



รายงานการวิจัย

**การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด
เมสเซนไคน์มอลและการแช่แข็งเซลล์
(Development a New Technology for Mesenchymal Stem Cell
Expansion and Cryopreservation)**



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด เมสเซนไคน์มอลและการแช่แข็งเซลล์ (Development a New Technology for Mesenchymal Stem Cell Expansion and Cryopreservation)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เคชสุขุม

นางสาวพัชรี ปราศจาก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานทั้งสองแห่งเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้จากความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัย 2 ท่านคือ อาจารย์นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เศรษฐชุม และ นางสาว พัทรี ปราศจาก ซึ่งหัวหน้าโครงการขอขอบคุณท่านทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยส่วนรวม และ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกต่างๆทั้ง น้ำ ไฟ สถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ที่สำคัญที่สุดอีกประการหนึ่งที่ทำให้โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยดีคือการได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากคณะแพทย์และพยาบาลจากโรงพยาบาล ป.แพทย์ โรงพยาบาลเซนต์แมรีและโรงพยาบาลค่ายสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้วิจัยในครั้งนี้ ซึ่งต้องขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ท้ายสุดนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการประเมินงานวิจัยและบุคคลอื่นๆซึ่งไม่อาจกล่าวได้หมดในโอกาสนี้ สำหรับการสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

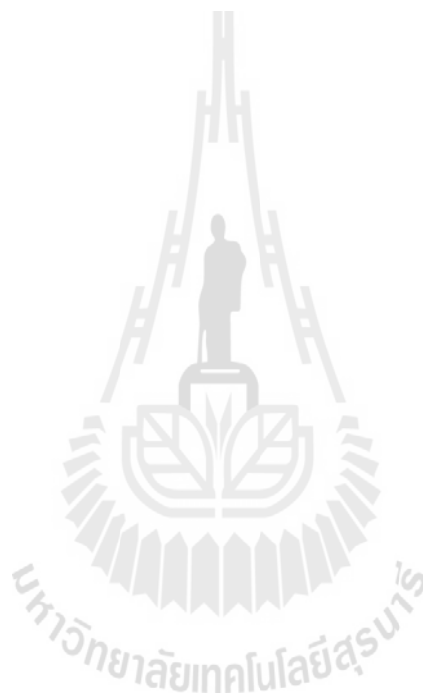
ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลได้รับการยอมรับว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคต่างๆ ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการรักษาโรคต่างๆ นี้มักพบกับปัญหาเรื่องการมีปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ในการรักษาโรค และคุณภาพของเซลล์ซึ่งหากนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานเป็นเดือนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณเพียงพอนั้น จะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคจะส่งผลให้การรักษาโรคในผู้ป่วยไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคิดค้นหาเทคโนโลยีใหม่ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลจากสายสะดือ ให้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น และยังคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น ในการนี้ได้มีการพัฒนาน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีผู้ใดศึกษา คือ embryonic stem cells conditioned medium (ESCM) ผสมรวมกับ epidermal growth factor (EGF) เป็นส่วนประกอบหลักอีกชนิดหนึ่ง และนำมาเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (ปริมาณออกซิเจน ร้อยละ 5) จากผลการทดลองพบว่าวิธีการนี้สามารถเร่งการเจริญเติบโตของ เซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลจากสายสะดือได้เป็นอย่างดี โดยสามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงถึง 424.88 ± 14.62 เท่าเมื่อเทียบกับจำนวนเริ่มต้น ภายในระยะเวลาเพียง 12 วัน ในขณะที่เดียวกันเซลล์เหล่านี้ยังสามารถรักษาคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอล จากสายสะดือได้อย่างดีทั้งในด้านของรูปร่างเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ($CD_{29}^{+} CD_{44}^{+} CD_{90}^{+} CD_{34}^{-} CD_{45}^{-}$) ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะ (เซลล์กระดูกแข็ง เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน) และการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด การทดลองนี้สรุปได้ว่าการเลี้ยงเซลล์แบบใหม่นี้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอล จากสายสะดือได้อย่าง

มีประสิทธิภาพที่สูง ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ในทางคลินิกเพื่อการรักษาโรคและเก็บแช่แข็งเป็นธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อใช้ในระยยาวต่อไปได้



Abstract

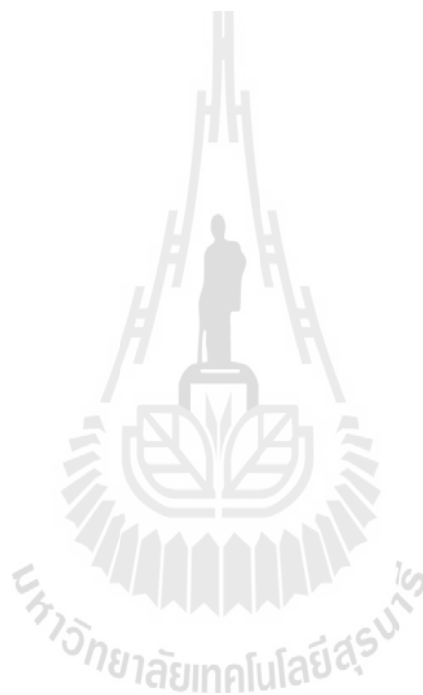
Mesenchymal stem cells (MSCs) has been accepted as a promising tool for therapeutic purpose. However, insufficient quantity of the cells and changing in stem cell characteristics of the stem cells according to the long term cell culture *in vitro* (more than 30 days) are major obstacles for therapeutic applications of this cell type. These problems lead to ineffective therapeutic outcomes. Therefore, this work focus on development a new effective method for Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) expansion *in vitro* in a short period of time which is also able to maintain its stem cell characteristics. To this end, we developed a new culture medium composes of embryonic stem cell condition media containing epidermal growth factor as another major component of the media. We used this medium to culture WJ-MSCs under hypoxic condition (5% O₂). The results demonstrated that this new medium could accelerate WJ-MSCs expansion by 424.88 ± 14.62 folds increase in day 12 compared to day 0 of the *in vitro* cultures. The expanded cells also could preserve common characteristics of MSCs including cells morphology, cell surface marker expressions (CD₂₉⁺, CD₄₄⁺, CD₉₀⁺, CD₃₄⁻, CD₄₅⁻), differentiation potential (osteoblasts, chondroblasts, adipocytes), and stemness marker expressions. Altogether, this new method can serve as a new high effective method for WJ-MSCs expansion *in vitro* in a short period of time which suitable for clinical applications and stem cell bank for long term use of the cells.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพที่	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ข้อตกลงเบื้องต้น	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการทดลองเก็บข้อมูล	7
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	12
บทที่ 3 ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	14
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์	22
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	26
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัย	36

