

## Comparison between Orbital Fat-derived Stem Cells and Bone Marrow-derived Mesenchymal and Adipose-derived Stem Cells in Human

Baradaran-Rafii AR, MD<sup>1</sup>; Rezaei-Tavirani M, PhD<sup>2</sup>; Heidari-Keshel S, PhD<sup>2\*</sup>; Roshandel D, MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; <sup>2</sup>Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding Author: Saeedhey@gmail.com

**Purpose:** To separate and characterize orbital fat-derived stem cells (OFSCs) and compare its cellular and molecular properties with those of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and adipose-derived stem cells (ASCs).

**Methods:** Stem cells from orbital fat, abdominal fat and bone marrow aspirates have been isolated. We assessed stem cell specific cell surface markers using cytometry, osteoblast and adipocyte differentiation potential using special stains, and cellular proliferation rate using MTT test and expression of pluripotency genes by Real-Time polymerase chain reaction (PCR). We also assayed wound healing using a scratch test and expression of corneal epithelial specific cell markers using an air lifting test.

**Results:** Results of flow cytometry showed that OFSCs were positive for CD105, CD90, CD44, CD166 and CD73 and negative for CD34, CD45, CD31 and CD133, similar to MSCs and ASCs. Differentiation to osteoblast and adipocyte was observed in all groups. OFSCs healed more rapidly as compared to MSCs and ASCs. Only OFSCs expressed epithelial markers KRT3, KRT12 and Connexin43 after air lifting.

**Conclusion:** Orbital fat-derived stem cells had a high capability of proliferation and differentiation. Given the possibility of expression of epithelial markers and the potential of regeneration as well as its close location to the eye, these cells can be considered for cell therapy to treat persistent corneal epithelial defects.

**Keywords:** Adipose-derived Stem Cell, Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell, Orbital Fat-derived Stem Cell

• Bina J Ophthalmol 2015; 21 (1): 16-26.

Received: 10 January 2015

Accepted: 7 June 2015

### بررسی مقایسه‌ای سلول‌های بنیادی چربی اربیت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی چربی شکمی در انسان

دکتر علیرضا برادران رفیعی<sup>۱</sup>، دکتر مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۲</sup>، دکتر سعید حیدری کشل<sup>۲</sup>، دکتر دانیال روشندل<sup>۲</sup>

**هدف:** کشت و بررسی ماهیت سلولی و مولکولی سلول‌های بنیادی چربی اربیت و مقایسه آن با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی چربی شکمی.

**روش پژوهش:** جداسازی سلول‌های بنیادی از چربی اربیت، چربی شکمی و آسپیره مغز استخوان انجام پذیرفت. آنالیز فلوسیتومتری برای مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی، بررسی توانمندی تمایزی آن‌ها به رده‌های سلولی استئوبلاست و آدیپوسیت، بررسی میزان تکثیر آن‌ها با استفاده از تست MTT و ارزیابی میزان بیان ژن‌های پلوریپوتنسی با استفاده از Real-Time PCR صورت گرفت. ارزیابی قابلیت ترمیم نیز با آزمون‌های آزمایشگاهی ترمیم و توانایی بیان مارکرهای اپی‌تلیالی نیز با آزمایش‌های هم‌جوارسازی با هوا انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج فلوسیتومتری نشان داد که مارکرهای CD105، CD90، CD73، CD44، CD166 در سلول‌های بنیادی اربیت (OFSCs) همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان (MSCs) و چربی شکمی (ASCs) دارای بیان مثبت و مارکرهای CD133،

CD۳۴، CD۴۵، CD۳۱ منفی بودند. تمایز به رده‌های سلولی آدیپوسیت و استئوبلاست در هر سه گروه دیده شد. در نتایج ترمیم آزمایشگاهی، سلول‌های OFSC در مقایسه با دو گروه دیگر با سرعت بالاتری ترمیم شدند. پس از هم‌جواری با هوا، فقط در گروه OFSC مارکرهای اپی‌تلیال KRT۳، KRT۱۲ و کانکسین ۴۳ مثبت بودند.

**نتیجه‌گیری:** سلول‌های بنیادی چربی اربیت با منشاء اکتودرم توانایی بالایی در تکثیر و تمایز دارند. با توجه به امکان بیان مارکرهای اپی‌تلیالی و پتانسیل ترمیمی مناسب و هم‌چنین موضع قرارگیری آن در مجاورت چشم، شاید بتوان از این سلول‌ها در ترمیم نقائص پایدار اپی‌تلیوم قرنیه استفاده نمود.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۴؛ دوره ۲۱، شماره ۱: ۱۶-۲۶.

• پاسخ‌گو: دکتر سعید حیدری کشل (e-mail: saeedhey@gmail.com)

دریافت مقاله: ۲۰ دی ۱۳۹۳

تایید مقاله: ۱۷ خرداد ۱۳۹۴

۱- استاد- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۲- استاد- دکترای بیوفیزیک- مرکز تحقیقات پروتئومیکس- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۳- استادیار- دکترای پروتئومیکس کاربردی- مرکز تحقیقات پروتئومیکس- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۴- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

#### مقدمه

نقص پایدار اپی‌تلیوم قرنیه ( Persistent Corneal Epithelial Defect) یک عارضه به نسبت شایع در چشم‌پزشکی است که درمان آن در برخی موارد بسیار مشکل بوده و ممکن است به اعمال جراحی متعدد نیاز گردد. این عارضه به دلایل متعددی از جمله کمبود سلول‌های بنیادی لیمبوس ایجاد می‌شود<sup>۱،۲</sup>. اگر چه درمان استاندارد کمبود سلول بنیادی لیمبوس، پیوند سلول بنیادی به روش جراحی است، درمان‌های غیرتهاجمی‌تر مانند استفاده از قطره‌ها، پمادها و ژل‌های لوبریکانت، قطره سرم اتولوگ، قطره حاصل از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)، بلفارورافی، تارسورافی، بستن چشم‌ها، پیوند پرده آمیوتیک، اپی‌تلیکتومی قرنیه و غیره در مراحل اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرند<sup>۳،۴</sup>. به تازگی با توجه به ویژگی‌های سلول‌های بنیادی حاصل شده از چربی اربیت، استفاده از قطره حاصل از آن در ترمیم نقص اپی‌تلیوم قرنیه در مدل حیوانی موفقیت‌آمیز بوده است<sup>۵</sup>.

