# جداسازی، تکثیر و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان

صنمبر صدیقی[۱]، احد خوش‌زبان[۲]
امیرحسین توکلی[۳]
رامین خطیب سمنانی[۴]، زهرا سبحانی[۵]
نیر داداش‌پورمجیداباد[۶*]

۱- گروه داخلی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- گروه جراحی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.
۵- پزشک محقق، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی، تهران، ایران.
۶- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۴۱۲-۷۲۳۶۰۷۸
E-mail: n_dadashpour@yahoo.com

## چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵ آنلاین: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰

***زمینه و هدف:*** فن‌آوری بافت چربی به‌دلیل فراوانی و دسترسی آسان طی روند لیپوساکشن، منبع ایده‌آلی برای تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تهیه داربست‌های طبیعی فراهم می‌آورد که موجب ترمیم و بازسازی مناسب بافت صدمه دیده نسج نرم می‌شوند. هدف این مطالعه جداسازی و تکثیر و شناسایی سلول‌های بنیادی از بافت چربی انسانی است.

***روش بررسی:*** برای انجام این تحقیق نمونه بافت استریل چربی از نواحی شکم و پهلوی بیماران جوان تهیه شد. با کمک آنزیم کلاژناز و سانتریفوژ مکرر، سلول‌های بنیادی بافت چربی جداسازی و کشت داده شد. تکثیر و چسبندگی سلول‌ها در کشت دوبعدی، شمارش سلولی با لام نئوبار انجام شد. سپس ماهیت سلول‌های بنیادی بافت چربی با به‌کارگیری روش فلوسایتومتری و بررسی مشخصات سطحی سلول‌ها و هم‌چنین القای تمایز سلول‌ها به بافت استخوان و غضروف انجام شد.

***یافته‌ها:*** ماهیت مزانشیم بودن سلول‌ها، براساس بیان شاخص‌های CD90, CD105, CD166 و عدم بیان شاخص‌های رده خون‌ساز نظیر CD34, CD31, CD45 به‌وسیله تکنیک فلوسایتومتری تایید شد. رنگ‌آمیزی‌های هیستولوژیکی اختصاصی الیزارین رد و تولوییدن بلو به‌ترتیب تمایز سلول‌های بنیادی کاشته شده روی داربست را به سلول استئوسیت و غضروف تایید نمود.

***نتیجه‌گیری:*** هر چند در این تحقیق به مقایسه قدرت تکثیری و تمایزی این سلول‌ها در محیط داخل بدن پرداخته نشد، اما با توجه به نتایج ریخت‌شناسی، مطالعات فلوسایتومتری و تست‌های تمایزی به‌دست‌آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که جداسازی سلول بنیادی بافت چربی به‌روش به‌کار رفته در این مطالعه موفقیت‌آمیز بوده است و این سلول‌ها قابلیت استفاده در ترمیم بافتی را به‌روش پیوند خودی و یا غیرخودی خواهند داشت.

***کلمات کلیدی:*** سلول بنیادی، بافت چربی، تمایز، مهندسی بافت.

## مقدمه

یکی‌از بزرگ‌ترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده است. آن‌چه در این روند مورد نیاز است فراهم‌سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القای بازسازی بافت آسیب دیده است تا بتواند خود را ترمیم کند.[۱] امروزه با توجه به تعداد کم اهداکنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن، سعی در مهندسی بافت به‌کمک سلول‌های بنیادی و داربست‌های گوناگون اعم از سنتزی و به‌ویژه طبیعی شده است.[۲-۴] بافت چربی به‌دلیل داشتن مقادیر زیاد سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان[۵] و قابلیت پیوند به میزبان خودی و غیرخودی توجه زیادی را به خود جلب کرده است.[۶] نکته قابل توجه دسترسی آسان به حجم بزرگی از چربی طی روند لیپوساکشن می‌باشد.[۷] سالانه



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]

حدود ۴۰۰,۰۰۰ عمل جراحی لیپوساکشن انجام می‌شود[8] که به‌طور معمول چربی حاصل از آن دور ریخته می‌شود، اما مطالعات جدید نشان می‌دهد که استفاده از این بافت به‌عنوان منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل عظیم برای کاربردهای مهندسی بافت و تهیه داربست طبیعی فراهم کرده است.[9] با توجه به نکات مذکور این تحقیق بر آن است تا با جداسازی و تکثیر سلول بنیادی از بافت چربی، ضمن بررسی رفتار سلول‌ها در محیط کشت مغذی و امکان تمایز کنترل‌شده سلول‌ها راه‌کار مناسبی جهت پزشکی ترمیمی ارایه نماید.