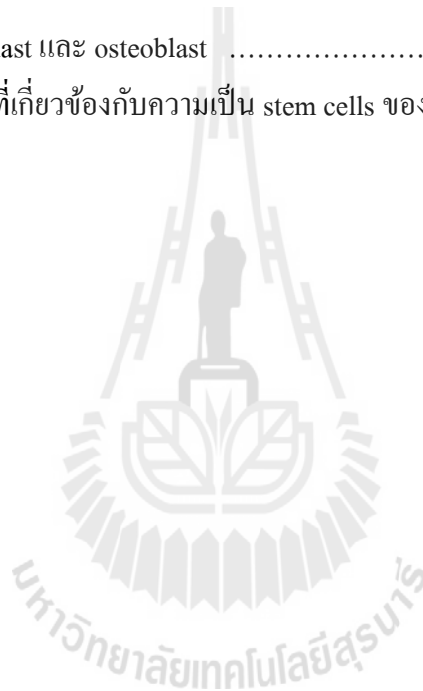
สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 รายการแสดงชื่อและ sequences ของ primers	10



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของ WJ-MSCs	14
ภาพที่ 2 อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเพิ่มจำนวนของ WJ-MSCs	15
ภาพที่ 3 ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัว (PDT)	16
ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs ในช่วงปลาย (P7) ..	17
ภาพที่ 5 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs	19
ภาพที่ 6 ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes, chondroblast และ osteoblast	20
ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็น stem cells ของ WJ-MSCs ..	21



คำอธิบายสัญลักษณ์

AFP	=	alpha-fetoprotein
ALB	=	albumin
bFGF	=	basic fibroblast growth factor
BM	=	bone marrow
BSA	=	bovine serum albumin
° C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary DNA
CK-18	=	cytokeratin 18
CO ₂	=	carbon dioxide
D	=	day
DAPI	=	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	=	epidermal growth factor
ES	=	embryonic stem cells
ESCM	=	embryonic stem cells conditioned medium
FBS	=	fetal bovine serum

คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

g	=	gram
h	=	hour
HDGF	=	hepatoma-derived growth factor
HepG2	=	hepatocellular carcinoma cell line
HGF	=	hepatocyte growth factor
ITS	=	insulin, transferrin and selenium
LDL	=	low-density lipoprotein
mRNA	=	messenger RNA
MSCs	=	mesenchymal stem cells
NH ₄ Cl	=	ammonium chloride
O ₂	=	oxygen
OSM	=	oncostatin M
PBS	=	phosphate buffer saline
PDT	=	population doubling time
RNA	=	ribonucleic acid
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
WJ-MSCs	=	Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

Mesenchymal stem cells (MSCs) คือเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆในร่างกายได้เช่น adipocytes, chondroblast และ osteoblast ซึ่งมีการค้นพบเซลล์นี้ครั้งแรกจากไขกระดูกโดยทีมวิจัยของ Fridenstein และคณะในปี 1970 (Caplan, 2007) จากนั้นเป็นต้นมาได้มีทีมวิจัยมากมายศึกษา MSCs ในแง่มุมต่างๆ ทำให้เกิดความหลากหลายของ MSCs ทั้งในแง่คุณลักษณะและคุณสมบัติ ดังนั้นเพื่อเป็นการสร้างความเข้าใจที่ตรงกัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ International society for cellular therapy (ISCT) ได้กำหนด criteria ขั้นต่ำในการจำแนก MSCs ดังนี้ 1: MSCs ต้องมีคุณสมบัติเกาะติดกับภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ได้ เช่น culture flask 2: MSCs ต้องมีรูปร่างเรียวยาวคล้าย fibroblast 3: MSCs ต้องมีการแสดงออกของกลุ่มโปรตีนบนผิวเซลล์คือ CD29, CD44, CD90 และ CD105 เป็นอย่างน้อย 4: MSCs ต้องมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆในสายของ mesoderm ได้เช่น adipocytes, chondrocytes และ osteoblast (Dominici et al., 2006)

นอกจากไขกระดูกแล้วงานวิจัยต่อมาพบว่า MSCs สามารถแยกได้จากแหล่งอื่นๆอีกมากมาย เช่น ไขมัน, น้ำคร่ำ, รก และ สายสะดือรก เป็นต้น (in 't Anker et al., 2003; In 't Anker et al., 2004; Troyer & Weiss, 2008; Tsai, Lee, Chang, & Hwang, 2004; Zuk et al., 2002) ซึ่งส่วนมากแล้วงานวิจัยส่วนใหญ่มักศึกษา MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูก แม้จะมีคุณลักษณะและคุณสมบัติของ MSCs แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกมีปริมาณค่อนข้างต่ำ อีกทั้งคุณสมบัติของเซลล์ที่แยกมาได้ยังขึ้นกับอายุของไขกระดูกด้วย ซึ่ง MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูกของผู้สูงอายุจะมีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆได้ต่ำกว่า MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูกของเด็ก เป็นต้น (Caplan, 2007) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งอื่นๆของ MSCs มาทดแทนและ

ตอบสนองต่องานวิจัยต่างๆ โดยเฉพาะงานวิจัยทางคลินิก ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ MSCs ในงานวิจัยทางคลินิกเพื่อรักษาโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Stamm et al., 2003) โรคกระดูก (Horwitz et al., 1999) เป็นต้น และผลในเบื้องต้นพบว่า MSCs สามารถช่วยฟื้นฟูภาวะของความผิดปกติเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี

สายสะดือรกจากเด็กแรกเกิด โดยเฉพาะส่วน Wharton's jelly จัดว่าเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่พบว่าอุดมไปด้วย MSCs และมีข้อดีเหนือกว่าแหล่งอื่นๆ เนื่องจากสายสะดือรกมีความอ่อนเยาว์และ primitive มากกว่า อีกทั้งยังง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง ซึ่งต่างกับการเก็บตัวอย่างจากไขกระดูกที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดมาก นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า MSCs ที่แยกได้จาก Wharton's jelly ของสายสะดือรก (Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs) มีคุณลักษณะและคุณสมบัติเหมือนกับ MSCs ที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ (Baksh, Yao, & Tuan, 2007; Majore, Moretti, Hass, & Kasper, 2009; Wang et al., 2004) รวมทั้งมีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้นอกจากนี้ออกมาจากสาย mesoderm เช่น สาย ectoderm ได้แก่ nerve cells (Mitchell et al., 2003) สาย endoderm ได้แก่ hepatocytes (Zhang, Lie, & Wei, 2009), insulin-producing cells (Chao, Chao, Fu, & Liu, 2008) และ cardiomyocytes (Pereira, Khushnooma, Madkaikar, & Ghosh, 2008) เป็นต้น

ในปัจจุบันการนำเซลล์ต้นกำเนิด mesenchymal stem cells มาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ มักประสบกับปัญหาเรื่องการที่มีเซลล์ต้นกำเนิดอย่างจำกัด คือมีจำนวนน้อยไม่พอต่อการรักษาโรค ซึ่งทำให้การรักษาโรคในผู้ป่วยไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ต้องเก็บตัวอย่างบ่อยหรือหลายครั้งเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในการนำไปรักษาโรค ซึ่งไม่สะดวกต่อผู้ป่วย หรือต้องเก็บจากอาสาสมัครจำนวนมากเพื่อให้เพียงพอต่อการวิจัย แม้จะมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดนี้ให้มากขึ้น แต่ยังคงประสบปัญหาเรื่องการเลี้ยง mesenchymal stem cell ที่ต้องใช้เวลานานหลาย