استفاده از سلول‌های بنیادی در دهه‌های اخیر، نتایج امیدوارکننده‌ای در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج به همراه داشته است. در چشم‌پزشکی، استفاده از سلول‌های بنیادی به منظور جایگزینی سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس و اپی‌تلیوم قرنیه، اندوتلیوم قرنیه و سلول‌های اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکه مطرح شده است<sup>۶-۸</sup>. در بالغین، سلول‌های بنیادی را می‌توان از مغز استخوان یا بافت چربی به دست آورد که هر دو از منشا مزانشیمال بوده و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی به نسبت مشابهی دارند<sup>۹</sup>. فراوانی، در دسترس بودن و سهولت جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی و هم‌چنین توان تمایز و تکثیر بالای این سلول‌ها

موجب شده تا این بافت به عنوان یک منبع مهم جهت استحصال سلول‌های بنیادی شناخته شود<sup>۱</sup>.

بر خلاف بسیاری از بافت‌های چربی بدن که به طور عمده منشا مزانشیمی دارند، چربی اربیت از منشا ستیغ عصبی بوده و سلول‌های بنیادی حاصل از آن قابلیت تبدیل به سلول‌های دارای منشا اکتودرمی را دارند<sup>۱۱</sup>. این سلول‌ها را می‌توان از چربی اضافی که در زمان انجام عمل بلفاروپلاستی به دست می‌آید، جدا کرد<sup>۱۲</sup>. در مطالعات ملکولی نشان داده شده که مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی چربی اربیت شباهت فراوانی با سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارند و می‌توانند به بافت‌های غضروفی، استخوانی و چربی تبدیل شوند<sup>۱۳،۱۴</sup>. هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که این سلول‌ها می‌توانند در مجاورت سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه انسانی، به سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه تمایز پیدا کنند<sup>۹</sup>. از طرفی، نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی چربی اربیت فاقد ایمونوزیستی بوده و پیوند غیر خودی (زوترانسپلانت) آن‌ها به خوبی تحمل می‌شود<sup>۱۵</sup>.

با توجه به در دسترس بودن بافت چربی اربیت و آسانی جداسازی سلول‌های بنیادی آن و هم‌چنین قابلیت تبدیل این سلول‌ها به اپی‌تلیوم قرنیه و عدم تحریک دستگاه ایمنی گیرنده در پیوند زونگرافت، این بافت منبع مناسبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی به منظور سلول درمانی نقائص پایدار اپی‌تلیوم قرنیه به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه، بومی‌سازی جداکردن و شناسایی سلول‌های بنیادی چربی اربیت و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی و توان تکثیر و تمایز این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های بنیادی حاصل از چربی شکمی و مغز استخوان بود.

## روش پژوهش

### بافت چربی اربیت

بافت چربی مورد استفاده در تحقیق حاضر از جراحی بلفاروبلاستی پلک فوقانی پنج خانم با دامنه سنی  $37 \pm 6$  سال پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه به دست آمد. نمونه‌های بافتی درون محیط انتقال حاوی HEPES، FBS، نیم درصد، پنی‌سیلین و استرپتومایسین در ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شدند. این مطالعه با رعایت اخلاق پزشکی و مطابق اصول هلسینکی از نمونه‌هایی که معمولاً طی بلفاروبلاستی دور ریخته می‌شود، انجام پذیرفت.

### جداسازی سلول‌های بنیادی چربی اربیت و چربی ناحیه شکمی

جداسازی سلول‌های بنیادی چربی اربیت و چربی شکمی از بافت‌های تازه صورت گرفت. ابتدا بافت‌ها با استفاده از اسکالپل و قیچی جراحی به قطعات ۲ میلی‌متر مربع در شرایط استریل بریده شدند، سپس با محلول شستشو حاوی PBS به همراه پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین B، برای ۳ بار به مدت ۵ دقیقه مورد شستشو قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ در دور ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه، قطعات بافتی درون کلاژناز به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. پس از هضم آنزیمی، مخلوط سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفیوژ شده و از خلال فیلترهای  $70 \mu\text{m}$  و  $40 \mu\text{m}$  عبور داده شد و در نهایت درون محیط کشت حاوی 10% DMEM/F12، 10% FBS، PEN/STRP در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> پنج درصد و ۹۸ درصد رطوبت آنکوبه شد. پس از گذشت چهار روز اولین تعویض محیط انجام شد.

### جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از نمونه خون مغز استخوان

پس از اخذ رضایت آگاهانه از اهداکنندگان سالم (تعداد ۳ نمونه، سن اهدا کنندگان  $23 \pm 6$ ) سال، نمونه خون مغز استخوان (بخش پیوند مغز استخوان، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) که حجمی حدود ۳ تا ۵ میلی‌لیتر داشت به نسبت ۱:۱ با بافر هنکس رقیق شد. سپس با نسبتی حدود ۱:۲ تا ۱:۳ (فایکول: خون مغز استخوان) روی فایکول با غلظت ۱/۰۷۷ برده شد. مقدار ۳ تا ۴ میلی‌لیتر از محلول فایکول در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و پس از اضافه نمودن سوسپانسیون سلولی به آن، سانتریفیوژ به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۴۰۰g صورت گرفت. بدین ترتیب محتویات لوله فالکون به چهار

قسمت مجزا تقسیم شد که از پایین به بالا عبارت بودند از گلبول‌های قرمز، فایکول، لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای و پلاسما. با برداشت لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای، سلول‌ها به حالت سوسپانسیون در آورده شده و از نمونه خون مغز استخوان جدا شدند.

### برداشت سلول‌های بنیادی از فلاسک

برای جداسازی سلول‌های بنیادی از کف فلاسک به منظور پاساژ سلولی، ابتدا سلول‌ها به طور کامل از محیط کشت برداشته شده و با استفاده از محلول PBS حاوی EDTA شستشو داده شدند. سپس آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد حاوی EDTA ۰/۲ میلی مولار به فلاسک اضافه شده و به مدت ۹۰ ثانیه در انکوباتور قرار داده شد. بعد از آن محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS به آن افزوده و بعد از پی‌پتاژ، سوسپانسیون سلولی به یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از آن مایع سطحی دور ریخته شده و رسوب حاصل برای کشت مجدد بین ۳ فلاسک تقسیم گردید.

### تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها و ارزیابی سرعت تکثیر

۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد) مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط با استفاده از لام نئوبار در خانه‌های مربوط به شمارش گلبول سفید، شمارش شد. رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های مرده نفوذ کرده و آن‌ها را آبی‌رنگ می‌کند اما سلول‌های زنده بی‌رنگ می‌باشند. درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از فرمول تعداد سلول‌های زنده تقسیم بر مجموع تعداد سلول‌های زنده و مرده، ضربدر ۱۰۰ حاصل شد.