## روش بررسی

جمع‌آوری نمونه چربی: برای انجام این مطالعه تجربی نمونه بافت چربی از نواحی شکم و پهلوی بیماران جوان ۴۰-۲۰ ساله که بنا به نظر پزشک جراح و نه جهت انجام طرح مذکور، در بیمارستان میلاد تهران در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱ تحت جراحی لیپوساکشن قرار گرفتند، با کسب رضایت شخصی بیماران تهیه شد. برداشت ml ۳۰-۲۰ نمونه بافت چربی توسط پزشک جراح، در اتاق عمل و تحت شرایط استریل انجام گرفت. نمونه چربی داخل کیسه استریل حاوی محیط کشت سلولی Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)، دارای آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین، در حداقل زمان به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی: نمونه بافت چربی در اتاق کشت و زیر هود لامینار توسط قیچی استریل به قطعات ریز تبدیل شد. به‌منظور حذف سلول‌های خونی و دبری‌ها، نمونه چربی چندین بار توسط محلول Phosphate-Buffered Saline (PBS) شستشو داده شد و محلول رویی دور ریخته شد.

بافت چربی سفید باقی‌مانده در کف پلیت به لوله فالکون منتقل شده و ml ۶-۵ آنزیم کلاژناز ۰/۱٪ به آن اضافه کرده و در حمام آب‌گرم (Memmert) ۳۷ °C، به‌مدت ۳-۱/۵ ساعت قرار داده شد (در طول این مدت با تکان دادن لوله حاوی نمونه به تجزیه بیش‌تر بافت چربی کمک شد). بعد از مرحله تجزیه آنزیمی لوله‌های حاوی نمونه از حمام آب‌گرم بیرون آورده شده و با دور rpm ۲۰۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. این عمل حدود سه بار قابل تکرار است. روغن و بافت چربی رویی به‌آرامی برداشته شده و دور ریخته شد، محلول قسمت پایین لوله که حاوی سلول‌های ته‌نشین‌شده‌ی چربی است نگه داشته شد. سلول‌ها به‌داخل فلاسک مخصوص کشت سلول حاوی DMEM با ۱۰٪ FBS منتقل شدند. در نهایت فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور ۳۷ °C و CO ۵٪ قرار داده شد.

تعویض محیط کشت: بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی هر چهار روز یک‌بار تعویض محیط انجام گرفت. بدین‌منظور محلول رویی فلاسک دور ریخته شد. سپس محیط کشت تازه DMEM که ۱۰٪ آن‌را FBS تشکیل داده بود، به فلاسک کشت اضافه شد و دوباره به داخل انکوباتور منتقل شد. در این مرحله رشد سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری معکوس ارزیابی شد. سلول‌ها در این مرحله حالت کروی داشتند.

پاساژ سلول (Sub culture): بعد از این‌که با تعویض منظم محیط‌های کشت، سلول‌ها به مرحله تراکم (Confluence) رسیدند به‌منظور انتقال سلول‌ها به فلاسک بزرگ‌تر، پاساژ سلولی انجام گرفت. بعد از سه مرتبه پاساژ سلولی، برای تایید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی کشت‌یافته از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد.

فلوسایتومتری: جهت انجام فلوسایتومتری، آنتی‌بادی‌های کونژوگه Anti-Human-CD90-FITC، Anti-Human-CD34-FITC، Anti-Human-CD105-RPE، Anti-Human-CD31-RPE همراه با کنترل منفی (Dako Corporation, Glostrup, Denmark) مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور از سلول‌های جداشده در پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌های چسبیده به کف فلاسک توسط Trypsin/EDTA جدا شده و شمارش سلولی با کمک لام نئوبار انجام گرفت. در مرحله بعد در یک محیط تاریک غلظت مناسبی (نسبت ۱:۱۰) از آنتی‌بادی‌های نشاندار ذکر شده، همراه با کنترل منفی به آن اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. بعد از شستشو با PBS، آنالیز فلوسایتومتری توسط FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA) انجام گرفت.

تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به استخوان: ابتدا محیط کشت اولیه دور ریخته شده و سلول‌ها با محیط تمایزی شامل DMEM حاوی ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات، ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و ۱۰-۷ مولار دگزامتازون به‌مدت ۲۱ روز انکوبه



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]

شدند. محیط تمایزی هر سه روز یک‌بار تعویض گردید. برای ارزیابی تمایز، رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد به‌منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت.[11]

تمایـز سلول‌های بنیـادی مشتق از چربی به کندروسیت: به‌منظـور تمایز سلول‌ها به غضروف، محیط رویی تخلیه شده و سلول‌ها همراه با محیط غضروف‌ساز شامل DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم Transforming Growth Factor-β3 (TGF-β3), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)، ۱۰ نانوگرم Bone Morphogenetic protein-6 (BMP-6); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)، ۱٪ Insulin-Transferin- Selenium (ITS) :Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ۱/۰ میکرومولار دگزامتازون، ۵۰ میکرومولار ۲–فسفو آسکوربات، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین– استرپتومایسین و ۱٪ Fetal Bovine Serum (FBS) به‌مدت ۲۱ روز انکوبه شدند. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدن آبی استفاده شد.

## یافته‌ها

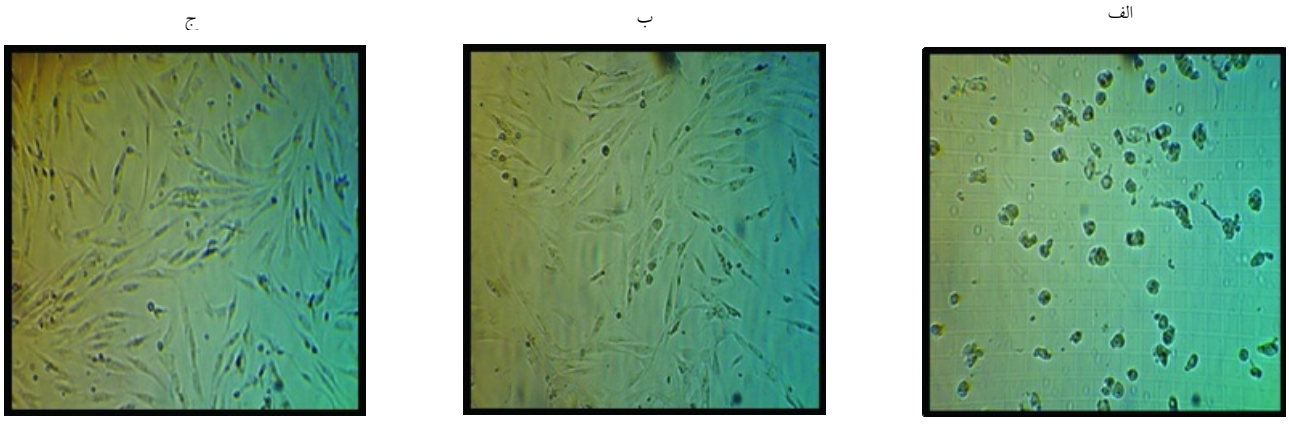
نتایج کشت و مشاهدات مورفولوژی: تصاویر تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان داد که در کشت اولیه سلول‌ها دارای موفـولوژی دوکـی و چند وجهی بودند (شکـل الف– ۱)، سلـول‌های دوکی‌شکل نسبت به سلول‌های دیگر سرعت رشد بیش‌تری داشتند و پس‌از اولین پاساژ بیش‌ترین درصد سلولی را تشکیل دادند (شکل ب– ۱)، در پاساژهای بعدی جمعیت همگن‌تری از سلول‌های دوکی‌شکل با هسته‌های مشخص، که موفولوژی تیپیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی است کف فلاسک را اشغال کرد (شکل ج– ۱).

نتایج فلوسایتومتری: براساس شکل میزان بیان مارکرهای هماتوپوییتیک CD 34 و CD 31 به‌ترتیب برابر ۳٪، ۲۰٪ و میزان بیان مارکرهای ویژه مزانشیمی CD 90 و CD 105 به‌ترتیب برابر ۸۵٪ و ۸۰٪ بود.

نتایج تست‌های تمایزی: تمایز به استئوسیت: سلول‌ها پس‌از القای استئوسیتی بعد از ۲۱ روز، از نظر ترشح ماتریکس معدنی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد نشان دادند. تمایز به کندروسیت: سلول‌ها پس‌از القای کندروسیتی بعد از ۲۱ روز، از نظر ترشح ماده زمینه‌ای با رنگ‌آمیزی تولوییدن بلو مثبت شدند.