สัปดาห์หรือเป็นเดือนเพื่อให้ได้เซลล์ในจำนวนที่เพียงพอต่อการใช้งาน นอกจากนี้การเลี้ยงเซลล์ในห้องทดลอง (*in vitro*) ในระยะเวลานานทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ หยุดการแบ่งตัวและตายได้ รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น polyploidy และ aneuploidy ซึ่งหากนำไปรักษาโรคแก่ผู้ป่วยหรือนำไปศึกษาวิจัยต่อจะส่งผลลัพธ์ที่ไม่พึงประสงค์ได้ และทำให้เสียงบประมาณโดยเปล่าประโยชน์ ปัญหาเหล่านี้ทำให้การรักษาโรคไม่สามารถทำได้ในระยะ เวลาอันสั้นหรืออาจไม่ทันการณ์ได้ ในแง่ของการวิจัยจะทำให้การวิจัยต่างๆเกิดความล่าช้าและสิ้น เปลืองงบประมาณ เป็นต้น

ดังนั้นการคิดค้นหาวิธีการใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากขึ้นเป็นจำนวนหลายเท่าในระยะเวลาที่สั้นลงจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคิดค้นหาเทคโนโลยีใหม่ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell ให้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น และยังคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด รวมทั้งคงความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้ เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม โดยจะทดสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็น osteocyte, chondrocyte และ adipocyte นอกจากนี้หลังจากกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์แล้ว เซลล์ที่ได้ต้องสามารถเก็บแช่แข็งและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพื่อให้สามารถเก็บเซลล์ต้นกำเนิดไว้ใช้ในระยะเวลาได้ โครงการนี้จะใช้ mesenchymal stem cell ที่แยกจากสายสะดือ เนื่องจากเก็บง่ายและเป็นส่วนที่มักจะทิ้งไปหลังคลอด

การใช้ MSCs เพื่อเป้าหมายในการรักษานั้นจำเป็นต้องใช้เซลล์จำนวนมาก ดังนั้นการขยายจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการให้เพียงพอต่อความต้องการจึงมีความจำเป็น โดยปกติแล้ว MSCs สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไปคือ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) เป็นส่วนประกอบ MSCs สามารถเจริญเติบโตในสถานะทั่วไปคือ 21% oxygen แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเรื่องนี้พบว่าในสถานะ low oxygen หรือ

hypoxia สามารถกระตุ้นให้ MSCs เจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาวะทั่วไป (Dos Santos et al., 2010)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง FBS ซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญของเซลล์แล้วพบว่า FBS สามารถเป็นแหล่งการแพร่กระจายและปนเปื้อนของ prion และ xenogeneic proteins ต่างๆได้เป็นอย่างดี ซึ่งสามารถก่อให้เกิดผลเสียในการใช้เซลล์เพื่อการรักษาทางคลินิก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งสารอาหารอื่นๆเพื่อมาทดแทน เป็นที่น่าสนใจว่าอาหารสำหรับใช้เลี้ยง Embryonic stem cells (ES) ซึ่งมีข้อดีคือมักใช้ส่วนผสมของอาหารแบบชนิด xeno-free สามารถกระตุ้นให้ MSCs มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไป 4-5 เท่า (Battula et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ Embryonic stem cells conditioned medium (ESCM) ในการเลี้ยง MSCs ซึ่งเป็นที่น่าเสียดายมาก เนื่องจากการเลี้ยง ES เซลล์โดยปกติแล้วจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน เพื่อป้องกันการเกิด spontaneous differentiation ดังนั้นในทุกๆวันจะมีการทิ้ง ESCM ไปแบบเสียเปล่า ซึ่งในการศึกษานี้ได้สังเกตเห็นประโยชน์และคุณค่าของ ESCM จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาศักยภาพของ ESCM ในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs โดยทดสอบคุณลักษณะและคุณสมบัติต่างๆของเซลล์ในแง่มุมต่างๆเช่น อัตราการเจริญเติบโต, รูปร่างลักษณะของเซลล์, การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์, ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ osteocyte, chondrocyte และ adipocyte ตามมาตรฐานการทดสอบคุณสมบัติของ mesenchymal stem cells การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells และวัฏจักรของเซลล์หรือ cell cycle หากโครงการนี้สำเร็จจะทำให้ได้เทคโนโลยีใหม่ในการเพิ่มเซลล์ต้นกำเนิดในปริมาณที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในระยะ เวลาสั้น ลดงบประมาณในการเลี้ยงและเตรียมเซลล์ สามารถเก็บเซลล์จากผู้ป่วยหรืออาสาสมัครจำนวนน้อยลงและไม่ต้องเก็บบ่อยครั้ง สามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีในทางการแพทย์และยังสามารถเก็บแช่แข็งเป็นธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดไว้ใช้ในอนาคตในยามที่ต้องการ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อโครงการนี้ประสบความสำเร็จจะมีการถ่ายทอด

เทคโนโลยีแก่นักวิจัย ไทยที่สนใจเพื่อนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยในด้านต่างๆต่อไป ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อสังคมและประเทศไทยโดยรวม

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความสามารถในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ Embryonic stem cells conditioned medium (ESCM) ที่เติม growth factor คือ epidermal growth factor (EGF) และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ในแ่งมุมต่างๆเช่น อัตราการเจริญเติบโต, รูปร่าง ลักษณะของเซลล์, การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์, ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์จำเพาะในสาย mesoderm, การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells และวัฏจักรของ เซลล์หรือ cell cycle นอกจากนี้ยังทำการศึกษาความสามารถของเซลล์ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์จำเพาะในสาย endoderm คือเซลล์ตับ หลังจากที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร ESCM+ EGF มาแล้ว

3. ขอบเขตของการวิจัย

แยก mesenchymal stem cells จากสายสะดือ เพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคโนโลยี การเลี้ยงแบบใหม่และทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้ว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้จริง ก่อนทำการแช่แข็งเซลล์เพื่อเป็นธนาคารเซลล์ไว้ใช้ในการทดลองตลอดโครงการ โดยตรวจสอบ คุณสมบัติทั้งระดับเซลล์และระดับอนุชีววิทยา จากนั้นทดสอบความสามารถของเซลล์กำเนิดที่ได้ ในการเปลี่ยน แปลงเป็นเซลล์ osteocyte, adipocyte และ chondrocyte ขึ้นตอนถัดไปทำการ วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง เตรียมผลงานเพื่อตีพิมพ์ผลงานในระดับนานาชาติ

4. ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์จากงานวิจัยนี้คือได้วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้นภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำยาที่ไม่มีการปนเปื้อนจาก serum ของสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับความต้องการใช้เซลล์ปริมาณมากเพื่อการรักษาโรคทางคลินิก ในระยะเวลาที่จำกัด และ น้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดใหม่นี้ ยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่ดีสำหรับ WJ-MSCs ซึ่งนอกจากจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังสามารถคงสภาพความอ่อนเยาว์ของ stem cells ไว้ได้อย่างดีเยี่ยม เซลล์ที่ได้สามารถแช่แข็งทำเป็นธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อใช้ในการรักษาโรคในระยะยาว เหมาะสำหรับการใช้ในทางคลินิกต่อไปในอนาคต



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกและเลี้ยง WJ-MSCs ในห้องปฏิบัติการ

ทำการเก็บสายสะดือรกจากเด็กแรกเกิด ซึ่งทางโรงพยาบาลไม่ต้องการแล้วและจะนำไปกำจัดทิ้งต่อไป หลังจากได้รับความยินยอมจากพ่อหรือแม่ของเด็กโดยมี inform of consent ซึ่งเป็นไปตามระเบียบและอยู่ภายใต้ความดูแลของ Human Research Ethics Committee of Suranaree University of Technology จากนั้นนำตัวอย่างมาแยก mesenchymal stem cells โดยทำการตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กและย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ 2 mg/ml collagenase type I (Gibco-Invitrogen) ที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชม. เมื่อครบเวลาแล้วเติม FBS ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของตัวอย่างที่เหลือจากการย่อย จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ 1200 rpm, 4°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วยยาปฏิชีวนะ แล้วนำตะกอนของเซลล์ที่แยกได้มาเลี้ยงใน T25 cm² culture flask (Greiner Bio-One) โดยอาหาร ESCM ที่เติม 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Peprotech) ที่ 37°C ในสภาวะ 5% oxygen และ 5% carbon dioxide เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ในแง่มุมต่างๆต่อไป

2. การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตและ population doubling times

เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารทั้ง 2 ชนิดใน 6 well plate โดยเริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ที่ 5,000 เซลล์/cm² เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นทำการนับเซลล์ทุกๆ 3 วันด้วยวิธี vital Trypan blue staining เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และการคำนวณค่า fold increase ทำโดยการนำค่าจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ของแต่ละวันมาหารด้วยค่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นของวันแรกทำการทดลอง สำหรับการคำนวณค่า population doubling times ทำโดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารทั้ง 2 ชนิดใน 6 well plate โดย

เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ที่ 5,000 เซลล์/cm² เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นทำการนับเซลล์ทุกวันด้วยวิธี vital Trypan blue staining เพื่อนำค่าจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ของแต่ละวันมาเข้าสู่สูตรคำนวณหา population doubling times (PDT) = $\frac{\log 2}{(\log \text{NH} - \log \text{NI})}$ ซึ่ง NI = จำนวนเซลล์เริ่มต้น, NH = จำนวนเซลล์ที่นับได้ และ t = ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ (ชม.) หรือคำนวณค่า PDT จากสูตร online จากเว็บไซต์ www.doubling-time.com

3. การเตรียม ESCM

น้ำเลี้ยงเซลล์ ESCM ได้มาจากการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์หรืออาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ H9 human embryonic stem cells line บน feeder ที่เป็น human foreskin fibroblast เป็นเวลานาน 24 ชม. ซึ่งมี ส่วน ประกอบ ต่างๆ ดังนี้ Knockout-DMEM (Gibco-Invitrogen), 20% Knockout serum replacement (Gibco-Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Sigma), 1mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Gibco-Invitrogen) และ 5 ng/ml human basic fibroblast growth factor (bFGF, Peprotech) จากนั้นนำ ESCM มากรองและเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้สำหรับ unconditioned medium มีขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับ ESCM ทุกอย่าง แตกต่างแค่เพียงอาหารชนิดนี้ไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์เหมือน ESCM

4. การวิเคราะห์โปรตีนบนผิวเซลล์โดยวิธี Flow cytometry

ใช้เซลล์จำนวน 2×10^5 cells เพื่อเป็นกลุ่มตัวอย่างในการตรวจหาโปรตีนบนผิวเซลล์ที่บ่งชี้ถึงคุณลักษณะของ MSCs คือ CD29, CD44 และ CD90 ซึ่งใช้เป็น positive markers นอกจากนี้ยังทำการตรวจหาโปรตีนบนผิวเซลล์ที่บ่งชี้ถึงคุณลักษณะของ Hematopoietic stem cells คือ CD34 และ CD45 ซึ่งใช้เป็น negative markers เพื่อใช้ในการยืนยันคุณลักษณะของเซลล์ที่แยกมาได้ โดยมีวิธี

ทดสอบคร่าวๆดังนี้ นำเซลล์มาปั่นล้างด้วย 2% FBS/PBS จากนั้นนำเซลล์มาเชื่อมด้วย antibody ต่อ markers ต่างๆ คือ CD29-phycoerythrin (PE), CD34-PE, CD44-PE, unconjugated antibody ต่อ CD90 และ CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC) (all from BD Biosciences) ที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างด้วย 2% FBS/PBS และ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde/PBS สำหรับเซลล์ที่เชื่อมด้วย unconjugated antibody ต่อ CD90 ต้องทำการเชื่อมอีกครั้งด้วย antibody ที่ติดฉลากสารเรืองแสง คือ goat-anti-mouse-FITC-conjugated secondary antibody (BD Biosciences) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างด้วย 2% FBS/PBS และทำการตรึงโครงสร้างของเซลล์ด้วย formalin จากนั้นนำเซลล์ที่เชื่อมไปวิเคราะห์โปรตีนบนผิวเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometry รุ่น FACS Calibur (Becton Dickinson) และวิเคราะห์ข้อมูลโดย Cell Quest Software (Becton Dickinson)

5. การสกัด RNA และตรวจหาการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR

ใช้เซลล์จำนวน 1×10^6 cells เพื่อสกัด RNA โดยใช้ชุด Total RNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid) ซึ่งมีวิธีการสกัดตาม protocol ที่แนบมาเก็บลิ้นค้า จากนั้นทำการตรวจหาการแสดงออกของยีนในระดับ RNA โดยขั้นแรกต้องทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ก่อนด้วยชุด RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) จากนั้นจึงทำขั้นตอนต่อไปคือตรวจหาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนเหล่านี้ ดังที่แจกแจงในตารางที่ 1 และตรวจหาการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนเหล่านี้ ดังที่แจกแจงในตารางที่ 2 ซึ่งปฏิกิริยาในการทำ RT-PCR ประกอบไปด้วย 10X PCR buffer, 1 U Taq polymerase, 25 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L dNTP mixed และ 10 μ mol/L of each primer ใน final volume 25 μ l เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว product ที่ได้จะถูกแยกด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้

2% agarose gel และ band ของ product จะถูกตรวจจับ โดยการย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งสามารถมองเห็น band ได้จากการอ่านผ่านแสง UV ในเครื่อง gel doc