به منظور ارزیابی تعداد سلول‌های تکثیر یافته در یک بازه زمانی مشخص از تست MTT (-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3-(2,5 diphenyl tetrazolium bromide) استفاده شد که طی آن ابتدا تعداد ۳۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سلول‌های بنیادی OFSC، ASC و MSC در پاساژ ۲، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، پس از اضافه شدن MTT (Sigma، Germany) به مدت سه ساعت آنکوبه و پس از خارج نمودن مایع سطحی هر چاهک و اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO در طول موج ۵۷۲ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. دانسیته نوری (OD) مربوط به هر گروه سلولی با رعایت ۳ تکرار در زمان‌های ذکر شده ثبت و مورد تحلیل قرار گرفت.

### تحلیل فلوسیتومتری برای سلول‌های بنیادی چربی اربیت، چربی شکمی و مزانشیمی مغز استخوان:

ابتدا سلول‌های بنیادی، تریپسینه شده و مورد شمارش سلولی قرار گرفتند. در هر لوله، تعداد  $10^5$  تا  $10^6$  سلول به مدت ۱ ساعت درون آنکوباتور و روی Rocker Rotator قرار داده شد. سپس سلول‌ها در دور  $1000\text{rpm}$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و به رسوب سلولی حاصله، سرم انسانی ۳ درصد اضافه و مخلوط حاصل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن دوباره سلول‌ها در دور  $1000\text{rpm}$  و به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شده و به رسوب سلولی حاصل PBS اضافه گردید. مخلوط سلولی از فیلتر (Nylon mesh) عبور داده شد و به هر لوله مقدار  $100\ \mu\text{L}$  میکرولیتر از آن اضافه گردید. تعداد  $10^6$ - $10^5$  سلول در  $100\ \mu\text{L}$  از PBS به همراه آنتی‌بادی‌های Anti-CD $34$ ، Anti-CD $90$ ، Anti-CD $105$  و Anti-CD $133$  به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دراز نور نگه‌داری شد. پس از شستشو، سلول‌ها در  $100\ \mu\text{L}$  محلول ۱ درصد پارافرم آلدیید قرار گرفتند و آزمایش فلوسیتومتری روی آن‌ها انجام گردید. نمونه‌ها با دستگاه فلوسیتومتری (Becton Dickenson) و نرم‌افزار Flowing software 2-5-1 آنالیز شدند. آنالیز آماری آنتی‌ژن‌های سطح سلول با استفاده از نرم‌افزار تحلیل داده‌های آماری SPSS ویرایش ۱۶، آزمون One Way ANOVA و به صورت (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) بررسی گردید. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel 2007 انجام گرفت. مقادیر  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های چربی و استخوان

به منظور اثبات توانایی تمایز، سلول‌ها به دودمان تخصصی تمایز داده شدند. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید سه‌فسفات (Sigma; USA) و ۱۰ نانومولار دگزامتازون، (Sigma; USA) ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات (Sigma, USA) و محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳-فسفات (Sigma; USA) و ۵۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma; USA)، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) بود. سلول‌های بنیادی به مدت ۲۱ روز درون محیط تمایزی اختصاصی قرار گرفتند و برای اثبات تمایز به بافت استخوان و چربی به ترتیب از رنگ‌آمیزی Oil red-O و Alizarin red استفاده شد.

### ارزیابی کاربویاپ سلول‌های بنیادی چربی اربیت

ابتدا سلول‌ها برای مدت ۴-۳ ساعت با  $0.1\ \mu\text{g/ml}$  کولسمید درون آنکوباتور قرار گرفته، تریپسینه شده و  $0.75\text{M}$  محلول KCl به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $5\ \text{CO}_2$  درصد درون آنکوباتور قرار گرفت. در مرحله بعد، متانول و اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱ جهت فیکس کردن نمونه‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها را از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده و کروموزوم‌ها مورد آنالیز کاربویاپ قرار گرفتند.

### آنالیز بیان ژن پلوریپوتنسی و اختصاصی رده اپی‌تلیال

به منظور انجام Real Time PCR سلول‌ها نیز پس از آماده شدن به یک لوله اپندورف استریل منتقل شدند و برای استخراج RNA از کیت RNA Agents® Total RNA isolation system (Promega, USA) استفاده شد. سپس مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد تعیین شد. در تمام مراحل کار با RNA از سرد و گرم شدن RNA جلوگیری شده و بقیه مراحل روی یخ انجام گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA تک‌رشته‌ای با نام Qiagen Reverse Transcriptase Kit Quantitect (Qiagen, USA) صورت پذیرفت. واکنش‌های زنجیره پلیمرز (Real-time PCR) با استفاده از SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara, Japan) (Perfect Real Time) و دستگاه Rotorgene 6000 انجام شد و در همه واکنش‌ها مقدار یکسانی (۲ میکرولیتر) از cDNA ساخته شده مورد استفاده قرار گرفت. بعد از بهینه‌سازی شرایط PCR، برای تمامی ژن‌ها سریال رقت تهیه شد سپس نمودار استاندارد و در نهایت محاسبه Efficiency انجام گرفت. حجم نهایی واکنش  $10\ \mu\text{L}$  بود. واکنش برای ژن‌ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت. برای انجام فرایند PCR نیز از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول (۱) استفاده شد. فرایند PCR نیز بدین ترتیب انجام گرفت: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، دمای انیلینگ (Annealing) به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برنامه‌ریزی شده و در نهایت دمای بسط انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۲ درصد، الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. طراحی پرایمرها با استفاده از Primer 3 و Beacon Designer™ انجام و با BLAST چک شد. بیان ژن‌های KRT3, KRT12, Connexin43, Osteocalcin, Osteopontin, Sox2 و PPARG, Oct4, Nanog مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی‌های پرایمرهای اختصاصی

