

研究文章

一种非酶促自动闭环过程分离药物间充质基质细胞交付应用

瓦伦蒂娜·科切 (ValentinaCoccè), ¹ 安娜·布里 (Anna Brini), ^{1,2} 奥尔多·布鲁诺·贾南 (Aldo BrunoGianni), ^{1,3} 瓦莱里亚·索尔迪 (Valeria Sordi), ⁴ 安焦拉·贝伦兹 (Angiola Berenzi), ⁵ 朱利奥·亚历山德里 (Giulio Alessandri), ⁶ Carlo Tremolada, ⁷ Silvia Versari, ⁸ Antonio Bosetto, ⁹ 和 Augusto Pessina

¹CRC StaMeTec, 米兰大学生物医学, 外科和牙科科学系, 意大利米兰

²IRCCS Galeazzi 骨科学院, 意大利米兰

³颌面和牙科科, Fondazione IRCCSCàGranda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Commenda 10, 20122

⁴IRCCS 圣拉斐尔科学研究所糖尿病研究所, 意大利米兰

⁵大学研究中心, “环境与职业健康中的预防和保护综合模型” (MISTRAL), 意大利布雷西亚

⁶Fondazione IRCCS 神经学研究所 C. Besta 脑血管病科细胞神经生物学实验室, 意大利米兰

⁷影像研究所, 意大利米兰

⁸Lipogems International Spa, 米兰, 意大利

⁹Hydra srl, 米兰多拉, 摩德纳, 意大利

来信应寄给奥古斯托·佩西纳 (Augusto Pessina); 它是2017年10月12日收到;2017年12月

25日接受;2018年2月20日出版学术编辑: Massimo Petruzzi

版权所有©2018 ValentinaCoccè 等。这是根据知识共享署名许可协议分发的开放获取文章, 该文章允许在适当引用原始作品的情况下, 在任何介质中进行不受限制的使用, 分发和复制。

脂肪组织是间充质基质细胞的良好来源, 需要微创分离程序。为了确保临床使用的可重复性, 有效性和安全性, 这些程序必须符合良好的生产规范。过去几年中, 用于采集和处理人体脂肪组织的技术发展迅速, Lipogems®代表了一种创新的方法, 可在短时间内获得微碎片化的脂肪组织, 而无需进行扩展和/或酶处理。这项研究的目的是通过使用原型 Lipogems 处理器清洗标准化条件下的脂肪抽吸物来评估设备排水袋中间充质基质细胞的存在。我们发现, 除油脂和血液残留物外, 引流袋还包含单个易于扩增的分离细胞, 并具有间充质基质细胞的典型特征, 可以装载紫杉醇用于药物递送应用。我们的发现表明, 有可能用“细胞培养室”代替引流袋, 从而获得一种新的集成设备, 无需进行酶处理, 即可一步步分离和扩增间充质基质细胞, 并且符合良好的生产规范。该系统可用于获得间充质基质细胞, 以用于再生目的和用于药物递送。

1. 介绍

间充质基质细胞 (MSCs) 可以很容易地从几个人体器官和组织中分离出来, 因为它们具有自我更新能力和多能分化能力

特性, 它们是治疗免疫疾病和组织修复的重要工具。特别是, 脂肪沉积的 MSC (ASC) 可通过具有良好生存能力, 分化潜能和旁分泌活性的微创程序大量收获[1-3]。这些

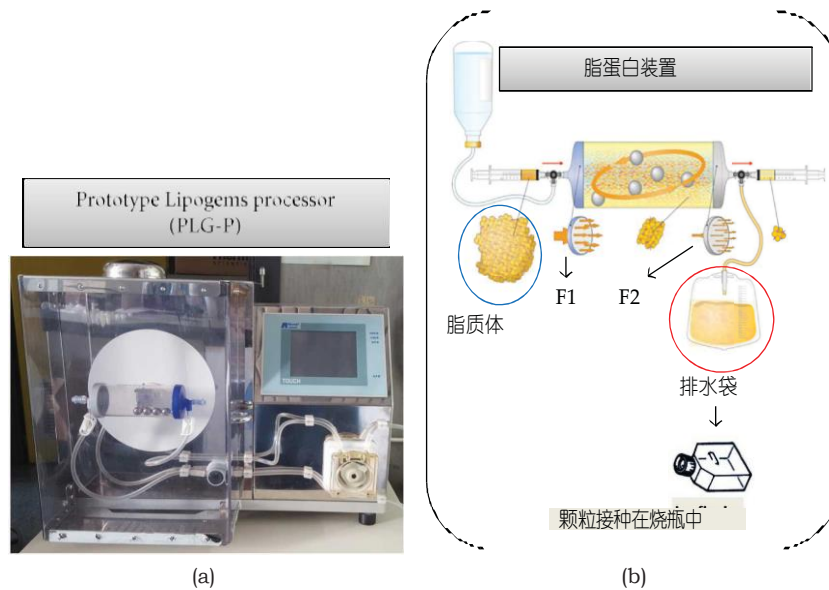


图1: DB-MSC 隔离和扩展。(a) 安装 Lipogems 设备的原型 Lipogems 处理器 (PLG-P)。在这个封闭的系统中, 通过使用轻微的机械力将脂肪抽吸物微片段化, 而无需添加胶原酶或其他酶/添加剂。(b) Lipogems 装置的示意图。通过将脂肪通过第一过滤器 (F1) 推入设备, 使脂肪抽吸物 (蓝色圆圈) 减少簇状。LGP-P 摇晃会将机械力传递到设备中包含的不锈钢大理石上, 从而形成暂时的脂肪乳状液, 该乳状液被缓冲剂清洗。这样可使清洗缓冲液穿过第二个过滤器 (F2), 并与油, 红细胞和间充质基质细胞 (ASC) 一起积聚到排水袋中 (红色圆圈)。将离心后获得的沉淀物接种到 StemMACS 培养基 (Miltenyi Biotec, 美国) 中的 25 cm² 烧瓶中 (有关详细信息, 请参见材料和方法)。

细胞也可以用作药物载体 (如骨髓来源的 MSC 所证明的), 因为当用高剂量的化疗药物紫杉醇 (PTX) 灌注时, 它们能够摄取并释放大量的药物, 从而抑制细胞凋亡。不同肿瘤细胞系的体外增殖[4, 5]。根据欧洲药品管理局 (EMA) 和美国食品药品监督管理局对其生产和使用的要求, 它们被定义为先进治疗药物 (ATMP), 这意味着生产过程的应用应符合良好生产规范 (GMP)。为了提高安全性和可重复性并实施使用 ASC 的许多临床试验, 已经提出了几种基于减少对人体组织产品的操纵的方法, 特别是通过使用非酶疗法[6, 7]。在众多之中, 已经开发出一种创新的封闭无菌系统 (称为 Lipogems), 其设计用于收获, 加工和转移具有巨大的再生潜力和最佳处理特性的精制但未膨胀的脂肪组织。借助这项技术, 无需添加酶或任何其他添加剂, 脂肪组织在完全封闭的液体环境中会微碎, 并从促炎性油脂和血液残留物中洗净[8]。这种封闭且无菌的装置通过两个过滤器减小了脂肪组织簇的尺寸[9]。连接到设备第二个过滤器的排水袋收集含有红细胞和油脂残留物的废液。我们使用原型 Lipogems 处理器 (PLG-P) 在标准化条件下洗涤和处理脂肪抽吸物, 我们发现