ตาราง 1. รายการแสดงชื่อและ sequences ของ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells

Genes	Primer sequence (5' to 3')	Annealing Temp.	Size (bp)	References
<i>Oct-4</i>	GAGCAAAACCCGGAGGAGT TTCTCTTTCGGGCCTGCAC	60	310	(Yao et al., 2006)
<i>Nanog</i>	GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA TTCTTGACTGGGACCTTGTC	60	255	(Yao et al., 2006)
<i>Oct-3/4</i>	CTCACCTGGGGTTCTATT CTCCAGGTTGCCTCTCACTC	60	230	(Darr, Mayshar, & Benvenisty, 2006)
<i>C-myc</i>	TGGTCTCCCCCTACCCTCTCAAC GATCCAGACTCTGACCTTTTGCC	55	265	(Han et al., 2007)
<i>Klf-4</i>	GTTTTGAGGAAGTGCTGAG CAGTCACAGTGGTAAGGTTT	55	332	(Chiambaretta et al., 2004)
<i>Sox-2</i>	GCCCCAGCAGACTTCACA CTCCTCTTTTGCACCCCTCCCATT	64	170	(Tsukamoto et al., 2005)
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACACC GTACTCAGCGGCCAGCATCG	60	302	(Yao et al., 2006)

6. การกระตุ้น WJ-MSCs ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆในสาย mesoderm

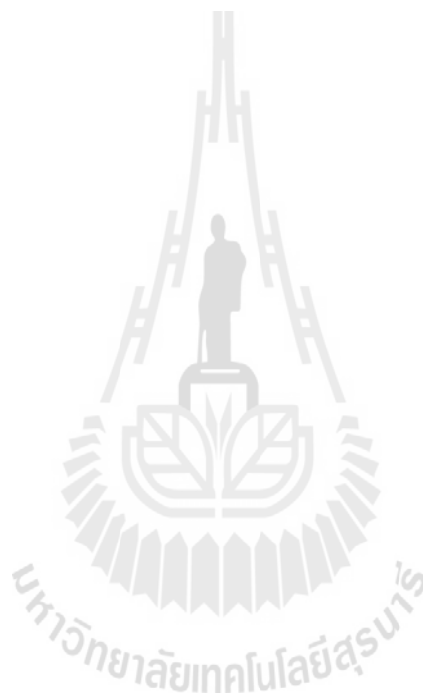
เลี้ยงเซลล์ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 90-100% confluence จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะในสาย mesoderm คือ adipocytes, chondroblast และ osteoblast โดยใช้อาหารสำเร็จรูปเพื่อช่วยกระตุ้น ได้แก่ STEM PRO Adipogenesis Differentiation Kit, STEM PRO Chondrogenesis Differentiation Kit และ STEM PRO Osteogenesis Differentiation Kit (all from Gibco-Invitrogen) เมื่อกระตุ้นเซลล์สำเร็จแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ที่เปลี่ยนไป สำหรับเซลล์ไขมันหรือ adipocytes สามารถตรวจวัดโดยการย้อมสีเม็ดไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยสี oil red O solution (Sigma-Aldrich) สำหรับเซลล์กระดูกอ่อนหรือ chondroblast สามารถตรวจวัดโดยการย้อมสีชั้น proteoglycan ของเซลล์ด้วยสี 1% alcian blue solution (Sigma-Aldrich) และสำหรับเซลล์กระดูกหรือ osteoblast สามารถตรวจวัดโดยการย้อมสีผลึกของแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้นด้วยสี 2% alizarin red S solution (Sigma-Aldrich)

7. การวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์หรือ cell cycle

ใช้เซลล์จำนวน 1×10^6 cells เพื่อเป็นกลุ่มตัวอย่างในการตรวจหาวัฏจักรของเซลล์ โดยนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS และตรึงโครงสร้างของเซลล์ด้วย ice cold 70% ethanol ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นนำมาปั่นล้างอีกครั้งและย้อม DNA ของเซลล์ด้วยสี propidium iodide/RNase A solution (Becton Dickinson) ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด จากนั้นนำเซลล์เหล่านี้ไปตรวจหาวัฏจักรของเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometry รุ่น FACS Calibur (Becton Dickinson) และวิเคราะห์ข้อมูลโดย Cell Quest Software (Becton Dickinson)

8. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษานี้ได้ใช้ Student's t-test ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดย statistical software SPSS17.0 ซึ่งถือว่าข้อมูลใด ๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และทุกข้อมูลถูกแสดงผลเป็น $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$