## بحث

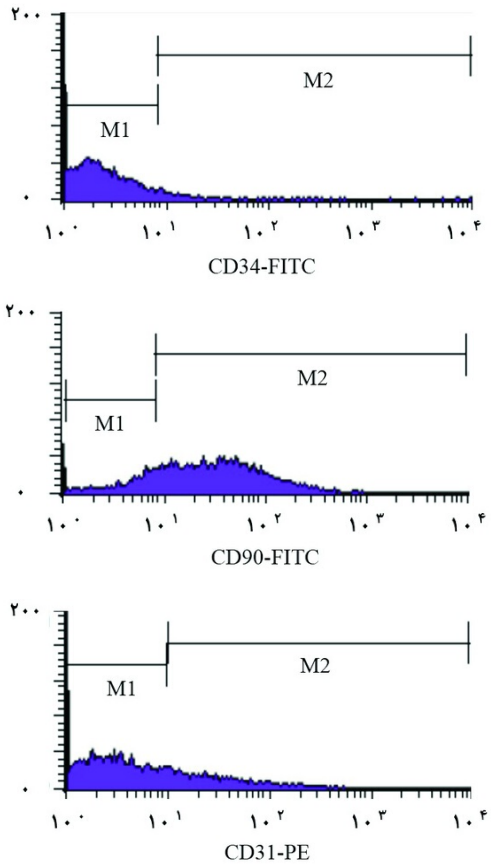
سلول‌های بنیادی برای اولین‌بار توسط Friedenstein در اواسط سال ۱۹۷۰ شناسایی گردید.[10] علی‌رغم قدرت تکثیر و تمایزی بالای سلول‌های بنیادی جنینی، مباحث اخلاقی نظیر مسئله سقط جنین برای به‌دسـت‌آوردن سلـول و احتمال بروز عارضه تراتوما استفـاده از ایـن




**شکل ۱: الف: جمعیت اولیه سلول‌های جدا شده از بافت چربی در کشت اولیه ب: در پاساژ اول از کشت‌های فوق سلول‌های دوکی‌شکل شروع به ازدیاد نموده و سرعت رشد آن‌ها افزایش می‌یابد. ج: در پاساژ سوم جمعیت یکنواختی از سلول‌های دوکی‌شکل به هسته‌های مشخص رویت شد. (×۴۰۰)**



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]




**شکل ۲: هیستوگرام‌های فلوسایتومتری نشان‌دهنده ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی انسان.** چنان‌چه مشخص است این سلول‌ها، آنتی‌ژن‌های CD105, CD90 را بیان کرده در حالی‌که CD34, CD31 را بیان نمی‌کنند.

سلول‌ها را محدود کرده است.[11] سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ مشکلات اخلاقی مشابه جنینی خود را ندارند و از خود بیمار به‌دست می‌آیند.[12] به‌دنبال تحقیقات بیش‌تر جهت یافتن منابع در دسترس‌تر برای جداسازی سلول‌های بنیادی، گروهی از محققین برای اولین‌بار در سال ۲۰۰۱ و به‌دنبال آن در مطالعات بعدی موفق به جداسازی یک جمعیت سلولی Multi potential از بافت چربی شدند. در این مطالعه سعی شد مطابق پروتکل، Zuke[13] سلول‌هایی با خصوصیات شبیه به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیپیک همانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، از بافت چربی انسان جداسازی و کشت داده شود. براساس پژوهش‌های انجام‌شده اگر سلولی واجد ظاهر دوکی‌شکل، توانایی چسبندگی به کف ظرف کشت و قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مزودرمی باشد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار می‌گیرد.[14و15] بر این اساس در مطالعه حاضر برای جداسازی اولیه جمعیت سلولی، از ویژگی چسبندگی به سطوح پلاستیک بر خلاف سلول‌های خونی که فاقد این خاصیت هستند استفاده شد. با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها به‌تدریج جمعیت سلولی هموژن و همگونی از سلول‌های شبه فیبروبلاستی دوکی‌شکل به‌دست آمد. اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای یک مارکر ویژه و اختصاصی نیستند. نتایج بررسی بیان مارکرهای سطح سلولی مشابه با سایر تحقیقات بود.[16] ماهیت سلول‌های بنیادی به‌وسیله بیان هم‌زمان مارکرهای سلولی CD105, CD90 (مارکر ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و عدم بیان مارکرهای سلولی CD34, CD31 (مارکر ویژه سلول‌های بنیادی هماتوپوییتیک) تایید گردید (شکل ۲).