这表明, 除油脂和血液残留外, 引流袋还包含单个分离的细胞, 这些细胞易于扩增, 具有 ASC 的典型特征。这些细胞也可以装载紫杉醇, 以提供细胞介导的药物递送工具。

2. 材料和方法

2.1. 道德声明。在签署了无异议的知情同意后, 根据赫尔辛基宣言, 从成年捐赠者那里收集了用于手术组织研究的标本 (否则注定要销毁)。已获米兰大学机构伦理委员会批准使用 (n. 59 / 15, CEUNIMI, 09.1115)。

2.2. 原型脂蛋白处理器 (PLG-P)。原型处理器 (图 1(a)) 配备 Lipogems 装置 (图 1(b)) 能够根据以下主要参数来保证数控运动: 振荡幅度和频率, 俯仰运动和盐水冲洗通量。将 25 ml 脂肪抽吸剂装入 Lipogems 设备中, 并按照标准化程序进行洗涤: 工艺流量 120 ml / min, 振荡频率 2 Hz, 俯仰频率 0.3 Hz, 俯仰角 30° 和俯仰轴 90° 垂直 (出口底部)。在第一个初步实验中, 处理 5 分钟, 并将细胞一步收集到 600ml 盐水中。在第二个实验中, 将收集物分馏并以 1 (120 ml), 2.5 (180 ml) 和 5 分钟 (300 毫升)。

2.3. 从排水袋 (DB-ASC) 隔离 ASC。将每个样品 100 ml 在 2500 x g 下离心 15 分钟。球团用 0.85% 氯化铵处理两次 (5 分钟 +4°C) 部分去除红细胞。然后, 通过离心 (800×g, 10 分钟) 用 PBS 1x 洗涤 3 次后, 将沉淀物铺在装有 5 ml Stem MACS MSC 膨胀培养基 (Miltenyi Biotec, 德国) 的 25cm² 烧瓶 (美国康宁) 上并孵育在 37°C, 5%CO₂ 下。用 1: 2 传代扩增原代培养, 直至传代数 (pn) 6。在 pn 2, 如先前所述计算种群倍增时间 (PDT)。[10]。

通过在 DMEM LG 培养基中用 10% 胎牛血清 (EuroClone) 进行系列稀释 (从 50 细胞/孔至 1 细胞/孔) 进行稀释 (从 50 细胞/孔至 1 细胞/孔), 将 ASC 的克隆形成能力评估为多孔板 (SPL Life Sciences, Korea) 中的集落形成效率 (CFE), 英国)。10 天后, 在显微镜下计数固定并标记有结晶紫 (0.5%, 瑞士 Fluka) 的细胞集落 (由至少 25 个细胞形成的集落), CFE 如下: CFE = 形成的集落的平均值 × 100 / 播种细胞数。

2.4. DB-ASC 的免疫组织化学分析。用胰蛋白酶-EDTA (EuroClone, UK) 分离间充质细胞单层 (pn 2), 并将 1.7×10⁶ 细胞置于 1x PBS 中的 10 ml 玻璃锥形管中, 并以 800 × g 离心。

10 分钟。如先前报道, 对颗粒进行免疫组织化学表征[11]。简而言之, 将离心的沉淀物在室温下用 75% 甲醇, 20% 氯仿和 5% 冰醋酸的溶液处理 20 分钟。将压实的团块放入免疫组织化学盒中, 浸入 10% 甲醛缓冲溶液中, 然后在乙醇中脱水 and 石蜡固定后, 将其切成小段。

储存在 -20°C 下的 4-5 μm 离子。为了表型鉴定, 使用了单克隆或多克隆抗体。

使用链霉亲和素-生物素方法, 以二氨基联苯胺为色原。使用了以下抗体: 抗平滑肌肌动蛋白 (SMA), 抗 CD14, 抗 CD105 和抗神经/神经胶质抗原 2 (NG2) (Santa Cruz Biotechnology, USA); 抗 CD44 (Monosan, 荷兰); 抗血管内皮生长因子 (VEGF), 抗 CD90 (意大利达科); 抗 CD45, 抗 CD146, 抗 CD31 和抗 CD34 (德国 Leica Biosystems)。

通过流式细胞术 (FacsVantage SE, Becton Dickinson, 美国) 评估 CD73 的表达 (CD73-PE Becton Dickinson, 美国)。将细胞在 PBS 中洗涤两次, 稀释至最终浓度为 10⁶ 细胞 / ml, 并在 +4°C 下与深色抗体一起温育 30 分钟。然后将细胞用 PBS 洗涤并通过细胞荧光分析法对每个样品进行 10,000 个事件的采集。使用 CellQuest Pro 软件 (美国 Becton Dickinson) 分析结果。

2.5. DB-ASC 骨/脂肪分化能力。已使用标准化程序评估了 pn 2 处的 DBASC 的成骨和成脂分化[12]。作为阳性对照, 如先前报道, 在我们的实验室中分离并扩增了从人骨髓获得的 MSC (BM-MSC) [5]。作为阴性对照, MSC

培养时不添加补充剂。通过在 1 ml STEM MACS MSC 膨胀培养基 (Miltenyi Biotec, 德国) 中以 50 细胞 / cm² 的密度将细胞铺板在 35 mm Petri (Nunc, 德国) 中进行。温育 72 小时后, 除去细胞培养基, 并用用于细胞分化的特定培养基代替。诱导成骨分化[13], 将细胞在以下条件下在 DMEM 培养基 LG + 20% 胎牛血清中孵育 14 天: 地塞米松 10 nM, 甘油 2-10 mM, 磷酸和抗坏血酸 300 nM (所有试剂, Sigma-Aldrich, 美国)。每 3-4 天用新鲜培养基替换分化培养基。细胞单层用冷甲醇固定在 -20°C 下放置 5 分钟, 然后通过 SIGMA FAST BCIP / NTB 底物评估碱性磷酸酶 (ALP) 的 ALP