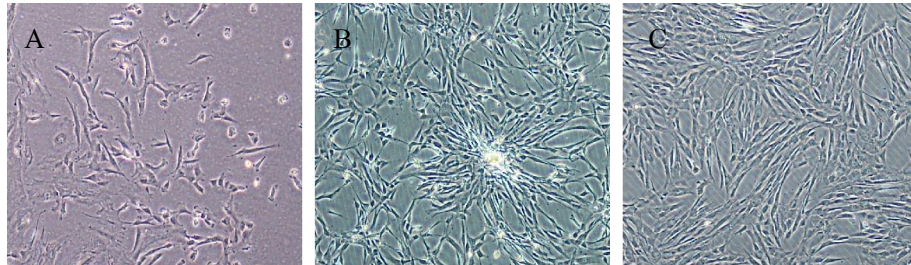


บทที่ 3

ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล

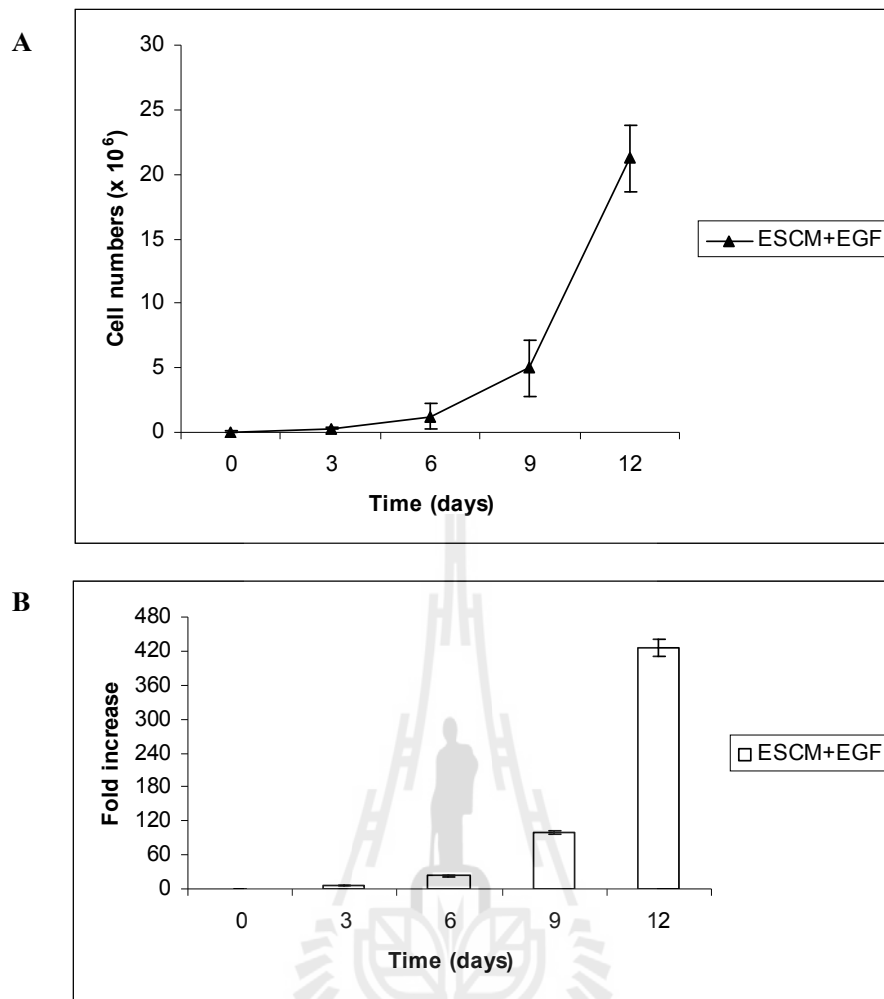
1. อัตราการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้ได้ทำการเลี้ยง WJ-MSCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM ที่เติม growth factor คือ EGF เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ในแ่งมุมต่างๆ ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ได้เป็นอย่างดี และเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้มีรูปร่างเรียวยาวเหมือน fibroblast ไม่แตกต่างจากลักษณะของ MSCs ทั่วไป (ภาพ 1) เป็นที่เด่นชัดว่า ESCM+EGF สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เป็นอย่างดี จากการทดลองเลี้ยงเซลล์ภายในเวลา 12 วัน หรือประมาณ 2 สัปดาห์พบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วย ESCM ที่มี 10 ng/mL EGF เป็นส่วนประกอบสามารถขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงถึง $21.24 \pm 2.58 \times 10^6$ เซลล์ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนได้สูง 424.88 ± 14.62 เท่าเมื่อเทียบกับจำนวนเริ่มต้น (ภาพ 2) จากข้อมูลเหล่านี้สรุปได้ว่า ESCM+EGF สามารถสนับสนุนและกระตุ้นการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งเป็นผลดีต่อความต้องการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อใช้ในทางคลินิก นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบหาค่าเฉลี่ยของเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวพบว่า เซลล์เหล่านี้มีการแบ่งตัวค่อนข้างเร็วประมาณ 33.57 ± 1.00 ชม. ในช่วง passage ต้นๆ (P4) และ 35.70 ± 1.60 ชม. ในช่วง passage ปลายๆ (P7) (ภาพ 3)



ภาพ 1. รูปร่างลักษณะของ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF นาน 8 วัน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (A) ลักษณะความหนาแน่นของเซลล์แบบ sub-confluence (B) และแบบ confluence (C) กำลังขยาย 40x

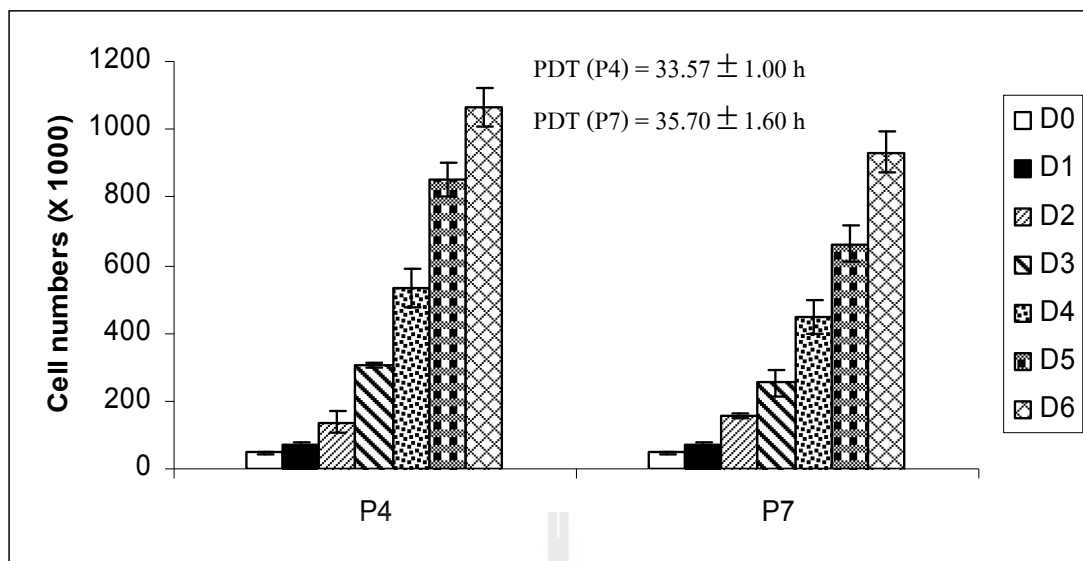




ภาพ 2. อัตราการเจริญเติบโต (A) และอัตราการเพิ่มจำนวน (B) ของ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร

เลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ในระยะเวลา 12 วันภายใต้สภาวะอ็อกซิเจนต่ำ ข้อมูลถูกแสดงเป็น mean $\pm$

SD (n = 3)

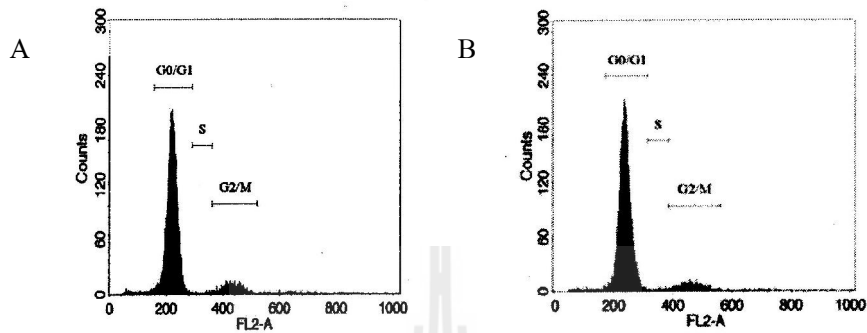


ภาพ 3. ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัว (PDT) เมื่อ WJ-MSCs ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำทั้งในช่วงต้น (P4) และปลาย (P7) ของการเลี้ยงเซลล์ ข้อมูลถูกแสดงเป็น mean $\pm$ SD (n = 3)