سلول‌های بنیادی چربی کشت‌شده در این مطالعه نیز مشابه سایر پژوهش‌های انجام شده[17]حاکی‌از پتانسیل تزاید بالاتر این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان بود. در بررسی ویژگی‌های تمایزی، این سلول‌ها به رده‌های چربی، استخوانی و غضروفی سوق داده شدند. تحت شرایط تمایزی ایده‌آل توانایی تمایز این سلول‌ها به دودمان سلولی مزودرمی استخوان مشابه به یافته‌های Tapp[18] و تمایز به غضروف و چربی مشابه یافته‌های Estes[19] و Locke[5] نشان داده شد.

به‌دلیل پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده، اعتقاد بر نقش فعال سلول‌های بنیادی چربی در ترمیم و بازسازی بافت‌های نرم تقویت می‌شود. جراحان پلاستیک بالینی سال‌ها است که از پیوند چربی برای جراحی‌های مختلف سینه، صورت و سایر جراحی‌های ترمیمی با موفقیت استفاده کرده‌اند. در حال حاضر، محققان به‌دنبال یافتن قدرتی هستند که بافت چربی را نگه می‌دارد. پژوهش Ivona Perce تاکید می‌کند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی را می‌توان به‌طور معمول از بیماران جدا کرد و با استفاده از روش‌های مولکولی تغییر داد و برای بسیاری از برنامه‌های کاربردی طب ترمیمی به‌کار برد.[20] امروزه موادی همانند کلاژن، هیالورونیک اسید، سیلیکون و سایر مواد پرکننده که در ترمیم بافت نرم استفاده می‌شوند معایبی دارند که از آن جمله می‌توان به هزینه بالا، تحریک سیستم ایمنی و خواص آلرژیک و خطر انتقال عفونت اشاره نمود. در عین حال استفاده از پیوند بافت چربی نیز در حال



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]

گسترش است، ولی یکی‌از مشکلات این روش در روش‌های درمان بالینی موجود عدم پایداری این روش در درازمدت است. بافت چربی پیوند شده به‌دنبال جذب بافتی ۹۰-۲۰٪ حجم خود را در طول زمان از دست می‌دهد. بهترین راه برای جلوگیری از این اتفاق، تقویت بافت پیوند شده با ایجاد عروق جدید است.[۲۱] Min در مدل حیوانی نشان داد که پیوند هم‌زمان بافت چربی و سلول‌های بنیادی کشت‌نشده مشتق از بافت چربی می‌تواند موجب طولانی‌شدن ماندگاری بافت گردد. در مقایسه با پیوند بافت چربی به‌تنهایی، پیوند بافت چربی به‌همراه سلول‌های بنیادی مشتق از چربی فشردگی مویرگ‌ها را نزدیک به شش برابر افزایش داده و ماندگاری بافت را تا ۹ ماه افزایش می‌دهد. ممکن است علت این یافته عامل رشد رگ‌زایی ترشح شده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی باشد.[۲۲] هر چند در این تحقیق به مقایسه قدرت تکثیری و تمایزی این سلول‌ها در بدن حیوان و یا انسان پرداخته نشد اما با توجه به نتایج ریخت‌شناسی، مطالعات فلوسایتومتری و تست‌های تمایزی به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بافت چربی انسان می‌تواند یکی‌از فراوان‌ترین و در عین حال در دسترس‌ترین منابع برای جدا-سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با درجه تشابه بالا به سلول‌های بنیادی مغز استخوان را فراهم آورد. این سلول‌ها با پتانسیل کاربردی در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی، فرصت جدیدی برای پیشرفت روش‌های ترمیم بافت نرم فراهم کرده‌اند.

*سپاسگزاری*: این مقاله حاصل طرح پژوهشی با کد ۱۳۰۷۱-۵۲-۰۱-۹۰ است و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردیده است.