(美国 Sigma-Aldrich)。用光学显微镜检测比色反应。通过用茜素红 S (Sigma-Aldrich, 美国) 染色来评估成骨细胞在成熟阶段的存在。为诱导脂肪细胞分化, 在吡哆美辛 200 μM (Alexis Biochemicals, USA), 异丁基甲基黄嘌呤 0.5 mM (AppliChem, 德国), 地塞米松 1 μM, 氢化可的松 1 μM 胰岛素和 DMEM LG + 20% 胎牛血清中培养细胞。10 μg / ml (全部来自美国 Sigma-Aldrich)。孵育 10 天后, 将细胞在室温下用 10% 缓冲福尔马林 (SigmaAldrich, 美国) 固定 30 分钟, 并使用红色亲脂油 Red O (SigmaAldrich, 美国) 评估细胞质中存在的脂肪细胞液泡。

2.6. DB-ASC 吸收和释放紫杉醇的能力。已经通过已经应用于从骨髓, 脂肪组织, 人牙龈组织, 人成纤维细胞以及血细胞获得的 MSC 上的程序, 评估了从 DB-ASC 掺入和释放药物的能力。[4, 5, 10, 14-16]。使用紫杉醇 (PTX) 进行“摄取-释放”方法, 紫杉醇是一种具有抗血管生成活性的抗癌药物。将亚汇合的 ASC 培养物 (15,000 细胞 / cm²) 暴露于溶于培养基中的 2000 ng / ml 的 PTX (Fresenius Kabi, Italy) 中, 孵育 24 小时 (37°C, 5%CO₂) , 将单层细胞用 PBS 洗涤并分离细胞, 通过在 PBS 中离心进行洗涤, 然后在 25 cm² 烧瓶中用新鲜培养基进行亚培养。48 小时后, 收集条件培养基 (CM), 并在体外评估其抗肿瘤活性。来自未处理细胞的 CM 用作阴性对照。

2.7. DB-ASC Secretome 中的细胞因子。收集 DB-ASC 的条件培养基 (来自未处理或已处理的 PTX 细胞), 并使用“基于多重磁珠的 xMAP 技术” (Bio-Plex Human Cytokine 27-Plex Panel 和 Bio-Plex Human Group II) 评估细胞因子含量细胞因子 21 组研究小组 (Bio-Rad Laboratories)。

2.8. 载有 PTX 的 MSC 对 CM 的 CFPAC-1 的体外抗增殖测定。经 PTX 处理的 ASC (CM / PTX) 的纯紫杉醇和 CM 对

肿瘤细胞增殖已在 96 孔板（德国萨斯泰特）中进行了研究，以胰腺腺癌细胞（CFPAC-1）为靶标[17]。简而言之，在 100 μ l 培养基/孔中制备纯药物或 ASC-CM 的 1:2 系列稀释液，然后向每个孔中添加 1000 个肿瘤细胞。在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO₂ 下培养 7 天后，通过 MTT 分析（3-（4,5-二甲基-2-噻唑基）-2,5-二苯基-2-H-四唑鎓），如先前所述[5, 18]。抑制浓度（IC₅₀ 和 IC₉₀）根据 Reed 和 Muench 公式[19]。将 PTX CM 的抗肿瘤活性与纯 PTX 的抗肿瘤活性进行比较，并表示为 PTX 当量浓度：PEC（ng / ml）= IC₅₀ PTX $\times$ 100 / V₅₀（ μ l / 孔）；IC₅₀ PTX = 产生 50%抑制作用的纯 PTX 浓度；V₅₀ 是能够抑制细胞增殖 50%的 PTX-MSCs-CM 体积。称为单一灌注 ASC 的 PEC 计算为

PEC 总量（PEC（ng / ml） $\times$ CM 体积（ml））与接种细胞数之间的比率：PE 释放量（pg / 细胞）= PEC（ng tot） $\times$ 1000 / 接种细胞数。吸收释放实验进行三次。

2.9. 统计分析。使用来自三个供体的脂肪抽吸物进行实验，并重复三次。报告的数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。如有必要，已使用 GraphPad 软件（GraphPad Inc., 圣地亚哥，加利福尼亚，美国）进行了适当的统计检验。p 值 $\leq$ 0.05 被认为具有统计学意义。通过 Excel 2007 软件（Microsoft Inc.），使用回归分析研究了响应的线性和相关性。

3. 结果

3.1. DB-ASC 隔离和扩展。从排水袋中回收的废料中含有大量的红细胞，这些红细胞仅通过氯化铵处理而被部分除去。然而，大约 7 天后，通过透明性，周围是紧密的红细胞地毯，可以清楚地识别出粘附的 ASC（图 2(a)-2(c)）。但是，贴壁细胞（每 3 天清洗一次）可改善其生长，孵育 10 天（早期贴壁）或 15 天（晚期贴壁）后，细胞会呈单层（图 2(d) 和 2(e)）分离细胞并定量原代培养物（pn 0）的细胞数。随后将 MSC 原代培养物通过 1:2 连续传代扩增直至传代数 6。通过评估群体倍增时间（PDT）和菌落形成效率（CFE）分别得出 55.2 $\pm$ 2.3 小时（PDT）和 20.8% $\pm$ 10.4%（CFE）。

3.2. DB-ASC 恢复效率。为了评估从抽脂物中回收的 ASC 的量，可通过两种不同的方式从引流袋中收集洗涤液。在第一个实验（一步收集）中，洗涤 5 分钟后收集了 600 ml 盐水；在第二个实验中（分次收集），收集分别在 1 分钟（120 ml），2.5（180 ml）和 5 分钟进行

（300 ml）（方框 2F）。在一步收集中，总回收率达到 40,000 $\pm$ 7000 ASCs / ml 脂肪抽吸物，通过锥虫蓝试验评估其细胞活力为 83.9 $\pm$ 5.4%。通过分馏收集，在 5 分钟时的最终回收率为 46,233 $\pm$ 4500 ASCs / ml，生存力为 98.4 $\pm$ 1.52。如图所示，ASC 根据动力学原理积聚到排水袋中，该动力学原理在 1 分钟时收集了 13.7%的细胞，在 2.5 分钟时收集了 54.9%的细胞，并且在该过程结束时，回收率（100%）类似于在收集过程中观察到的情况。一步操作，但细胞活力百分比更高（图 2(g)）。

3.3. DB-ASC 的免疫组织化学分析。对 ASC 进行的免疫组织化学分析显示，CD44，CD90 和 CD105 的阳性率高（ $>$ 90%），而 CD45，CD34，CD31 和 CD14 的造血标记物阴性（图 3(a)）。通过 FACS 评估 CD73 的阳性率并用斑点印迹表示（图 3(c)）。SMA（细胞质和膜）和 VEGF（细胞质）的表达也很重要。只有一小部分细胞对 CD146 呈阳性，而对 NG2 的反应性似乎主要在核水平表达（图 3(a)）。

