

NHẬN XÉT BƯỚC ĐẦU VỀ NUÔI CẤY TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ TỪ MỠ MỠ NGƯỜI TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Nguyễn Duy Thăng¹, Phan Thị Thùy Hoa¹, Chế Thị Cẩm Hà²,
Đồng Sĩ Sang¹, Trần Ngọc Vũ¹, Tôn Nữ Trà Mai¹, Huỳnh Phước Hạnh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá số lượng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người ở hai môi trường nuôi cấy khác nhau.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Mẫu mô mỡ người.

Kết quả: Sau 20 ngày nuôi cấy tế bào, số lượng tế bào thu được $4,5 \times 10^5$ tế bào/ml ở môi trường 1 và hiệu quả phát triển tế bào đạt 85,5%. Ở môi trường 2, số lượng tế bào thu được là $2,2 \times 10^5$ tế bào/ml và hiệu quả phát triển tế bào đạt 70,7%.

Kết luận: Tế bào được nuôi cấy trên môi trường DMEM/F12, 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic thu được số lượng tế bào đơn nhân cao nhất $(4,5 \pm 0,4) \times 10^5$ tế bào/ml và hiệu quả phát triển tế bào đạt trên 85,5%.

Từ khóa: Tế bào gốc trung mô từ mỡ, enzyme collagenase, glucose, nuôi cấy, biệt hoá.

ABSTRACT

STUDY ON CULTURE OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE AT HUE CENTRAL HOPITAL

Nguyen Duy Thang¹, Phan Thi Thuy Hoa¹, Che Thi Cam Ha²,
Dong Si Sang¹, Tran Ngoc Vu¹, Ton Nu Tra Mai¹, Huynh Phuoc Hanh¹

Objective: Determinating the MSC counts after culturing cells from two different culture environments.

Research methods: A sample from human adipose tissue.

Results: After 20 days of culturing cells, MSC counts are 4.5×10^5 cells/ml on the environment 1 and 85.5% cell growth efficiency. MSC counts on the environment 2 are 2.2×10^5 cells/ml and 70.7% cell growth efficiency.

Conclusion: The cells cultured on the enviroment DMEM/F12, 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic have the highest mononuclear cell count: $(4.5 \pm 0.4) \times 10^5$ cells/ml and 85.5% cell growth efficiency.

Key words: Adipose-derived mesenchymal stem cells, enzyme collagenase, glucose, in vitro, differentiate.

“Đây là kết quả của đề tài KHCN cấp Tỉnh được Ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư”. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ này!

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc trung mô (MSC) là quần thể tế bào có đặc tính tự làm mới và biệt hoá đa dạng trong môi trường thích hợp, MSC có thể thu nhận từ rất nhiều

nguồn khác nhau, trong đó các nguồn thu nhận phổ biến là ở tủy xương, dây rốn. Mô mỡ là nguồn MSC có mặt ở khắp mọi nơi và có một số lợi thế so với các nguồn tế bào gốc khác, có thể thu nhận với số

1. Bệnh viện TW Huế

2. Trường Đại học Khoa học Huế

- Ngày nhận bài (Received): 25/11/2018; Ngày phản biện (Revised): 3/12/2018;

- Ngày đăng bài (Accepted): 25/12/2018

- Người phản hồi (Corresponding author): Phan Thị Thùy Hoa

- Email: drhoavn@gmail.com; ĐT: 0905 997 687

lượng lớn, ít xâm hại cơ thể, có tính mềm dẻo cao và khả năng biệt hoá thành tế bào mỡ, tế bào xương, tế bào cơ, tế bào gan, tế bào thần kinh và các tế bào nội mô và biểu mô .