2. วัฏจักรของเซลล์หรือ cell cycle

เพื่อศึกษาผลกระทบของอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ต่อความเป็นปกติของเซลล์ การศึกษานี้ได้นำเซลล์มาวิเคราะห์หาวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งพบว่าเซลล์ในช่วง passage ต้นๆ (P4) วงจรชีวิตของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้เข้าสู่ระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ DNA หรือระยะ G_0/G_1 เท่ากับ $84.72 \pm 1.1\%$ เข้าสู่ระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์ DNA หรือระยะ S เท่ากับ $0.81 \pm 0.08\%$ และเข้าสู่ระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์หรือระยะ G_2/M เท่ากับ $8.08 \pm 0.05\%$ (ภาพ 4A) นอกจากนี้เซลล์ในช่วง passage ปลายๆ (P7) วงจรชีวิตของเซลล์เข้าสู่ระยะ G_0/G_1 เท่ากับ $87.96 \pm 0.12\%$ เข้าสู่ระยะ S เท่ากับ $0.9 \pm 0.16\%$ และเข้าสู่ระยะ G_2/M เท่ากับ $9.59 \pm 0.49\%$ (ภาพ 4B) จากข้อมูลเหล่านี้สรุปได้ว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยง

เซลล์ ESCM+EGF มีวงจรชีวิตของเซลล์เป็นปกติซึ่งส่วนใหญ่แล้วอยู่ในระยะ G_0/G_1 ไม่แตกต่างจากเซลล์ทั่วไป แม้เข้าสู่ช่วงปลายของการเลี้ยงเซลล์



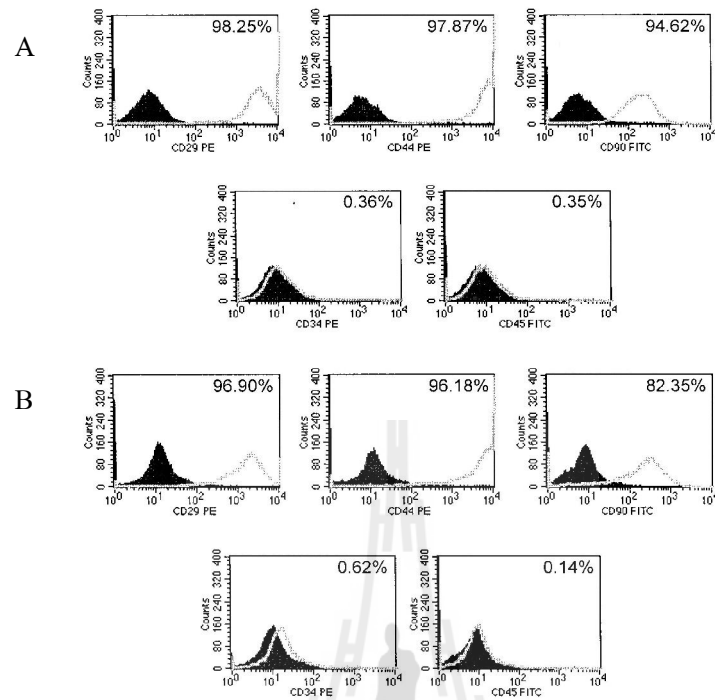
ภาพ 4. สัดส่วนของการแสดงออกโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs ในช่วงปลาย (P7) ของการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะออกซิเจนต่ำหรือ hypoxic เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไป DMEM-LG+10% FBS (A) และอาหาร ESCM (B) ค่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกโปรตีนบนผิวเซลล์ของแต่ละโปรตีนสรุปในกราฟแท่งโดยเฉลี่ย (C) ข้อมูลถูกแสดงเป็น mean $\pm$ SD (n = 3)

3. การทดสอบคุณลักษณะและคุณสมบัติของ WJ-MSCs

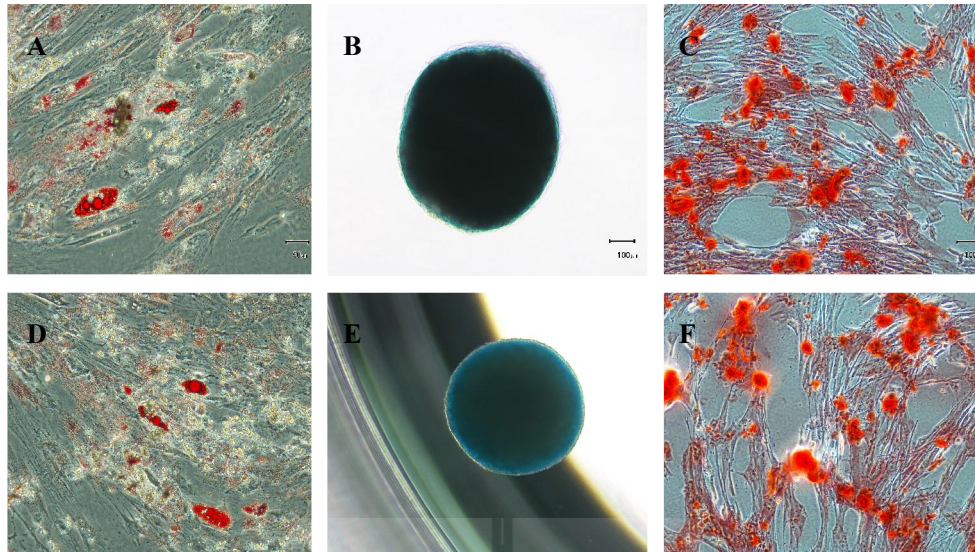
เพื่อศึกษาผลกระทบของอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ต่อความสามารถของเซลล์ในการรักษาลักษณะและคุณสมบัติของความเป็น MSCs อันดับแรกคือการแสดงออกของกลุ่มโปรตีนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ซึ่งเป็น positive markers ของ MSCs ได้แก่ CD29, CD44 และ CD90 พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ มีการแสดงออกของ CD29 และ CD44 มากกว่า 90% ในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์ (P4) และเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของการเลี้ยงเซลล์ (P7) กลุ่มโปรตีนเหล่านี้ยังคงถูกแสดงออกในสัดส่วนใกล้เคียงกัน สำหรับ CD90 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้สูงเช่นเดียวกันในช่วงต้นของการเลี้ยงเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายของการเลี้ยงเซลล์ พบว่า

มีการแสดงออกของ CD90 ในสัดส่วนที่ลดลงเล็กน้อย (ภาพ 5) นอกจากนี้พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของกลุ่มโปรตีนที่จำเพาะต่อ Haematopoietic stem cells คือ CD34 และ CD45 ซึ่งใช้เป็น negative markers ในสัดส่วนที่ต่ำมากไม่ถึง 1%

การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะในสายของ mesoderm ก็เป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของ MSCs ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดชนิดนี้สามารถถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes, chondroblast และ oseteoblast ได้เป็นอย่างดีทั้งในช่วงต้นและปลายของการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยการย้อมติดสีแดงของเม็คไวมันที่ถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ adipocytes ย้อมติดสีน้ำเงินของ proteoglycan ที่ถูกสร้างขึ้น โดยเซลล์ chondroblast และย้อมติดสีส้มแดงของฟลิกแคลเซียมที่ถูกสร้างขึ้น โดยเซลล์ oseteoblast (ภาพ 6) จากข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ได้ว่า นอกจาก ESCM+EGF จะสามารถสนับสนุนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ได้แล้ว ยังสามารถรักษาคูณลักษณะและคุณสมบัติของความเป็น MSCs ของเซลล์ได้เป็นอย่างดี