3.4. DB-ASC 骨/脂肪分化能力。图中报道了其对成骨和成脂谱系的分化能力 4。

ALP 的积极性（图 4(d)）证实存在与骨基质矿化有关的重要酶活性。成骨细胞的成熟阶段可以通过形成复杂的橙色分叉的钙沉积物的存在来确认，这可以通过茜素红 S 的着色来证明（图 4(b)）。如图所示 4(f)，DB-ASCs 也能够脂肪细胞中分化，如红色细胞内夹杂物所证明。阴性对照（培养时未添加补品的 DB-ASC）没有任何分化的迹象（图 4(a), 4(c), 和 4(e)）。

3.5. DB-ASC 吸收和释放紫杉醇的能力。在标准实验室肿瘤细胞系 CFPAC-1 上测试了 DB-ASC 的条件培养基（均用 PTX（CM / PTX）或不使用（CM CTRL）涂底）（图 5）。正如预期的那样，CM CTRL 不会抑制增生性生长，其在稳定至 80%至 100%的增殖中保持稳定（图 5(a)）。相反，CM / PTX 根据剂量依赖性抗增殖作用影响 CFPAC-1 细胞的生长，该作用即使不那么有效，也反映了游离 PTX 产生的抑制作用（0.39 至 50 ng / ml）。通过线性回归分析的抑制动力学显示出高的测定系数（R²）在 0.71 至 0.88 之间（图 5(b)）。基于标准的 CM / PTX 的生物剂量纯药物的剂量反应回归使得能够估算紫杉醇的等效紫杉醇浓度（PEC）

3.94 $\pm$ 0.32 ng / ml。单细胞（CPR）释放的 PTX 量表示为 pg / 细胞，为 0.14 $\pm$ 0.01 pg / 细胞（方框 5C）。10⁶DB-ASCs / PTX 释放的药物浓度为 140 ng PTX，相当于游离药物的 IC₅₀ 值（1.48 $\pm$ 0.35 ng / ml）的约 10 倍。

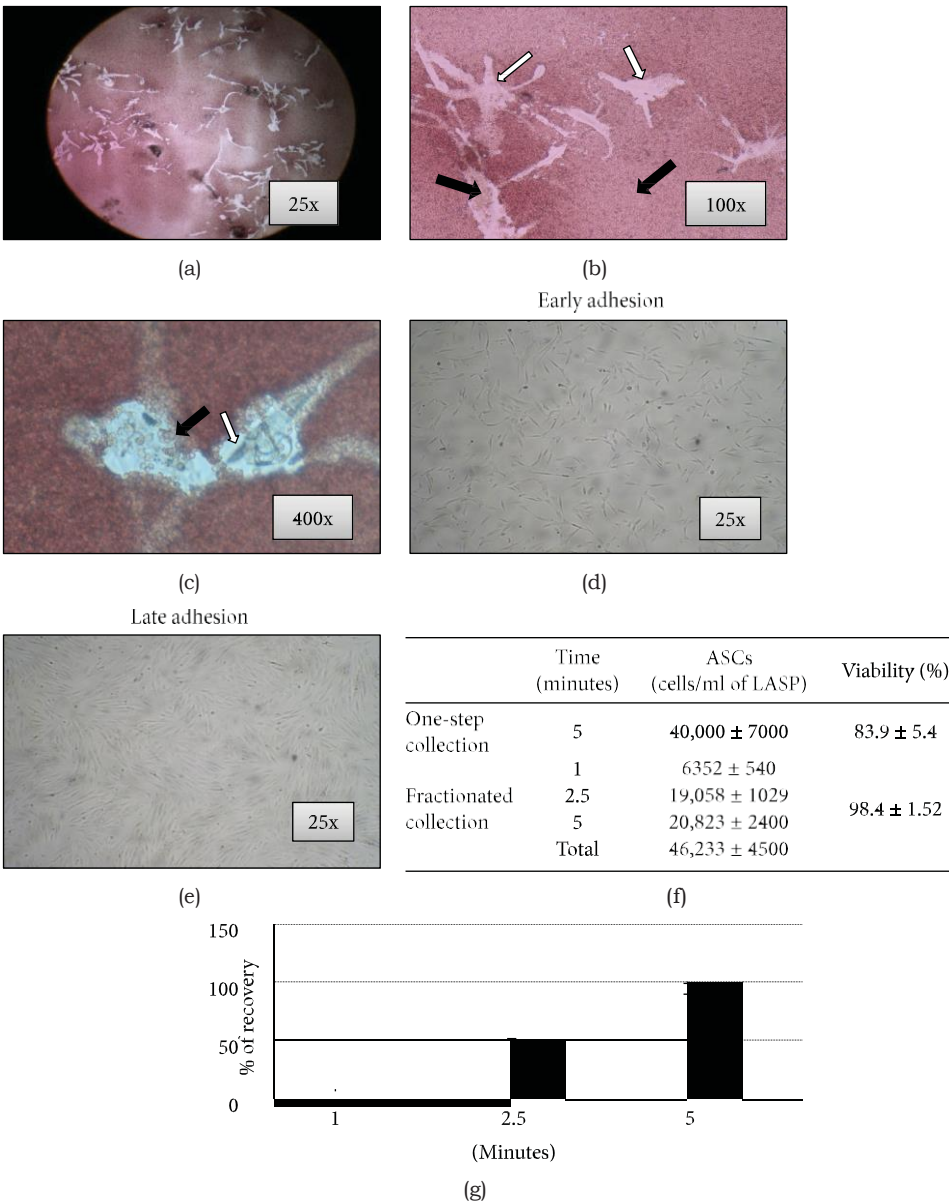
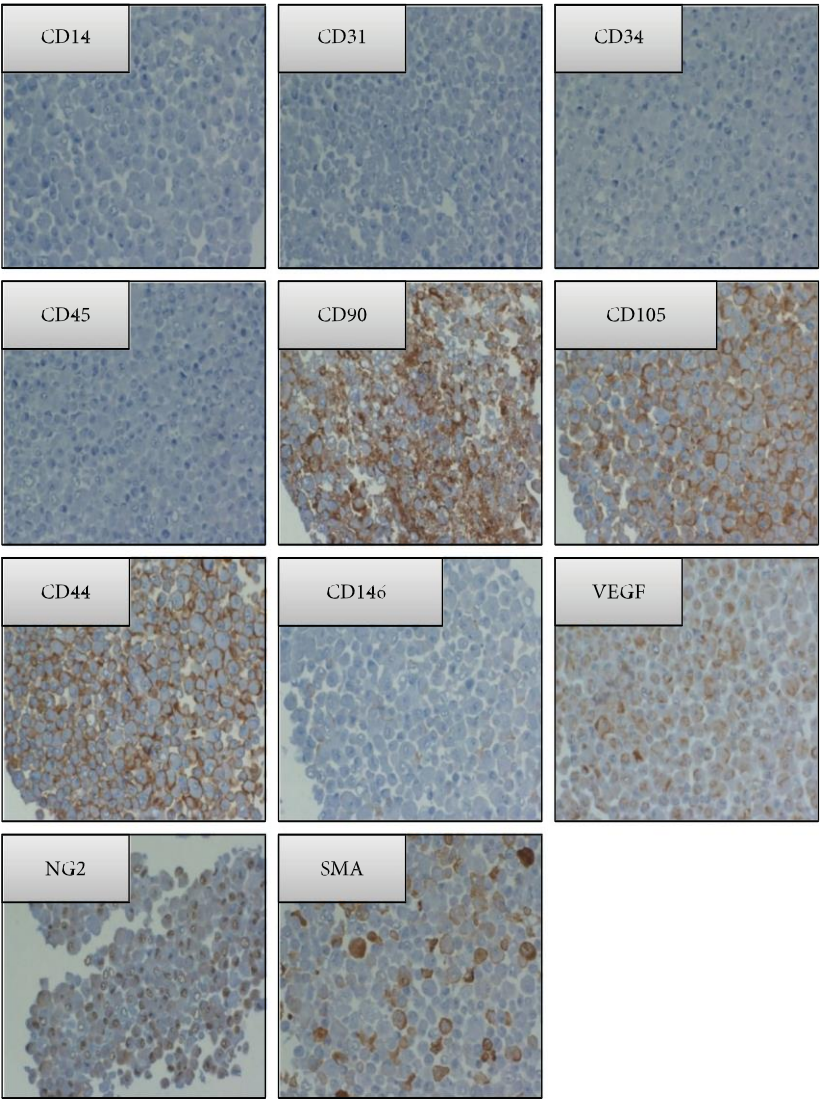