Hiệu quả của MSC từ mô mỡ đã được chứng minh trong liệu pháp tế bào và y học tái tạo như tái tạo cơ tim, da, gan, tụy, xương, sụn, ... Nhiều công trình nghiên cứu về nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc trung mô *in vitro* cho thấy số lượng MSC trong mỗi liệu trình ghép tế bào gốc là 10^9 tế bào/kg thể trọng. Qua những nghiên cứu về nuôi cấy tế bào, nhiều nhà khoa học đã khẳng định rằng giảm nồng độ FBS trong môi trường nuôi cấy sẽ giúp MSC tăng cường thể hiện các đặc tính cần thiết sau cấy ghép và tránh được sự thải loại khi ghép tế bào với số lượng lớn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thăm dò nuôi cấy tế bào ở hai môi trường: (1) Môi trường 1 là DMEM/F12, 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic, (2) Môi trường 2 là DMEM/F12, 9% FBS, 1% glucose, 1% antibiotic/antimycotic

Mục tiêu của đề tài: Đánh giá số lượng tế bào gốc trung mô từ mô mỡ người ở hai môi trường nuôi cấy khác nhau.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

5 ml dịch mỡ bụng của một bệnh nhân nữ, 50 tuổi, sau phẫu thuật bảo tồn vú tại Bệnh viện Trung ương Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm

2.2.2. Hoá chất - Dụng cụ

Trypsin-EDTA 0,25%, huyết thanh thai bò (FBS) (Sigma-Aldrich), antibiotic/antimycotic 1%, Trypan Blue 0,4%, PBS, glucose, DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies), collagenase B (Roche), ethanol 96% (W.S.P), formaldehyde 36% (Edenlabo), eosin 2% (Theralab), Giemsa May-Grunwald (Cypress Diagnostics), Oil red-O 0,5% , màng lọc 70µm (Biologix).

2.2.3. Quy trình nghiên cứu

- Hút 5 ml dịch mỡ bụng, quy trình được thực hiện tại khoa Gây mê Hồi sức.

- Thủy phân mô mỡ bằng enzyme collagenase và phân lập tế bào đơn nhân: Tiến hành ủ 5ml mỡ hút đã xử lý với 5mg collagenase/5ml PBS trong vòng 30 phút trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C, khuấy nhẹ liên tục sau 10 phút. Lọc bằng màng lọc 70µm. Dịch được lọc cho vào ống falcon 15ml, ly tâm 800 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch nổi, cho thêm 2 ml PBS, ly tâm lần 2 với 800 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ dịch nổi và cho vào 2ml DMEM/F12, 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic .

Xác định tế bào sống bằng cách nhuộm Trypan Blue 0,4%, tế bào chết bắt màu xanh dương.

- Nuôi cấy sơ cấp và thứ cấp

Tế bào được cho các bình nuôi với mật độ nuôi 50.000 tế bào/cm², thêm môi trường vừa đủ 3ml và nuôi ở 37°C trong 24h. Tiến hành nuôi cấy sơ cấp và cấy chuyển tăng sinh trong hai môi trường nuôi cấy khác nhau, so sánh hiệu quả phát triển tế bào trên hai môi trường nuôi cấy này.

- Xác định đặc tính tế bào sau nuôi cấy

Kiểm tra đặc tính tế bào bằng cách biệt hóa thành tế bào mỡ. MSCs được nuôi trong môi trường DMEM/F12, 10% FBS có bổ sung các tác nhân biệt hóa thành tế bào tạo mỡ: 0,5 mM IBMX, 50 µM Indomethacin và 0,5 µM Dexamethasone . Sau khoảng 1 - 2 tuần nuôi cấy trong môi trường biệt hóa, tế bào được cố định bằng Formandehyde 10% trong 30 phút và nhuộm với thuốc nhuộm Oil red-O 0,5% ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng. Oil red-O là thuốc nhuộm lipid, khi nhuộm mẫu tế bào cố định, bất kỳ nơi nào có chứa các giọt mỡ, Oil Red-O sẽ hòa tan vào trong đó và làm chúng có màu đỏ.