Primers	Sequence (5'--->3')	Tm
KRT-3 222bp	F: TCTCTTCGCCAAGCTCCTTAC R: GAGATGCTCTTGTTGCCGC	60
KRT-12 342bp	F: AGGACTGGGTGCTGGTTATG R: GCTGAAATGATCTTATTCCTGAGGT	61
Connexin-43	F: AGCCAGAAGAAAGGACAGCA R: GGTTCTGTACTGTGGCTCA	61
GAPDH	F: GATGCCCCCATGTTTCGTCATG R: GGGTGTCTGCTGTTGAAGTCAG	60
Osteopontin 154bp	F: TCACCTGTGCCATACCAGTT R: GACTTACTTGAAGGGTCTGTGG	59.5
Osteonectin 211bp	F: CATTGACGGGTACCTCTCCC R: TCCGGTACTGTGGAAGGAGT	60
PPARG 266bp	F: GTGGCCGACAAATGACCA R: GGAGATGCAGGCTCCACTTT	59
Nanog 368bp	Forward: GAAATCCCTTCCTCGCCATC Reverse: CTCAGTAGCAGACCTTGTAAAGC	61
Oct4 189bp	Forward: TCAGTTGGACTGGGCTAGT Reverse: GGAGTTCCCTCTGAGTTGCTT	60
Sox2 368bp	Forward: GGGGAAAGTAGTTTGCTGCC Reverse: TAACTGTCCATGCGCTGGTT	59

عکس‌برداری از آن انجام شده و فاصله آن‌ها ثبت شد. هر کدام از گروه‌های سلولی در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با پنج مرتبه تکرار بررسی گردید و میزان نزدیک شدن لبه‌های سلولی مورد تصویربرداری قرار گرفت و مهاجرت سلول‌ها در ناحیه خراش با استفاده از نرم‌افزار اپتیکا ویژن (Optika vision pro version 3 software) بر حسب میکرومتر ارزیابی گردید<sup>۱۸،۱۹</sup>.

#### تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel، SPSS و Flowing software 2-5-1، Becon Disigner، REST v16 صورت گرفت و سطح معنی‌دار P کم‌تر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. جهت مقایسه مقادیر کمی از روش آنالیز One way ANOVA استفاده شد.

#### یافته‌ها

#### مورفولوژی سلول‌های بنیادی اربیت، چربی شکمی و مغز استخوان

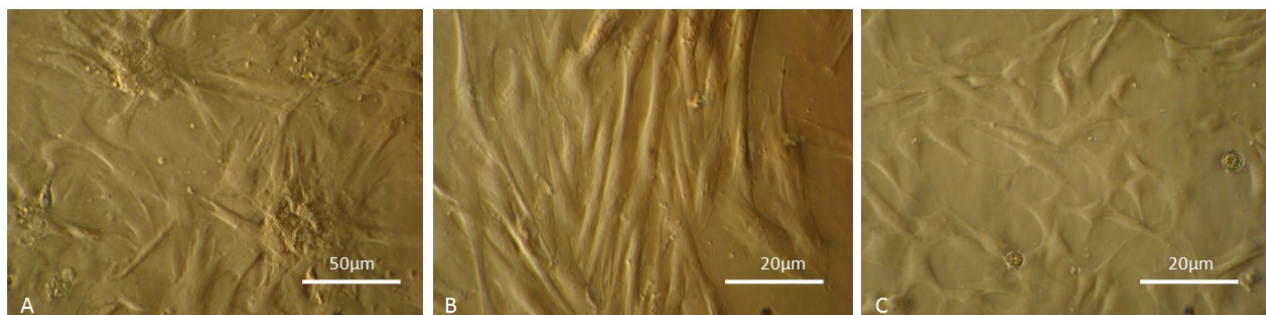
سلول‌های بنیادی چربی اربیت (OFSCs) با اندازه تقریبی ۲۵ تا ۳۰ میکرومتر ظاهری چند وجهی با زوائد کشیده داشتند. این سلول‌ها از نظر ظاهر با سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) که دوکی شکل بودند کاملاً متمایز و تا حدودی به سلول‌های بنیادی چربی شکمی (ASCs) شبیه بودند. از نظر اندازه، سلول‌های OFSC از سلول‌های ASCs بزرگ‌تر و زوائد کشیده‌تری داشتند (تصویر ۱).

#### آزمون هم‌جوارسازی با هوا یا Airlifting

تست هم‌جوارسازی با هوا یا Airlifting به منظور القا تمایز به سمت سلول‌های اپی‌تلیالی بر روی گروه‌های سلولی تحت آزمون انجام پذیرفت. برای این منظور محلول محیط کشت طی فرایند سه مرحله‌ای در پلیت ۶ خانه کم شده تا جایی که سطح لایه سلولی در معرض هوا قرار گیرد. محیط کشت به صورت روزانه بررسی و تعویض شد. پس از گذشت ۱۰ روز، سلول‌ها از سطح فلاسک جمع‌آوری شده و میزان تمایز اپی‌تلیالی با ارزیابی سطح mRNA مربوط به ژن‌های مارکرهای سیتوکراتین ۳ (KRT3)، سیتوکراتین ۱۲ (KRT12) و کانکسین ۴۳ توسط Real time PCR تعیین شد<sup>۱۶،۱۷</sup>.

#### آزمون ترمیم آزمایشگاهی یا Wound Healing

انجام این آزمون بر اساس روش مورد استفاده در مطالعه لیانگ، ۲۰۰۷، انجام پذیرفت<sup>۱۸</sup>. سلول‌های OFSC، MSC و ASC درون پلیت ۲۴ خانه به همراه محیط کشت DMEM، FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک کشت یافتند. پس از آن که تراکم سلول‌ها به ۱۰۰ درصد رسید و یک لایه تک‌سلولی تمام گستره پلیت را پوشاند، با استفاده از یک سر سمپلر ۲۰۰ میکرولیتری استریل، یک خراش به طور افقی در سطح تک لایه سلولی ایجاد گردید و بلافاصله سطح گستره سلولی با بافر سالین شستشو داده شد تا سلول‌های جدا شده از کف از کشت خارج شوند. بدین ترتیب در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه، دو لبه سلولی وجود دارد که