图 2: DB-ASC 的增长和恢复效率。培养几天后,有可能将红细胞与附着在烧瓶上的 ASC (a, b, c) 区分开。在图 (b) 和 (c) 中,黑色箭头表示红血球,白色箭头表示 ASC。图 (d) 表示 DB-ASC 的早期粘附力 (在 37°C, 5%CO₂ 下 10 天), 图 (e) 晚期粘附力 (在 37°C, 5%CO₂ 下 15 天)。数字 (f) 报告 DB-ASC 回收效率 (通过一步收集和分级收集从抽出物中回收的 ASC 数量), 直方图 (g) 报告在 1、2.5 和 5 分钟后分级收集回收的 ASC 百分比。数据表示为三种不同测量的平均值±标准偏差 (SD)。

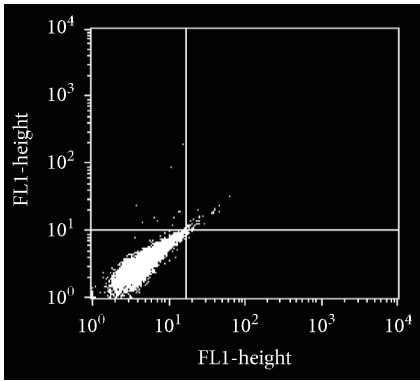
3.6. DB-ASC Secretome 中的细胞因子。在用或不用 PTX 引发的 DB-ASCs 条件培养基中分析的 40 种细胞因子 (CM DB-ASCs; CM DB-ASCs PTX) 中,仅考虑分泌量大于 1000 pg / ml 的那些 (IL-1ra, IL -6, IL-8, IL-12 (p70), MCP-1 (MCAF), VEGF 和 GROa), 并在图中报告 6。在 PTX 处理之前和之后评估 CM 中这些细胞因子的浓度。如图所示,PTX 处理似乎抑制了其分泌,其表达百分比范围为 22.35% (IL12 (p70)) 至 70.98% (GROa), 平均下降 37.1±15.7%。

4. 讨论区

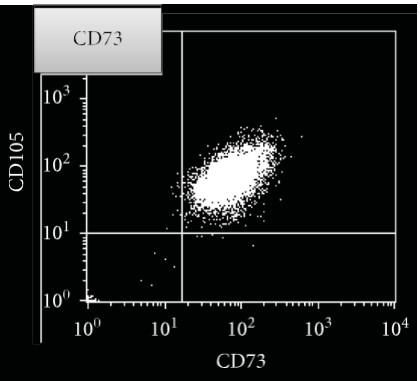
已知可以根据不同的方法通过微创手术来收集脂肪组织,并且已经进行了许多努力来减少对生物材料的操纵。[6]. 脂蛋白是一种非常有用的技术,它在不添加酶或任何其他添加剂的情况下,在封闭的液体环境中对脂肪抽吸物进行了微碎片化处理,从而通过液体提供的保护 (定义上是不可压缩的) 可以避免脂质被破坏。脂肪细胞。最终产品是未展开的



(a)



(b)



(c)

图3: DB-ASC 的免疫组织化学分析。(a) 对 CD14, CD31, CD34, CD45, CD90, CD105, CD44, CD146, NG2, SMA 和 VEGF 的免疫组织化学分析 (所有数字均为 100 倍放大率)。(b, c) CD73 上的 FACS 分析: (b) = 负 CTRL 和 (c) = CD73 表达。