2.3. Xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê y học, phần mềm Microsoft Excel 2010

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân lập tế bào đơn nhân

Bệnh viện Trung ương Huế

Sau khi lọc và ly tâm, tiến hành đếm số lượng tế bào trên buồng đếm Neubauer, chúng tôi nhận thấy tuy vẫn còn sự hiện diện một ít tế bào tạp: hồng cầu, bạch cầu, mỡ, nhưng xuất hiện nhiều tế bào đơn nhân màu trắng, hình tròn hoặc oval, có kích thước trung bình và gần bằng nhau, không bắt màu với Trypan blue. Số lượng tế bào chết (bắt màu xanh tím) là rất ít, chỉ quan sát thấy một vài tế bào/vi trường.

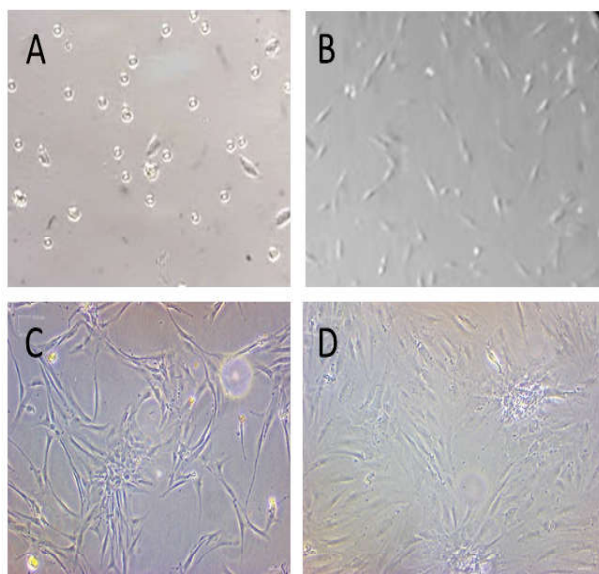
Số lượng tế bào đơn nhân sống đếm được là $7,2 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ tế bào/ml.

3.2. Kết quả nuôi cấy sơ cấp (chọn lọc MSC)

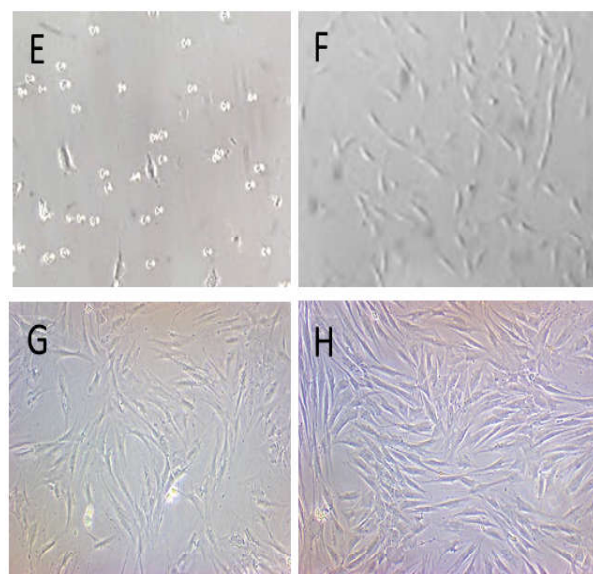
Các tế bào đơn nhân sau khi thu nhận được nuôi cấy trong hai môi trường:

- Môi trường 1: DMEM/F12, 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic
- Môi trường 2: DMEM/F12, 9% FBS, 1% glucose, 1% antibiotic/antimycotic

Môi trường 1



Môi trường 2



Hình 3.1. Kết quả nuôi cấy sơ cấp

- A, E. Sau 24 giờ nuôi cấy, MSCs bắt đầu bám dính vào bề mặt bình nuôi;
B, F. Sau 3 ngày nuôi cấy, MSCs trải dạng hình tam giác, hình sao hoặc đa giác.
C, G. Sau 7 ngày nuôi cấy, hầu hết MSCs có dạng hình thoi đặc trưng và tăng sinh
D, H. Sau 12 ngày nuôi cấy, MSCs đạt mật độ cấy chuyển (70 - 80%)