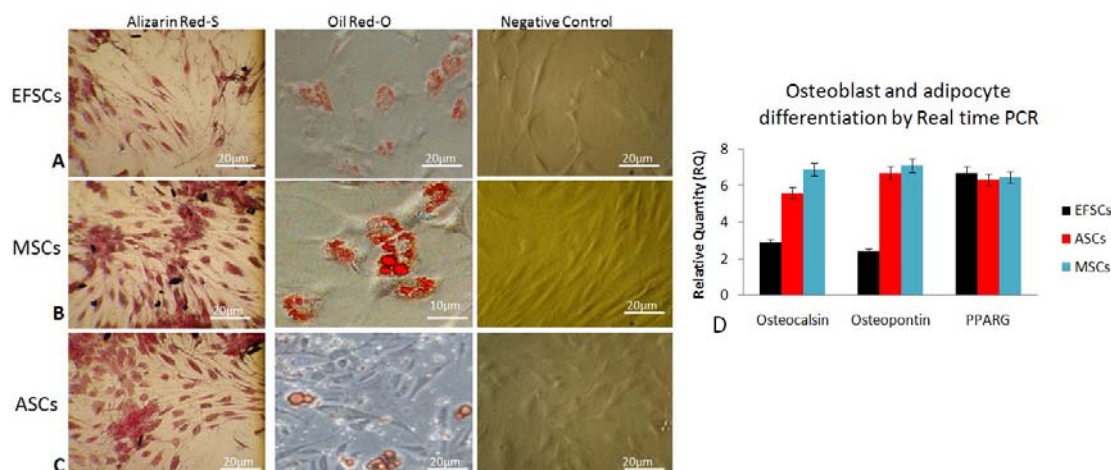


تصویر ۱- شمایی از مورفولوژی سلول‌های بنیادی چربی اربیت (A)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (B)، سلول‌های بنیادی چربی ناحیه شکمی (C) را نشان می‌دهد.

رنگ آمیزی آلیزارین رد، به رنگ قرمز متمایل شده و واکنش‌های چربی موجود در سلول‌های آدیپوسیت با رنگ اوایل رد او با رنگ قرمز شفاف مشخص شده‌اند.

### تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های چربی و استخوان

همان‌طور که در تصویر ۲ نشان داده شده است تمایز به سلول‌های استئوبلاست به واسطه رسوب کلسیم بر سطح خود با



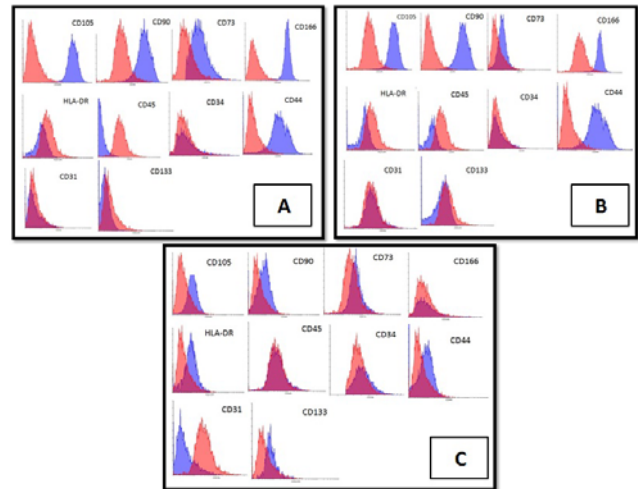
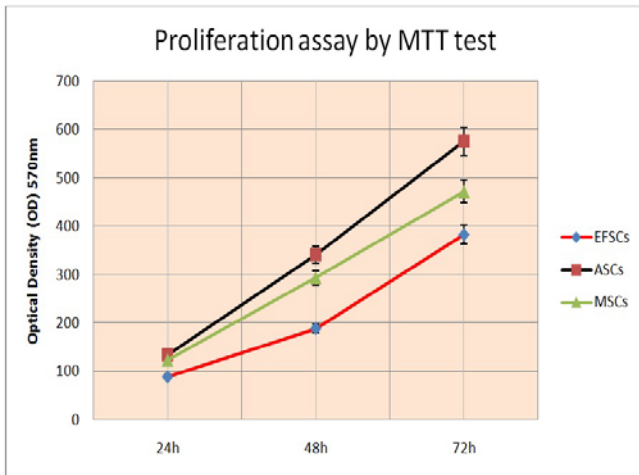
تصویر ۲- سلول‌های بنیادی OFSC، MSC و ASC پس از گذشت ۲۱ روز از القاء تمایز به سلول‌های استئوبلاست و آدیپوسیت با رنگ آمیزی آلیزارین رد و اوایل رد مورد بررسی قرار گرفتند. (A): سلول‌های بنیادی OFSC هستند که تمایز آنها به رده استخوان ساز با رنگ آمیزی آلیزارین رد نشان داده شده است. این سلول‌ها توان تمایز به رده چربی را نیز دارند. (B): سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز به استئوبلاست و آدیپوسیت را انجام و شدت رنگ گویای تمایل بالای آنها برای تبدیل شدن به این رده‌های سلولی می‌باشد. (C): سلول‌های بنیادی ASC نیز هم‌چون MSC تمایز به رده مزودرمی را به سهولت انجام داد. (D) میزان بیان ژن‌های اختصاصی استئوبلاست (استئوکلسین، استئوپوننتین) و آدیپوسیت (PPARG) را نشان می‌دهد.

### بررسی سرعت تکثیر با استفاده از روش MTT

نتایج تست MTT نشان داد که سرعت تکثیر در سلول‌های ASC بالاتر از MSC و OFSC می‌باشد. بدین ترتیب مشخص شد که مدت زمان لازم برای دو برابر شدن هر سلول (Doubling Time) در گروه‌های سلولی مورد مطالعه، متفاوت می‌باشد. تصویر ۴ مقایسه توانایی تکثیر را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد.

### آنالیز فلوسیتومتری برای مارکرها سطحی سلول بنیادی

نتایج فلوسیتومتری نشان داد که بیان مارکر CD105، CD90، CD73، CD44، CD166 در سلول‌های بنیادی اربیت (OFSCs) همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان (MSCs) مثبت بوده ولی (ASCs) از نظر بیان مارکر CD166 منفی بود. بیان CD133، CD34، CD45 و CD31 در هر سه گروه سلولی منفی بودند (تصویر ۳ و جدول ۲).



تصویر ۴- سلول‌های بنیادی OFSC، ASC و MSC با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی میزان تکثیر قرار گرفتند. سرعت تکثیر در سلول‌های ASC به مراتب بالاتر از MSC و OFSC می‌باشد.

تصویر ۳- آنالیز فلوسیتومتر ی برای مارکرها ی سطح سلولی را در (A) سلول‌های بنیادی چربی اربیت، (B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، (C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی ناحیه شکمی نشان می‌دهد. گراف آبی رنگ مشخص‌کننده مارکر مورد بررسی و گراف قرمز رنگ کنترل منفی می‌باشد.

جدول ۲- میزان بیان مارکرها ی سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهد

	CD105	CD90	CD73	CD44	CD166	CD34	CD45	CD31	CD133	HLA-DR
OFSCs	+++++	++++	+++	+++++	+++++	-	-	-	-	-
MSCs	+++++	+++++	+++	+++++	++++	-	-	-	-	-
ASCs	+++	+++	++	++	-	-	-	-	+/-	+/-

نهادند، با استفاده از کاربوتایپ نظم کروموزومی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که OFSCs پس از پاساژهای متمادی همچنان از نظر آرایش کروموزومی طبیعی بوده و دارای آرایش ۴۶XX می‌باشند (تصویر ۷).