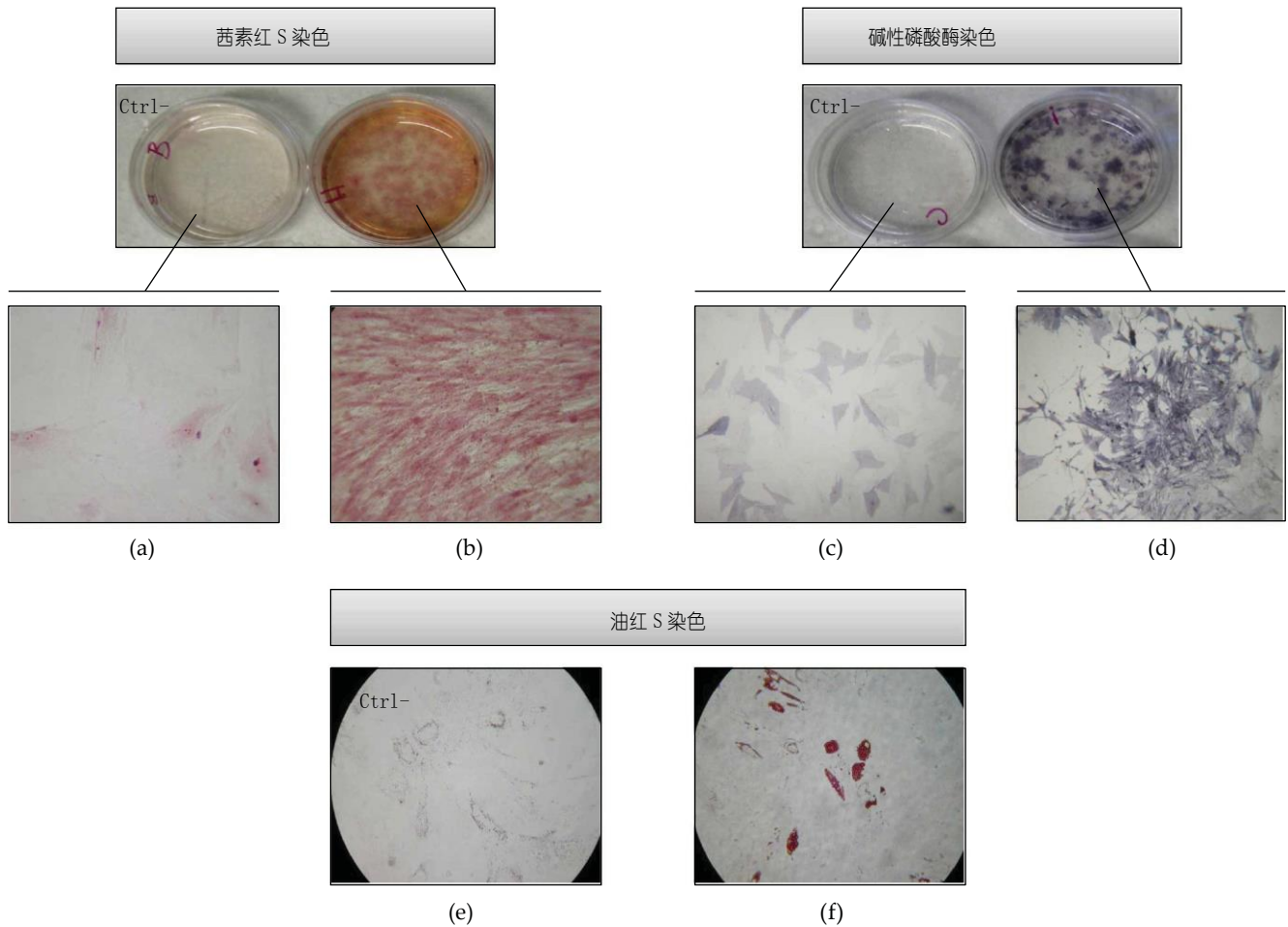


图 4: DB-ASC 骨/脂肪分化。在培养皿中通过茜素红 S 染色 (左) 和磷酸酶碱性染色 (右) 评估成骨分化。(a, c) 在无补充剂的控制培养基中生长的 DB-ASC (阴性对照, CTRL-) ; (b, d) 阳性培养物 (放大 200 倍)。通过油红色染色 (存在红色胞质内含物; 放大 200 倍) 评估成脂分化。(e) 负控制 (CTRL-) (放大 200 倍)。(f) 阳性培养 (放大 200 倍)。

适用于临床的最小程度控制的脂肪组织产品, 因为它符合良好的生产规范 (GMP)。正如最近所评论的, 脂蛋白已被用于许多外科领域, 例如整形外科, 重建外科, 整形外科和肿瘤学[20]。为了获得更标准化的微片段化条件, 已设计出一种原型设备 (PLG-P), 该设备克服了手动操作, 提供了具有可编程参数 (摇动的角度和频率以及洗涤的流量) 的程序。我们将 Lipogems 设备安装到配有排水袋的 PLG-P 上, 从而可以收集我们研究的大量洗涤液 (图 1)。我们的研究表明, 排水袋中包含的“废物”材料令人惊讶地是 ASC 的丰富来源。实际上, 在漫长的微片段化过程中, 连续的摇动和清洗助焊剂使许多堆积在排水袋中的 ASC 机械分离。当然, 由于所用缓冲液的洗涤量大, 大量的单个分离的 ASC 被稀释到袋子中。但是, 这些细胞很容易通过离心收集, 如果在有污染的红细胞存在的情况下进行培养,

能够坚持出色的 CFE 并可以通过良好的 PDT 轻松扩展 (图 2)。这些细胞对 CD44, CD73, CD90, CD105, SMA, VEGF 和 NG2 表达呈阳性, 对 CD14, CD31, CD34 和 CD45 呈阴性, 并显示出骨/成脂分化能力 (图 3 和 4)。尽管已知这些标志物的表达可能取决于培养条件, 但该模式清楚地证实了 DB-ASC 的间质基质细胞类型。除了对典型的 MSC 标记 CD90, CD105 和 CD73 阳性外, 21], DB-ASCs 对 NG2 (约 50%) 和 SMA (90%) 也呈阳性, 这是周细胞通常以不同量表达的标志物, 具体取决于它们起源的血管的类型 (毛细血管, 小静脉或小动脉) [22, 23]。脂质体阿司匹林非常富含微血管, 因此, 通过我们的手术可以获得大量的 ASC 祖细胞。CD146 阳性的细胞很少, 可能是因为从脂抽吸物洗脱的 ASC 群体中该标志物的表达降低了, 这与我们之前对脂血性 MSC 的研究一致, 表明 CD146 可以染色大部分内皮细胞而不是周细胞[24]。