Có sự khác nhau về tốc độ tăng trưởng và hiệu quả phát triển tế bào trong nuôi cấy sơ cấp ở hai môi trường nuôi cấy (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Số lượng và hiệu quả phát triển tế bào trong nuôi cấy sơ cấp ở hai môi trường nuôi cấy khác nhau

Các tiêu chí đánh giá	Môi trường 1	Môi trường 2
Tỉ lệ tế bào bám sau 24h nuôi cấy (%)	72,1 ± 2,6	75,4 ± 1,1
Tỉ lệ tế bào trải sau 24h nuôi cấy (%)	2,3 ± 0,9	5,2 ± 1,3
Tỉ lệ tế bào trải sau 3 ngày nuôi cấy (%)	30,5 ± 1,7	32,3 ± 2,3
Tỉ lệ tế bào trải sau 5 ngày nuôi cấy (%)	58,6 ± 2,9	40,7 ± 3,3
Ngày đạt mật độ cấy chuyển (ngày)	11	12
Hiệu quả phát triển (%)	84,3 ± 3,1	76,7 ± 1,2
Số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy sơ cấp (tế bào/ml)	3,7 x 10 ⁵ ± 0,2 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵ ± 0,1 x 10 ⁵

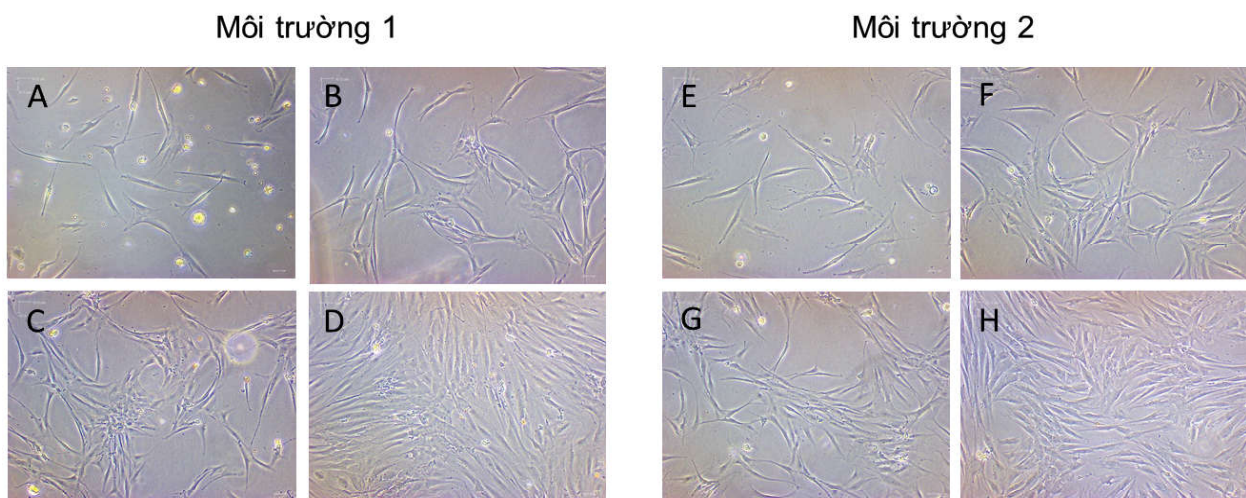
Sau 12 ngày nuôi cấy sơ cấp, tế bào phát triển ở cả hai môi trường đều đạt trên 70%. Cụ thể số lượng và hiệu quả phát triển tế bào trong nuôi cấy sơ cấp có sự khác biệt thống kê giữa hai môi trường: (1) ở môi trường 1, số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy đạt $3,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ tế bào/ml, hiệu quả phát triển tế bào đạt $84,3 \pm 3,1\%$; (2) ở môi trường 2, số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy đạt $1,8 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ tế bào/ml, hiệu quả phát triển tế bào đạt $76,7 \pm 1,2\%$. Tế bào nuôi cấy ở môi trường 1 cho kết quả cao hơn môi trường 2.

