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968;6(2):230-247.
- [2] Heo JS, Choi Y, Kim HS, et al. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. Int J Mol Med. 2016;37(1): 115-125.
- [3] Xiong BJ, Tan QW, Chen YJ, et al. The Effects of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells on Neovascularization and Fat Graft Survival. Aesthetic Plast Surg. 2018;42(1):1-8.
- [4] Zhang Y, Cai J, Zhou T, et al. Improved Long-Term Volume Retention of Stromal Vascular Fraction Gel Grafting with Enhanced Angiogenesis and Adipogenesis. Plast Reconstr Surg. 2018;141(5):676e-686e.
- [5] Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. i. effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J Biol Chem. 1964;239:375-380.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7(2): 211-228.
- [7] Gaiba S, França LP, França JP, et al. Characterization of human adipose-derived stem cells. Acta Cir Bras. 2012;27(7):471-476.
- [8] Yao Y, Dong Z, Liao Y, et al. Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel: A Novel Adipose Tissue-Derived Injectable for Stem Cell Therapy. Plast Reconstr Surg. 2017;139(4):867-879.
- [9] Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, et al. Studies in fat grafting: Part IV. Adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. Plast Reconstr Surg. 2015;135(4):1045-1055.
- [10] Paik KJ, Zielins ER, Atashroo DA, et al. Studies in Fat Grafting: Part V. Cell-Assisted Lipotransfer to Enhance Fat Graft Retention Is Dose Dependent. Plast Reconstr Surg. 2015;136(1):67-75.
- [11] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circ Res. 2007;100(9):1249-1260.
- [12] Nie C, Yang D, Xu J, et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. Cell Transplant. 2011;20(2):205-216.
- [13] Shah FS, Wu X, Dietrich M, et al. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. Cytotherapy. 2013; 15(8):979-985.
- [14] 刘洋, 潘磊, 金永利. 鼠脂肪干细胞体外培养及软骨分化的研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(86):188.
- [15] Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, et al. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. Plast Reconstr Surg. 2013;132(4): 1017-1026.
- [16] Premaratne GU, Ma LP, Fujita M, et al. Stromal vascular fraction transplantation as an alternative therapy for ischemic heart failure: anti-inflammatory role. J Cardiothorac Surg. 2011;6:43.
- [17] Brennen CE. Cavitation and Bubble Dynamics. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- [18] Zhu J, Wang Y, Li X, et al. Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on Escherichia coli O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (Vaccinium corymbosum) juice. Ultrason Sonochem. 2017;37:251-259.
- [19] Ferrario M, Guerrero S. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of Saccharomyces cerevisiae KE 162 in apple juice. Food Microbiol. 2017;65:83-94.
- [20] Yang YH, Lin SY. Medical ultrasonic treatment and its applications in medicine[C]. 上海:2012全国压电和声波理论及器件技术研讨会论文集, 2012.
- [21] Leonov GV, Khmelev VN, Barsukov RV, et al. Increasing of ultrasonic technologies efficiency and development of ultrasonic devices for industry, medicine and agriculture. International Siberian Workshop on Electron Devices and Materials, 2004.
- [22] Kokhuis T, Skachkov I, Naaijens B, et al. Characterization of microbubble-loaded stem cells for targeted cell therapy. IEEE International Ultrasonics Symposium, 2013:1146-1149.
- [23] Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. Cell Stem Cell. 2013;12(6):689-698.
- [24] Micu R, Chicea AL, Bratu DG, et al. Ultrasound and magnetic resonance imaging in the prenatal diagnosis of open spina bifida. Med Ultrason. 2018;20(2):221-227.
- [25] Cen LP, Ng TK. Stem cell therapy for retinal ganglion cell degeneration. Neural Regen Res. 2018;13(8):1352-1353.
- [26] 龚军辉, 王晶. 稀释涂布平板法计数活菌的方法简介[J]. 生物学教学, 2018, 43(2):70-71.
- [27] Majka SM, Miller HL, Helm KM, et al. Analysis and isolation of adipocytes by flow cytometry. Methods Enzymol. 2014;537:281-296.
- [28] Boumelhem BB, Assinder SJ, Bell-Anderson KS, et al. Flow cytometric single cell analysis reveals heterogeneity between adipose depots. Adipocyte. 2017;6(2):112-123.
- [29] 马晨光, 薛迪. 干细胞研究与应用的伦理问题、伦理规范与伦理实证研究[J]. 中国医学伦理学, 2019, 32(1):26-29.
- [30] Pierantozzi E, Badin M, Vezzani B, et al. Human pericytes isolated from adipose tissue have better differentiation abilities than their mesenchymal stem cell counterparts. Cell Tissue Res. 2015;361(3):769-778.
- [31] Fan J, Sun Z. The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cells. 2016;34(6): 1615-1625.
- [32] 王延光. 人类胚胎干细胞的来源与伦理思考[J]. 医学与哲学, 2002, 23(2):7-10.
- [33] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, et al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(11):1886-1892.
- [34] Roxburgh J, Metcalfe AD, Martin YH. The effect of medium selection on adipose-derived stem cell expansion and differentiation: implications for application in regenerative medicine. Cytotechnology. 2016;68(4):957-967.
- [35] Chen D, Liu S, Ma H, et al. Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. Cancer Cell Int. 2015;15:42.
- [36] Sun M, He Y, Zhou T, et al. Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel Secretes Angiogenic Factors and Enhances Skin Wound Healing in a Murine Model. Biomed Res Int. 2017;2017: 3105780.
- [37] Schendel SA. Autologous Adipose-Derived Tissue Matrix Part I: Biologic Characteristics. Aesthet Surg J. 2017;37(9):1062-1068.
- [38] Priglinger E, Schuh CMAP, Steffenhagen C, et al. Improvement of adipose tissue-derived cells by low-energy extracorporeal shock wave therapy. Cytotherapy. 2017;19(9):1079-1095.