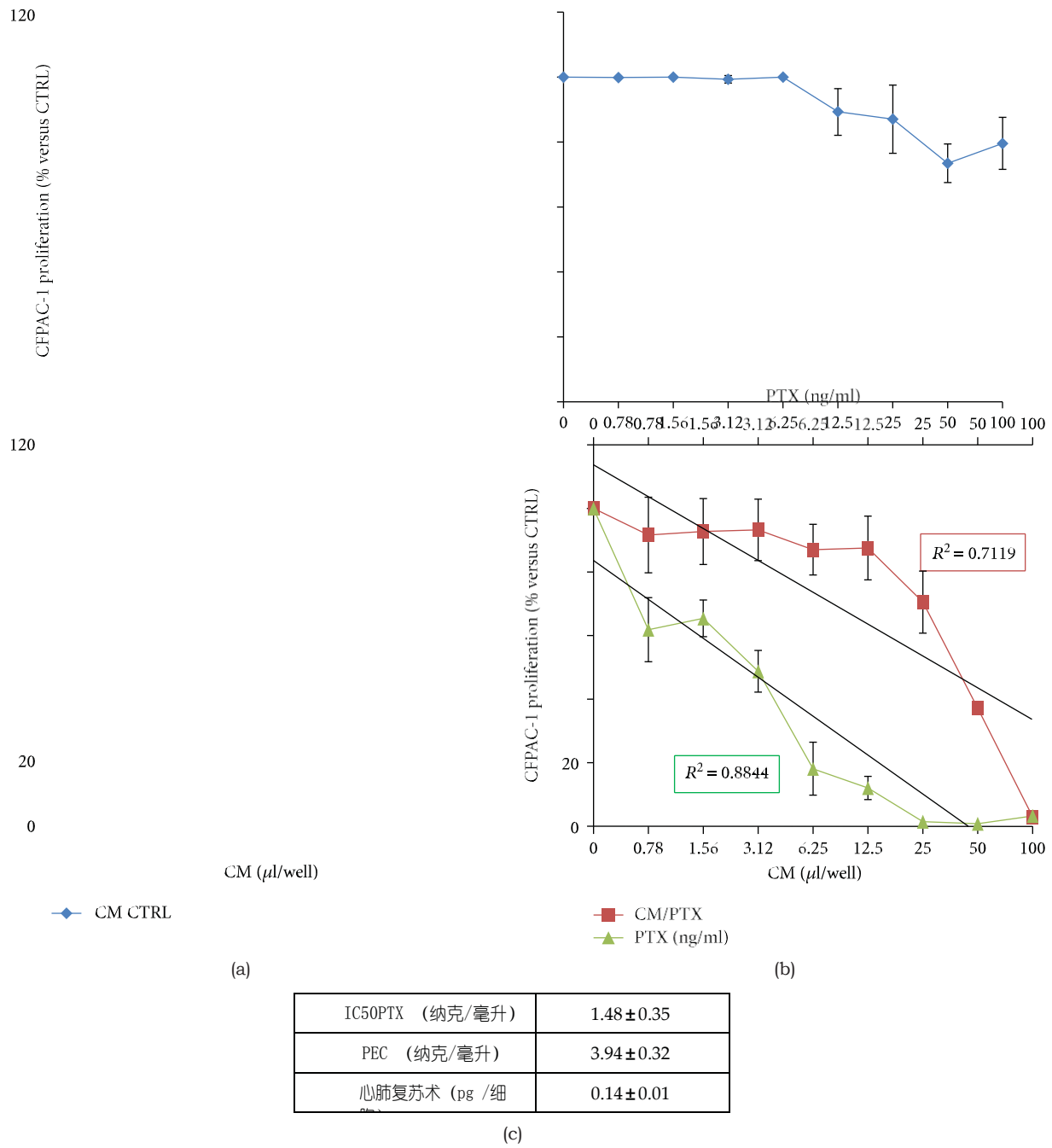


图 5: DB-ASC 吸收和释放紫杉醇的能力。该图报告了通过 (a) 未处理细胞的条件培养基 (CM) (CM CTRL) 和 (b) 装有 PTX (CM / PTX) 的 DB-ASC 的 CM 对胰腺癌 CFPAC-1 细胞的抑制活性。将活性与纯 PTX 施加的抑制进行比较。活性表示为相对于未处理细胞的 CFPAC-1 增殖百分比 (100% 增殖)。还报告了剂量反应动力学的回归和相关系数 (R^2)。方框 (c) 报告了以 PTX (ng / ml), 紫杉醇当量浓度 (PEC) 和单细胞紫杉醇释放量 (CPR) 表示的 IC_{50} 值。请参阅材料和方法中的详细信息。值表示为三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD)。

细胞因子 (pg /毫升)	CMDB-ASC	CM DB-ASCs	PTX
IL-1ra	1077.87	736.10	
il-6	10278.09	7242.88	
il-8	5832.56	3068.68	
IL-12 (p70)	1119.86	869.60	
mcp-1 (mcaf)	3433.47	2309.90	
蔬菜	4423.49	3333.90	
地面	2975.18	863.37	
生长因子 b	6306.34	3906.46	

Cytokines (% of reduction)

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

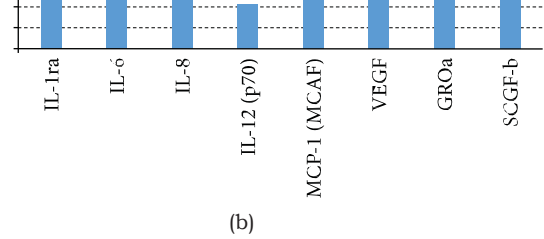


图 6: DB-ASC 分泌组中的细胞因子。(a) 该表显示了在用 PTX (CM DB-ASCs PTX) 处理之前和之后, DB-ASCs 条件培养基中分泌的细胞因子 (以 pg / ml 表示)。(b) 直方图报告了 PTX 处理的 DB-ASC 分泌的细胞因子减少, 以未处理的 DB-ASC 产生的数量的百分比表示。

估计细胞含量, 特别是每毫升脂肪抽吸物的 ASCs 数量的可能性对该技术至关重要。我们的研究表明, 清洗

带有 PLG-P 的 lipoaspirate 可以收集大量单个分离的 ASC, 回收率以每毫升加工过的 lipoaspirate 的 ASCs 为单位。

与其他作者所报告的相比, 高 $46,233 \pm 5500$ ASC / ml[25].

另一个重要的观察结果是, 扩展的 ASC 能够摄取然后释放紫杉醇 (PTX)。尽管 PTX 处理改变了 DB-ASC 产生的某些细胞因子的数量 (图 6), 这方面无关紧要, 因为载有药物的细胞能够以活性形式释放 PTX, 如条件培养基的体外抗癌活性所示 (图 5)。DBMSCs 对紫杉醇的吸收释放能力与我们先前对不同来源的 MSCs (骨髓, 脂肪组织, 人牙龈组织, 人成纤维细胞以及血细胞) 的观察结果一致, 并证实这些细胞可以被认为是重要的细胞介导的药物递送工具[4, 5, 10, 14–16].

5. 结论

综上所述, 该系统可最小程度地控制脂肪组织, 从而绕开了 GMP 指南的复杂要求, 大大降低了对人类患者进行细胞疗法费用。从生物技术的角度来看, 我们的发现表明可能开发出一种新的集成设备, 该设备无需酶即可在单个步骤中分离, 扩增和加载 ASC。如果配备了选择性过滤器, 并且如果排水袋将由“细胞培养室”代替, 则 PLG-P + Lipogems 设备将配置“标准化自动收集系统”, 以通过符合 GMP 的“最少操作”来分离间充质细胞。标准[26, 27]. 这样的系统不仅具有用于再生医学目的而且还具有用于细胞介导的药物递送的获得 MSC 的潜力。

利益冲突

Carlo Tremolada 是 Lipogems International SpA 的总裁兼创始人。Silvia Versari 受聘于 Lipogems International SpA。所有其他作者均拒绝任何利益冲突。