3.3. Kết quả nuôi cấy thứ cấp (cấy chuyển tăng sinh)

Khi bề mặt bình nuôi không còn diện tích để các tế bào phát triển, cần thiết cấy chuyển để cung cấp không gian và dinh dưỡng cho tế bào phát triển. Cấy chuyển là thao tác để thu nhận các MSC tương đối đồng nhất.

Khi vừa được cấy chuyển, MSC vẫn còn dạng tròn và trôi lơ lửng trong môi trường. Các tế bào chưa bám vào giá thể nuôi cấy, chúng bị co lại do tác động cắt các cầu nối liên bào của enzyme trypsin/EDTA 0,25%.

Sau 24 giờ nuôi cấy, MSC bắt đầu bám dính và trải dạng hình thoi đặc trưng và tăng sinh. Sau 4 - 5 ngày, MSC hợp dòng, trải đều trên bề mặt bình nuôi và tiếp tục tăng sinh mạnh.



Hình 3.2. Kết quả cấy chuyển tăng sinh

Bệnh viện Trung ương Huế

- A, E. MSCs bám và trải sau 24 giờ cấy chuyên;
- B, F. MSCs tăng sinh sau 3 ngày cấy chuyên;
- C, G. MSCs tăng sinh mạnh sau 5 ngày cấy chuyên;
- D, H. MSCs đạt mật độ 70 - 80%

Tương tự như quá trình nuôi cấy sơ cấp, có sự khác nhau về số lượng và hiệu quả phát triển tế bào trong nuôi cấy thứ cấp ở hai môi trường nuôi cấy khác nhau (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Số lượng và hiệu quả phát triển tế bào trong nuôi cấy thứ cấp ở hai môi trường nuôi cấy khác nhau

Các tiêu chí đánh giá	Môi trường 1	Môi trường 2
Tỉ lệ tế bào trải sau 3 ngày cấy chuyên lần 1 (%)	40,5 ± 4,9	33,1 ± 4,3
Tỉ lệ tế bào trải sau 5 ngày cấy chuyên lần 1 (%)	65,6 ± 2,9	60,1 ± 3,3
Ngày đạt mật độ cấy chuyên lần 2 (ngày)	7	8
Hiệu quả phát triển (%)	85,5 ± 3,8	70,7 ± 2,9
Số lượng CFU-F ngày cuối cùng (cụm)	52 ± 3,3	35 ± 2,2
Số lượng tế bào thu được sau cấy chuyên lần 1 (tế bào/ml)	4,5 x 10 ⁵ ± 0,4 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵ ± 0,1 x 10 ⁵

Sau 8 ngày nuôi cấy thứ cấp, ở môi trường 1 số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy đạt $4,5 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$ tế bào/ml, hiệu quả phát triển tế bào đạt 85,5 ± 3,8%. Ở môi trường 2, số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy đạt $2,1 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$ tế bào/ml, hiệu quả phát triển tế bào đạt 70,7 ± 2,9%.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Al-Nbaheen (2013) và nhiều nghiên cứu khác.

Sau 20 ngày nuôi cấy sơ cấp và thứ cấp cho thấy nồng độ FBS trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự tăng sinh và phát triển của tế bào. Kết quả có sự khác biệt thống kê giữa hai môi trường: số lượng tế bào thu được sau nuôi cấy ở môi trường 1 (10% FBS) cao gấp hai lần môi trường 2 (9% FBS, 1% glucose). Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi kết luận rằng môi trường 1 là môi trường nuôi cấy tối ưu.