#### ارزیابی بیان ژن‌های پلوریپوتنسی در OFSC، MSC و ASC

بیان ژن‌های پلوریپوتنسی شامل Oct4، Nanog و Sox2 در هر سه گروه سلولی به میزان قابل توجهی مثبت بود و تفاوت معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نشد (تصویر ۸).

#### هم‌جواری با هوا یا Airlifting

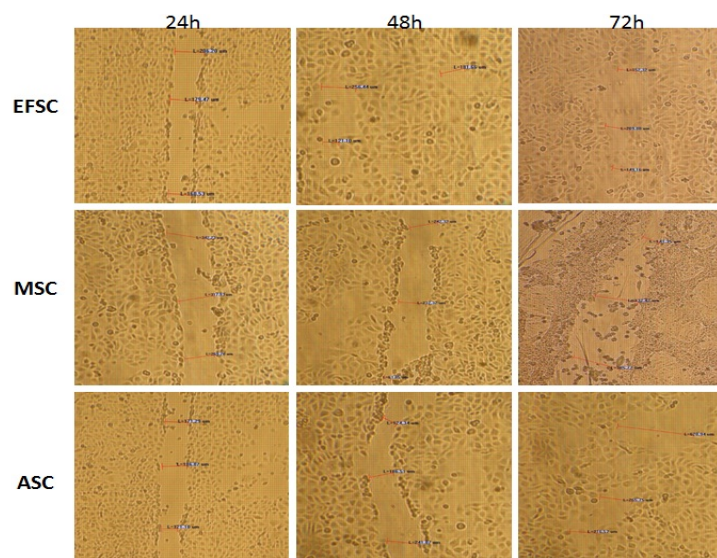
نتایج تست هم‌جواری با هوا اختلاف معنی‌داری بین سه گروه در بیان مارکرها ی اپی‌تلیالی نشان داد (P=0/001). به طوری که تنها در گروه سلولی OFSCs بیان مارکرها ی اپی‌تلیالی القا شد و این در حالی بود که این مارکرها در دو گروه دیگر بیان قابل توجهی نداشتند (تصویر ۹).

#### ترمیم آزمایشگاهی یا Wound Healing

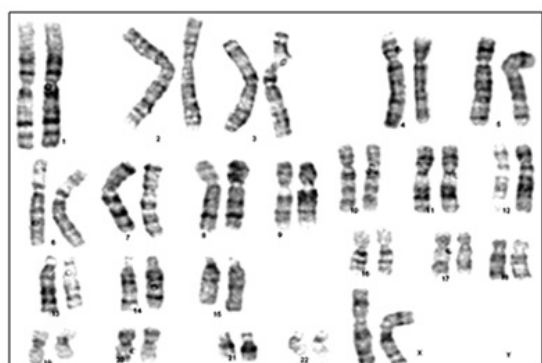
تصویر ۵، شمایی از توانایی ترمیم و مهاجرت سلولی را در گروه‌های سلولی (OFSC، ASC و MSC) تحت آزمون نشان می‌دهد. مشاهدات نظری به طور مشخص میزان ترمیم را در گروه سلولی OFSC (P=0/04) بالاتر از MSC و ASC نشان می‌دهد. پس از ۲۴ ساعت، فاصله بین دو لبه خراش ایجاد شده در گروه ASC (P=0/05) کم‌تر از دو گروه دیگر بود (۲۶۷±۷/۳ میکرومتر)، اما در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت این فاصله در گروه OFSC (به ترتیب ۱۸۶±۴/۸ و ۱۷۰±۲/۸ میکرومتر) کم‌تر از MSC (به ترتیب ۲۴۸±۳/۷ و ۲۰۱±۳/۱ میکرومتر) و ASC (به ترتیب ۲۱۰±۲/۶ و ۱۸۳±۴/۶ میکرومتر) بود (P=0/05) که نشان دهنده بالاتر بودن سرعت ترمیم خراش ایجاد شده توسط گروه OFSC می‌باشد (تصویر ۶).

#### کاربوتایپ سلول‌های بنیادی چربی اربیت

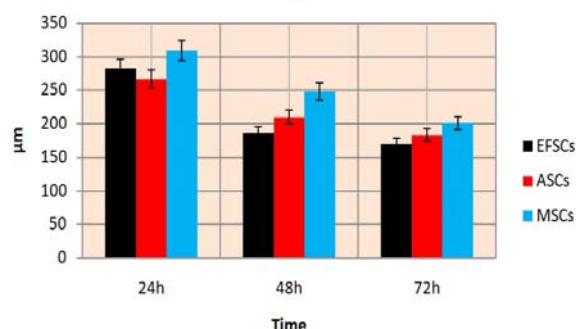
پس از آن که سلول‌های OFSC ۱۰ پاساژ پی‌درپی را پشت سر



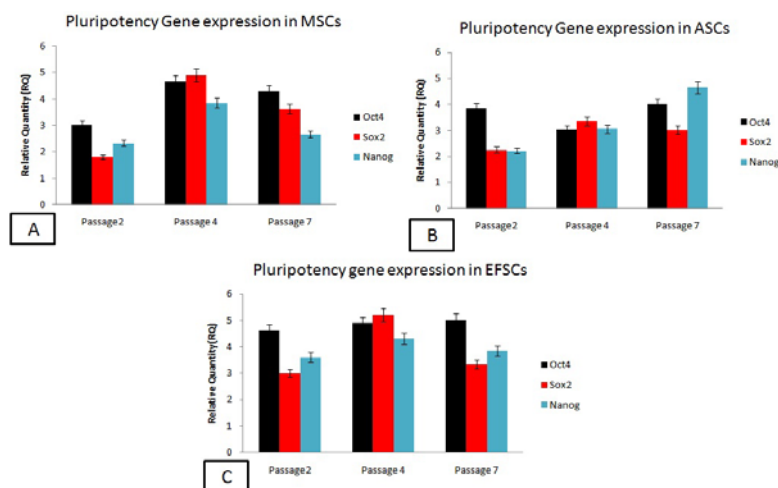
تصویر ۵- میزان مهاجرت سلولی و ترمیم را در حدفاصل دو لبه سلولی در سلول‌های بنیادی OFSC، MSC و ASC نشان می‌دهد. اندازه‌گیری بر اساس فواصل باقی مانده در سه نقطه تصویر با استفاده از نرم افزار تخصصی Optika vision pro version 3 software با سه تکرار انجام پذیرفت (P=0.04). بزرگ‌نمایی ۱۰۰× می‌باشد.