致谢

作者要感谢 Loredana Cavicchini (米兰大学, 技术员) 和 Eng. 保罗 • 皮拉佐利 (Hydra srl) 提供技术帮助。

参考文献

- [1] AI Caplan, “用于组织工程与再生医学的成人间充质干细胞”, 《细胞生理学杂志》, 第 1 卷。213 号 2, 第 341–347 页, 2007 年。
- [2] AI Caplan, “为什么 MSC 具有治疗作用? 新数据: 新见解”, 《病理学杂志》, 第 1 卷。217 号 2, 第 318–324 页, 2009 年。
- [3] A. Schäffler 和 C. Büchler, “简明综述: 脂肪组织来源的基质细胞—新型基于细胞疗法的基础和临床意义”, 干细胞, 第 1 卷。25 号 4, 第 818–827 页, 2007 年。
- [4] A. Bonomi, V. Coccè, L. Cavicchini 等人, “在体外用紫杉醇引发的源自脂肪组织的基质细胞获得了抗肿瘤活性”, 《国际免疫病理学和药理学杂志》, 第 1 卷。26 号补编 1, 第 33–41 页, 2013 年。
- [5] A. Pessina, A. Bonomi, V. Coccè 等人, “用紫杉醇引发的间充质基质细胞为癌症治疗提供了一种新方法”, 《公共科学图书馆·第一卷》(Vol. 1)。6 号 12, 文章 e28321, 2011 年。
- [6] E. Oberbauer, C. Steffenhagen, C. Wurzer, C. Gabriel, H. Redl 和 S. Wolbank, “脂肪组织衍生细胞的酶促和非酶促分离系统: 最新技术”, 细胞再生, 卷。4, 没有 1 页 2015 年 4 月 7 日。
- [7] B. Bellei, E. Migliano, M. Tedesco, S. Caputo 和 M. Picardo, “最大限度地利用非酶法从脂肪抽吸物中收获脂肪分解的茎: 技术考虑因素和再生手术的临床意义”, 《科学报告》, 卷 7 号 1, 2017 年第 10015 条。
- [8] F. Bianchi, M. Maioli 和 E. Leonardi 等人, “一种新的非酶方法和装置, 可通过人类脂肪抽吸物的轻微机械力获得高度富含周细胞样元素的脂肪组织衍生物”, 细胞移植, 卷 22 号 11, 第 2063–2077 页, 2013 年。
- [9] C. Tremolada, G. Beltrami 和 A. Magri, “脂肪间充质干细胞和“再生性脂肪组织移植” (LIPOGEMSTM), 用于肌肉骨骼再生”, 《欧洲肌肉骨骼疾病杂志》, 第 1 卷。3 号 2, 第 57–67 页, 2014 年。
- [10] AT Brini, V. Coccè, LM José Ferreira 等人, “载有紫杉醇的齿间牙间乳头间充质基质细胞 (GinPa-MSC) 进行的细胞介导的药物传递”, 《药物传递专家意见》, 第 1 卷。13 号 6, 第 1–10 页, 2016 年。
- [11] A. Berenzi, N. Steimberg, J. Boniotti 和 G. Mazzoleni, “MRT 快报: 分离细胞的 3D 培养: 一种用于优化其组织化学和免疫细胞化学分析的快速有效方法”, 显微镜研究与技术, 第 1 卷。78, 没有。4, 第 249–254 页, 2015 年。
- [12] MF Pittenger, AM Mackay, SC Beck 等人, “成人间充质干细胞的多谱系潜能”, 《科学》, 第一卷。284 号 5411, 第 143–147 页, 1999 年。
- [13] P. Tropel, D. Noël, N. Platet, P. Legrand, AL Benabid 和 F. Berger, “从成年小鼠骨髓中分离和鉴定间充质干细胞”, 《实验细胞研究》, 第一卷。295, 不。2, 第 395–406 页, 2004 年。
- [14] A. Bonomi, A. Silini, E. Vertua 等人, “人类羊膜间充质基质细胞 (hAMSC) 作为癌症治疗中药物递送的潜在载体: 一项体外研究”, 干细胞研究与治疗, 第 1 卷。6 号 1 页 155, 2015 年。
- [15] V. Coccè, A. Vitale, S. Colombo 等, “人类皮肤衍生的成纤维细胞被用作药物输送的‘特洛伊木马’”, 《临床和实验皮肤病》, 第 1 卷。41 号 4, 第 417–424 页, 2016。
- [16] A. Pessina, V. Coccè, L. Pascucci 等人, “用紫杉醇引发的间充质基质细胞可吸引和杀死白血病细胞, 抑制血管生成并改善白血病小鼠的存活率”, 英国血液学杂志, 第一卷。160 号 6, 第 766–778 页, 2013 年。
- [17] JC McIntosh, RA Schoumacher 和 RE Tiller, “囊性纤维化患者的胰腺腺癌”, 《美国医学杂志》, 第 1 卷。85, 没有 4 页 592, 1988 年。
- [18] T. Mossman, “细胞生长和存活的快速比色测定: 在增殖和细胞毒性中的应用

分析”，《免疫方法杂志》，第1卷。65，不。1-2，第55-63页，1983年。

- [19] LJ Reed 和 H. Muench, “一种简单的估计 50%终点的方法,” 《美国流行病学杂志》，第1卷。27号3, 第493-497页, 1938年。
- [20] C. Tremolada, V. Colombo 和 C. Ventura, “脂肪组织和间充质干细胞：最新技术和 Lipogems®技术的发展”, 《当前干细胞报告》，第1卷。2, 没有3, 第304-312页, 2016年。
- [21] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller 等, “定义专能间质基质细胞的最低标准。国际细胞疗法学会立场声明, “细胞疗法”, 第1卷。8号4, 第315-317页, 2006年。
- [22] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla 等人, “多个人体器官中间充质干细胞的血管周围起源”, Cell Stem Cell, 第1卷。3号3, 第301-313页, 2008年。
- [23] M. Crisan, M. Corselli, WC Chen Corselli, C. WCW 和 B. Péault, “再生医学的血管细胞”, 细胞与分子医学杂志, 第1卷。16号, 第12页, 第2851-2860页, 2012年。
- [24] V. Ceserani, A. Ferri, A. Berenzi 等人, “微片段脂肪组织及其衍生的间充质基质细胞的血管生成和抗炎特性”, 《血管细胞》，第1卷。8号1页 2016年3月3日。
- [25] FS Shah, X. Wu, M. Dietrich, J. Rood 和 JM Gimble, “一种分离人脂肪组织来源的基质干细胞的非酶法”, 细胞疗法, 第1卷。15号8, 第979-985页, 2013年。
- [26] N. Fekete, MT Rojewski, D. Fürst 等人, “符合 GMP 的骨髓衍生 MSC 的分离和大规模扩增”, 《公共科学图书馆·科学》第一卷。7号8, 文章 e43255, 2012年。
- [27] ML Torre, E. Lucarelli, S. Guidi 等人, “离体扩增间充质基质细胞对临床应用的最低质量要求,” 干细胞与发育, 第1卷。24号6, 第677-685页, 2015年。