FBS rất cần thiết cho việc nuôi cấy tế bào động vật, nó cung cấp các chất dinh dưỡng, các nhân tố tăng trưởng, các nhân tố bám dính giúp tế bào bám nhanh vào bề mặt nuôi cấy, tế bào tăng sinh và duy trì tiềm năng biệt hóa. Vì vậy, khi giảm nồng độ FBS sẽ ảnh hưởng đến khả năng bám dính và phát

triển của tế bào. Tuy nhiên, khi ghép tế bào với số lượng lớn, sự thải loại có thể xảy ra nên cần giảm đi các yếu tố khác loài trong quá trình nuôi cấy tế bào. Vì những lý do đó, mà nhiều nhà nghiên cứu đã xây dựng môi trường nuôi cấy tế bào động vật không dùng huyết thanh hay dùng với liều thấp.

Nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nuôi cấy tế bào trong môi trường có bổ sung 10% FBS, đây là nồng độ đã được chứng minh là tối ưu trong nhiều nghiên cứu trước đây. Đồng thời, với mục đích giảm nồng độ huyết thanh trong nuôi cấy, chúng tôi tiến hành nuôi cấy thử nghiệm trong môi trường có bổ sung 9% FBS, 1% glucose. Kết quả sau nuôi cấy sơ cấp và thứ cấp cho thấy tế bào nuôi cấy trong môi trường 10% FBS có kết quả tốt hơn môi trường giảm nồng độ FBS. Theo chúng tôi, glucose chỉ có tác dụng cung cấp năng lượng cho tế bào, đã hỗ trợ cho tốc độ bám và trải của tế bào trong một vài ngày đầu của quá trình nuôi cấy sơ cấp, nhưng việc giảm nồng độ FBS đã làm chậm tốc độ tăng sinh và sự phát triển của tế bào trong suốt quá trình nuôi cấy tiếp theo. Thêm vào đó, trong nghiên cứu này nguồn glucose được sử dụng không phải là glucose chuyên

cho nuôi cấy tế bào gốc có thể có ảnh hưởng đến kết quả sau nuôi cấy.

Những sai khác về số lượng MSC thu được giữa các nghiên cứu khác nhau phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: mẫu mô mỡ, nguồn enzyme, tình trạng sức khỏe của người hiến, thao tác và điều kiện nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả, như Banas (2007), đạt $7,7 \times 10^6$ tế bào/5g mỡ và Zhang (2011), đạt 1×10^6 tế bào/g mỡ. Tuy nhiên, kết quả chúng tôi thu được khi nuôi cấy MSC từ mô mỡ đạt $4,5 \times 10^5$ tế bào/ml là cao hơn so với các nguồn thu nhận MSC khác như tủy xương.

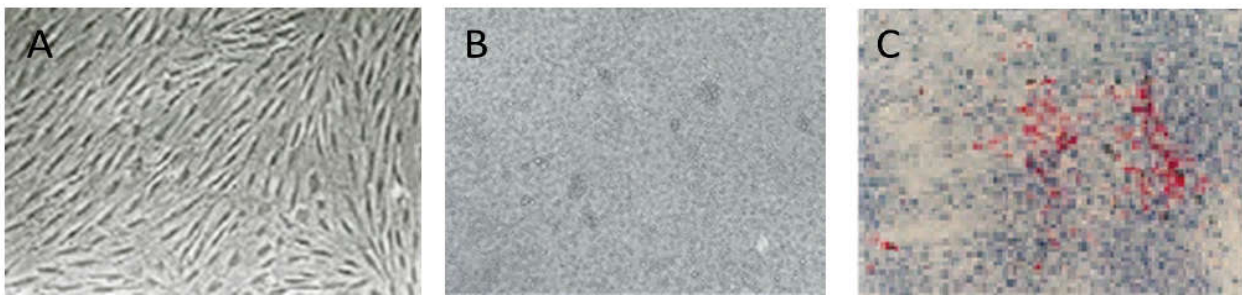
3.4. Đánh giá khả năng biệt hóa MSC (biệt hóa MSC thành tế bào tạo mỡ)

Sau 24 giờ khi các tế bào đã bám, tiến hành bổ sung các chất cảm ứng biệt hóa vào môi trường nuôi cấy.