Wound healing in-vitro Test



تصویر ۶- میزان کمی فاصله بین دو لبه سلولی در روزهای ۱، ۲ و ۳ را در سه گروه تحت آزمون نشان می‌دهد. تصویر ۷- آرایش کروموزومی نرمال 46XX برای سلول‌های بنیادی چربی اربیت پس از ۱۰ پاساژ پی‌درپی.



تصویر ۸- شمایی از میزان بیان ژن‌های پلوریپوتنسی را در پاساژهای ۲، ۴ و ۷ در سلول‌های، (A) MSC، (B) ASC و (C) OFSC نشان می‌دهد.



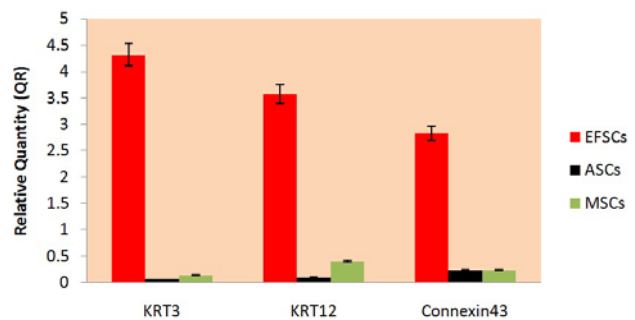
اربیت قابلیت تمایز به بافت استخوانی، غضروفی و چربی را دارند که این یافته توسط مطالعه ما نیز تایید شد. نکته قابل توجه این که برخلاف چربی موجود در سایر نقاط بدن که منشا مزانشیمال دارند، چربی اربیت دارای منشا ستیغ عصبی بوده و قابل تمایز به سلول‌های اکتودرمال مانند اپی‌تلیوم قرنیه می‌باشد<sup>۹،۱۱</sup>. از طرفی در مطالعه حاضر نشان داده شد که سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی ASC در مقایسه با سلول‌های OFSC و MSC بالاتر بود. این تفاوت می‌تواند به خاطر اختلاف در مدت زمان دو برابر شدن باشد که خود ریشه در ماهیت سلولی متفاوت آن‌ها دارد.

سلول‌های بنیادی بند ناف نیز به عنوان یک منبع مناسب جهت سلول درمانی بیماری‌های سطح چشم مطرح شده‌اند<sup>۲۰</sup>. این سلول‌ها نیز همانند سلول‌های بنیادی چربی اربیت توانایی تمایز به بافت‌های مزانشیمال و اکتودرمال را دارند<sup>۲۱</sup>. از جمله مزایای سلول‌های بنیادی بندناف می‌توان به ایمنی‌زایی اندک، توان تکثیری بالا و آسان بودن تهیه آن‌ها اشاره کرد<sup>۲۰</sup> که البته بر اساس مطالعه ما و مطالعات پیشین همه این موارد در مورد سلول‌های بنیادی چربی اربیت نیز صدق می‌کند<sup>۹،۱۲</sup>.

سلول‌های OFSC در تست ترمیم آزمایشگاهی (Wound Healing) به طور معنی‌داری میزان بالاتری از ترمیم و مهاجرت را در حفاصل دو لبه سلولی نشان دادند. اگر چه بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های ASC ترمیم و مهاجرت بالاتری داشتند ولی پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت سلول‌های OFSC با حرکت به سمت لبه‌های سلولی، میزان حفرات باقی‌مانده را به کم‌ترین حد رساندند. با توجه به سرعت تکثیر مناسب و تمایل بالا برای ترمیم و مهاجرت به ناحیه ضایعه، شاید سلول‌های OFSC بتوانند گزینه مناسب برای ترمیم ضایعات باشند. در مطالعه Lin و همکاران<sup>۵</sup> بر روی مدل حیوانی نقص اپی‌تلیوم قرنیه، استفاده از سلول‌های بنیادی چربی اربیت به صورت قطره موضعی موجب تسریع ترمیم نقص اپی‌تلیومی شد و سلول‌های تجویز شده طی سه روز، مارکرهای سطحی اپی‌تلیوم را بروز دادند که این یافته‌ها در تایید مطالعه حاضر می‌باشند. به عقیده آن‌ها سازوکارهای احتمالی تسریع بهبود نقص اپی‌تلیوم قرنیه شامل تبدیل مستقیم سلول‌های بنیادی به سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه، تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های بنیادی لیمبال و کمک به بازسازی اپیتلیوم قرنیه و خواص تنظیم‌کننده ایمنی (Immunomodulatory) سلول‌های بنیادی تجویز شده می‌باشند.

آگاهی از نسبت سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های تمایز نیافته و برعکس می‌تواند داده‌ای بسیار ارزشمند قبل از پیوند و یا پیش از القاء تمایز به رده تخصصی باشد<sup>۲۲،۲۳</sup>. رسیدن به این

Epithelial gene expression after airlifting



تصویر ۹- نمایی از میزان بیان ژن‌های شاخص اپی‌تلیال قرنیه را نشان می‌دهد که در گروه‌های تحت آزمون مورد بررسی بیان با Real time PCR قرار گرفته است ( $P < 0.05$ ).

### بحث

در این مطالعه ویژگی‌های مولکولی و سلولی سلول‌های بنیادی چربی اربیت مورد ارزیابی قرار گرفت و با سلول‌های بنیادی چربی شکمی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مقایسه شد که در یافته‌ها، سلول‌های OFSC از نظر تمایز و عملکرد، با وجود شباهت‌ها، اختلافاتی نیز با سلول‌های بنیادی MSC و ASC داشتند. سلول‌های OFSC نسبت به دو نوع دیگر تمایل بیش‌تری جهت تمایز به سلول‌های اکتودرمال نشان دادند و قدرت ترمیم نقص اپی‌تلیوم در سلول‌های OFSC بیش‌تر از دو نوع دیگر بود.