## References


1. Nichol JW, Khademhosseini A. Modular Tissue Engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up. *Soft Matter* 2009;5(7):1312-9.
2. Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 2010;20:121-33.
3. Agrawal V, Johnson SA, Reing J, Zhang L, Tottey S, Wang G, et al. Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(8):3351-5.
4. Hellman KB. Tissue engineering: translating science to product. In: Ashammakhi N, Reis R, Chiellini F, editors. Topics in Tissue Engineering. Oulu, Finland: Expertissues e-books; 2008. p. 1-28.
5. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg* 2009;79(4):235-44.
6. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011;20 (8):1297-308.
7. Elahi M, Kabirsoleimani M, Shiravi A. Investigate the possibility of using enzymes to extract mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *J Med Res* 2011;4(35):200-80. [Persian]
8. Dubois SG, Floyd EZ, Zvonic S, Kilroy G, Wu X, Carling S, et al. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol Biol* 2008;449:69-79.
9. Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(4):413-26.
10. Friedenstein 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.
11. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004;113(12):1701-10.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
13. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
14. Duggal S, Brinchmann JE. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2011;226(11):2908-15.
15. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad Shastri V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(5):887-94.
16. Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol* 2011;226(3):843-51.
17. Lin L, Shen Q, Wei X, Hou Y, Xue T, Fu X, et al. Comparison of osteogenic potentials of BMP4 transduced stem cells from autologous bone marrow and fat tissue in a rabbit model of calvarial defects. *Calcif Tissue Int* 2009;85(1):55-65.
18. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234(1):1-9.
19. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010;5(7):1294-311.
20. Hsu VM, Stransky CA, Bucky LP, Percec I. Fat grafting's past, present, and future: why adipose tissue is emerging as a critical link to the advancement of regenerative medicine. *Aesthet Surg J* 2012;32 (7):892-9.
21. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med* 2011;11(57):160-70.
22. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg* 2010;64 (2):222-8.




[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]

TUMJ Tehran University Medical Journal, April 2014; Vol. 72, No. 1: 27-32 Original Article

# Isolation, amplification and identification of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue

Sanambar Sadighi M.D.[1]
Ahad Khoshzban M.D.[2]
Amir Hossein Tavakoli M.D.[3]
Ramin Khatib Semnani M.D.[4]
Zahra Sobhani M.D.[5]
Nayer Dadashpur Majidabad M.Sc.[6*]

*1- Department of Internal Medicine, Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*2- Department of Dental Materials, School of Dentistry, Tehran University, Tehran, Iran.*
*3- Tissue Bank and Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*4- Department of General Surgery, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
*5- Physician, Tissue Bank and Research Center, Tehran, Iran.*
*6- M.Sc., Cellular and Molecular Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[*] Corresponding author: Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98-412-7236078
E-mail: n_dadashpour@yahoo.com

## Abstract

Received: 01 Nov. 2013 Accepted: 15 Jan. 2014 Available online: 01 Mar. 2014

***Background:*** Currently, autologous and allogeneic adipose tissues represent a ubiquitous source of material for fat reconstructive therapies. However, these approaches are limited, and often accompanied by a 40-60% reduction in graft volume following transplantation, limited proliferative capacity of mature adipocytes for ex vivo expansion, and extensive adipocyte damage encountered when harvested with conventional liposuction techniques. Recently, cell-based approaches utilizing adipogenic progenitor cells for fat tissue engineering have been developed and were reported to promote both short-term in vivo adipogenesis and to repair defect sites. The aim of this study was to isolate stem cells from fat tissue than examine the growth of stem cells by invitro tests.

***Methods:*** For human adipose stem cell isolation (hASC), subcutaneous adipose tissue sites were obtained from female subjects undergoing elective procedures. Tissues were washed 3-4 times in phosphate buffered saline (PBS) and suspended in an equal volume of PBS supplemented with 1% FCS and 0.1% collagenase type I. The tissue was placed in an agitated water bath at 37 1C. The supernatant containing mature adipocytes, was aspirated. Portions of the SVF were suspended in DMEM medium. hASCs were selected based on their ability to adhere to tissue culture plastic and subsequently expanded to 75-90% confluence. Adipose stem cells were isolated and cultured on DMEM. To assess mesenchymal origin of stem cells we used flow-cytomery technique as well as differentiation to osteocyte and chondrocyte lines.

***Results:*** The nature of the mesenchymal cells was confirmed by flow -cytometry techniques, based on the expression of CD90, CD105, CD166, and lack of expression of hematopoietic markers of CD34, CD31, and CD45. The successful differentiation of our stem cells to osteocyte, chondrocyte had been showed by specific Alizarin-Red and Toluidine-blue staining of cells.

***Conclusion:*** Although we have not the results of in vivo tests to support in vivo adipogenesis either alone or in combination with natural or synthetic matrix, the results showed that stem cells isolation from adipose tissue was successful, and we provided an environment for differentiation of stem cells.

***Keywords:*** adipose tissue, cell differentiation, stem cells, tissue engineering.

[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09 ]