Theo dõi tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược từ 24 giờ đến 2 tuần, chúng tôi nhận thấy có sự thay đổi hình dạng của tế bào khi nuôi trong môi trường biệt hóa: tế bào từ dạng thon dài dần dần co tròn lại. Sau 4 - 5 ngày nuôi cấy, xuất hiện các giọt mỡ nhỏ tích tụ trong tế bào chất, các giọt mỡ này góp lại dần dần thành giọt mỡ lớn và chiếm gần hết thể tích tế bào.

Dưới kính hiển vi, các giọt mỡ tròn phản chiếu ánh sáng. Khi nhuộm với thuốc nhuộm Oil Red-O, chúng bắt màu đỏ. Tiến hành nhuộm ở ngày thứ 10 sau khi nuôi trong môi trường biệt hóa.

Khi so sánh với MSCs đối chứng (nuôi trong môi trường DMEM/F12, 10% FBS và không có chất cảm ứng biệt hóa), các tế bào không thay đổi hình dạng và không bắt màu thuốc nhuộm Oil Red-O.



Hình 3.3. Kết quả biệt hoá MSCs

A. MSCs không cảm ứng biệt hóa (đối chứng); B. MSCs cảm ứng biệt hóa trước khi nhuộm;
C. MSCs sau khi nhuộm Oil Red-O

IV. KẾT LUẬN

- Sau 20 ngày nuôi cấy tế bào, số lượng tế bào thu được $4,5 \times 10^5$ tế bào/ml ở môi trường 1 và hiệu quả phát triển tế bào đạt 85,5%. Ở môi trường 2, số

lượng tế bào thu được là $2,2 \times 10^5$ tế bào/ml và hiệu quả phát triển tế bào đạt 70,7%.

- Bước đầu kết luận môi trường 1 (10% FBS) là môi trường nuôi cấy tối ưu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Nbaheen M. (2013), "Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential", *Stem cell reviews*. 9(1), p. 32.
2. Baer P.C. and Geiger H. (2012), "Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity", *Stem cells international*. 2012.
3. Banas A., et al. (2007), "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes", *Hepatology*. 46(1), pp. 219-228.
4. Bunnell B.A., et al. (2008), "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation", *Methods*. 45(2), pp. 115-120.
5. Dominici M., et al. (2009), "Heterogeneity of

- multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa”, *Transplantation*. 87(9S), pp. S36-S42.
6. Frese L., Dijkman P.E., and Hoerstrup S.P. (2016), “Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine”, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 43(4), pp. 268-274.
 7. Hendijani F. (2017), “Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues”, *Cell Proliferation*.
 8. Kershaw E.E. and Flier J.S. (2004), “Adipose tissue as an endocrine organ”, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(6), pp. 2548-2556.
 9. Kim N. and Cho S.-G. (2013), “Clinical applications of mesenchymal stem cells”, *The Korean journal of internal medicine*. 28(4), pp. 387-402.
 10. Lyahyai J., et al. (2012), “Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood”, *BMC veterinary research*. 8(1), pp. 169.
 11. Mallam E., et al. (2010), “Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis”, *Multiple Sclerosis*.
 12. Mohammadi-Sangcheshmeh A., et al. (2013), “Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (*Camelus dromedarius*)”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 49(2), pp. 147-154.
 13. Rada T., Reis R.L., and Gomes M.E. (2011), “Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential”, *Stem Cell Reviews and Reports*. 7(1), pp. 64-76.
 14. Yang X.-F., et al. (2011), “High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells”, *Journal of biomedical science*. 18(1), pp. 59.
 15. Zou Z., et al. (2010), “More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body”, *Expert opinion on biological therapy*. 10(2), pp. 215-230.
 16. Zuk P.A., et al. (2002), “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells”, *Molecular biology of the cell*. 13(12), pp. 4279-4295.