مطالعه Chen و همکاران<sup>۱۳</sup> نشان داد که بافت چربی اربیت دارای هر دو منشا مزودرمال و اکتودرمال می‌باشد. آن‌ها معتقدند که علاوه بر سلول‌های بنیادی که در روش معمول از قسمت استرومای عروقی بافت چربی به دست می‌آیند، سلول‌های بنیادی دیگری (سلول‌های باقی‌مانده بر روی فیلتر) نیز در بافت چربی وجود دارند که می‌توانند خواص متفاوتی داشته باشند. در مطالعه ما نیز وجود سلول‌های بنیادی با ویژگی‌های مشابه سلول‌های اکتودرمال مانند اپی‌تلیوم قرنیه در بافت چربی اربیت نشان داده شد. این در حالی بود که وجود چنین سلول‌هایی در بافت چربی شکمی ثابت نشد. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد بین بافت‌های چربی نقاط مختلف بدن، فقط سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی اربیت قابلیت تمایز به بافت‌های اکتودرمال را دارند.

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی اربیت اولین بار در سال ۲۰۰۹ توسط Korn و همکاران<sup>۱۴</sup> جداسازی شده و به عنوان یک منبع مناسب جهت تهیه سلول‌های بنیادی شناخته می‌شوند. مطالعه Ho و همکاران<sup>۹</sup> نشان داد که سلول‌های بنیادی چربی

نشان دادند که سلول‌های MSC پیوند شده به قرنیه آسیب دیده خرگوش، مارکرهای اپی‌تلیال قرنیه را بیان می‌کنند. یافته‌های ما نشان می‌دهد که اگر چه مارکرهای اپی‌تلیال توسط سلول‌های MSC و ASC بیان می‌شوند، بیان این مارکرها توسط سلول‌های OFSC به طور مشخص بالاتر است.

### نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی اکتودرمال CD1۰۵+/CD۹۰+/CD۱۶۶+ موجود در بافت چربی اربیت، با توجه به توانایی ذاتی در تکثیر، ترمیم، مجاورت بافتی با چشم، کشت و نگهداری آسان و همچنین امکان دسترسی آسان، می‌تواند گزینه مناسبی برای جایگزینی سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه باشد. انجام آزمایشات تکمیلی حیوانی و انسانی با نمونه‌های بیش‌تر و پی‌گیری طولانی‌مدت با استفاده از سلول‌های OFSC به صورت قطره یا کشت داده شده در مدل‌های تجربی کمبود سلول‌های بنیادی قرنیه، می‌تواند سلول‌های OFSC را برای کاربردهای بالینی مورد ارزیابی بیش‌تر قرار دهد.

اطلاعات تنها به واسطه بررسی میزان ژن‌های شاخص پلورپوتنسی مقدور خواهد بود. با توجه به الگوی بیان ژن‌های پلورپوتنسی در سلول‌های تحت بررسی، بهترین زمان برای پیوند، القاء تمایز و دیگر دستورزی (Manipulation)‌های آزمایشگاهی برای سلول‌های OFSC و MSC، پاساژ ۴ و برای سلول‌های ASC، پاساژ ۷ پیشنهاد می‌گردد.

در آزمون همجوارسازی با هوا مشخص گردید که سلول‌های OFSC از استعداد ذاتی مناسبی برای تمایز به سلول‌های مشابه با اپی‌تلیوم قرنیه برخوردار می‌باشند. این در حالی است که در شرایط مشابه سلول‌های MSC و ASC بیان مناسبی نداشتند. در مطالعات پیشین نتایج متناقضی در خصوص توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های اپی‌تلیال حاصل شد. در مطالعه Ma و همکاران<sup>۲۴</sup>، پس از پیوند سلول بنیادی MSC به قرنیه موش، شواهدی از تمایز به سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه دیده نشد. آن‌ها بهبودی قابل توجه آسیب قرنیه پس از پیوند سلول بنیادی مزانشیمال را به اثرات مهار نورگ‌زایی و ضد التهابی این سلول‌ها نسبت دادند. در مقابل Gu و همکاران<sup>۱۶</sup>

### منابع

- Jeng BH. Treating the Nonhealing Epithelial Defect: an overview of standard and investigational therapies for persistent corneal epithelial defects. *Cataract Refract Surg Today Europe* 2011;9:25-28.
- Jeng BH, Dupps WD. Autologous serum 50% eye drops in the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 2009;28:1104-1108.
- Katzman LR, Jeng BH. Management strategies for persistent epithelial defects of the cornea. *Saudi J Ophthalmol* 2014;28:168-172.
- Kim KM, Shin YT, Kim HK. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 2012;56:544-550.
- Lin KJ, Loi MX, Lien GS, et al. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:72.
- Ma DH, Kuo MT, Tsai YJ, et al. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn. *Eye (Lond)* 2009;23:1442-1450.
- Bartakova A, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. Regenerative cell therapy for corneal endothelium. *Curr Ophthalmol Rep* 2014;2:81-90.
- Bertolotti E, Neri A, Camparini M, et al. Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation. *Prog Retin Eye Res* 2014;42:130-144.
- Ho JH, Ma WH, Tseng TC, et al. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Eng Part A* 2011;17:255-266.
- Han C, Zhang L, Song L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: a better cell source for nervous system regeneration. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127:329-337.
- Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 1979;29:27-43.
- Korn BS, Kikkawa DO, Hicok KC. Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2009;25:27-32.
- Chen SY, Mahabole M, Horesh E, et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from human orbital adipose tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:4842-4852.
- Lauritano D, Palmieri A, Vinci R, et al. Adipose derived stem cells: basic science fundamentals and clinical application. An update. *Minerva Stomatol* 2014;63:273-281.
- Chien MH, Bien MY, Ku CC, et al. Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2012;40:1245-1253.
- Gu S, Xing C, Han J, et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 2009;15:99-107.
- Liu S, Li J, Wang C, et al. Human limbal progenitor cell characteristics are maintained in tissue culture. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35:80-86.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329-333.

19. Muhammad AA, Pauzi NAS, Arulsevan P, et al. In Vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from moringa oleifera Lam. *Biomed Res Int* 2013;974580
20. Reza HM, Ng BY, Gimeno FL, et al. Umbilical cord lining stem cells as a novel and promising source for ocular surface regeneration. *Stem Cell Rev* 2011;7:935-947.
21. Lim IJ, Phan TT. Epithelial and mesenchymal stem cells from the umbilical cord lining membrane. *Cell Transplant* 2014;23:497-503.
22. Zhang J, Huang C, Feng Y, et al. Comparison of beneficial factors for corneal wound-healing of rat mesenchymal stem cells and corneal limbal stem cells on the xenogeneic acellular corneal matrix in vitro. *Mol Vis* 2012;18:161-173.
23. Gallagher C, Clarke C, Aherne ST, et al. Comparative transcriptomic analysis of cultivated limbal epithelium and donor corneal tissue reveals altered wound healing gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:5795-5805.
24. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 ;24:315-321.