ภาพ 5. สัดส่วนการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำทั้งในช่วงต้น (P4) (A) และปลาย (P7) (B) ของการเลี้ยงเซลล์



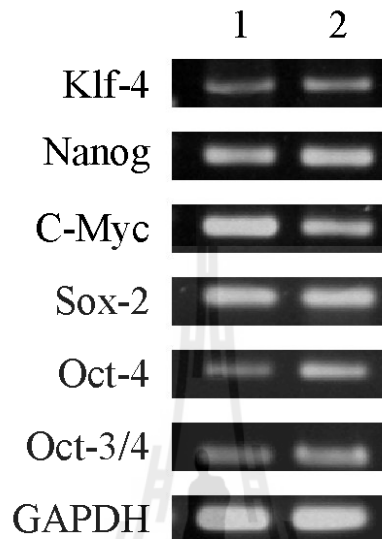
ภาพ 6. ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes, chondroblast และ osteoblast ของ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำทั้งในช่วงต้น (P4) (A-C) และปลาย (P7) (D-F) ของการเลี้ยงเซลล์ กำลังขยายสำหรับภาพ adipocytes, chondroblast และ osteoblast คือ 200x, 100x และ 40x ตามลำดับ

4. การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells

การศึกษาผลกระทบของอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ต่อความสามารถของเซลล์ในการรักษาสภาพความเป็น stem cells พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF สามารถแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells ได้ เช่น *Oct-4*, *Oct-3/4*, *Nanog*, *Klf-4*, *C-Myc* และ *Sox-2* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงถึงความอ่อนเยาว์ของเซลล์ โดยสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระดับที่ใกล้เคียงกันทั้งในช่วงต้นและปลายของการเลี้ยงเซลล์ (ภาพ 7) และเป็นที่น่าสนใจว่าแม้เข้าสู่ช่วงปลายของการเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้ยังคงสามารถรักษาความอ่อนเยาว์ของความเป็น stem cells เอาไว้ได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่านอกจาก

ESCM+EGF จะสามารถสนับสนุนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ได้เป็นอย่างดีแล้ว

ESCM+EGF ยังสามารถรักษาสภาพความอ่อนเยาว์ของ stem cells ได้ดีอีกด้วย



ภาพ 7. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็น stem cells ของ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM+EGF ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำทั้งในช่วงต้น (P4) (lane1) และปลาย (P7) (lane2) ของการเลี้ยงเซลล์

บทที่ 4

ข้อวิจารณ์

การศึกษาเรีวนี้นพบว่า MSCs มีความสามารถในการรักษาโรคทางคลินิกบางชนิดเช่น osteogenesis imperfecta (Horwitz et al., 1999) และ myocardial infarction (Stamm et al., 2003) เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต้องใช้เซลล์จำนวนมาก ดังนั้นการเพิ่มหรือขยายจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สายสะดือรกจากเด็กแรกเกิดโดยเฉพาะส่วน Wharton's jelly เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่อุดมไปด้วย MSCs ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่าแหล่งอื่นๆเนื่องจากสายสะดือรกมีความอ่อนเยาว์และ primitive มากกว่า (Weiss & Troyer, 2006) นอกจากนี้ยังง่ายต่อการเก็บตัวอย่างอีกด้วย การศึกษานี้ได้ทำการเลี้ยง WJ-MSCs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM ที่ผสมด้วย growth factor คือ EGF เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ในแง่มุมต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโต, รูปร่างลักษณะของเซลล์, การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์, ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะในสาย mesoderm, การแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความเป็น stem cells และวัฏจักรของเซลล์หรือ cell cycle

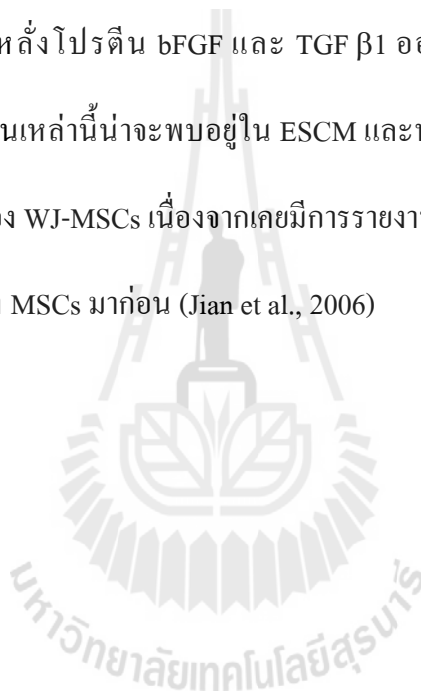
เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิผลของการแยกเซลล์พบว่า การศึกษานี้สามารถแยก MSCs ออกจากเนื้อเยื่อสายสะดือรกส่วน Wharton's jelly ได้สูงถึง 5,000 เซลล์ต่อกรัมของชิ้นเนื้อ แต่อย่างไรก็ตาม อัตรานี้ยังคงต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลของการแยกเซลล์จากการศึกษาอื่นๆ (Karahuseyinoglu et al., 2007; Schugar et al., 2009) ซึ่งความแตกต่างนี้อาจสืบเนื่องมาจากความหลากหลายของวิธีการแยกเซลล์รวมทั้งสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ของแต่ละการศึกษา นอกจากนี้พบว่า ESCM+EGF สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนได้สูง 424.88 ± 14.62 เท่าเมื่อเทียบกับจำนวนเริ่มต้น การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า ESCM+EGF สามารถสนับสนุนและส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของ WJ-MSCs ได้ดีโดยเฉพาะในระยะเวลาสั้นๆภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งสามารถตอบรับกับความต้องการใช้เซลล์จำนวนมากในทางคลินิกได้เป็นอย่างดีโดยเฉพาะในเวลาจำกัด

ยีน *Oct-4*, *Sox-2* และ *Nanog* คือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ transcription factors ที่สำคัญในการรักษาสภาวะ pluripotency และ self-renewal ของ ES เซลล์ (Chambers & Tomlinson, 2009) สำหรับ MSCs พบว่ากลุ่มยีนเหล่านี้ก็มีความสำคัญในการรักษาสภาพความอ่อนเยาว์ของเซลล์เช่นเดียวกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การปรับแต่งยีนของ MSCs โดยใช้ lentiviral system เพื่อกระตุ้นให้เกิด overexpression ของยีน *Oct-4* และ *Nanog* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เหล่านั้นมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นในขณะที่ยังคงรักษาสภาพความอ่อนเยาว์ของ stem cells เอาไว้ได้ (Liu et al., 2009) เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้ เป็นที่น่าสนใจว่าแม้เข้าสู่ช่วงปลายของการเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์เหล่านี้ยังมีการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงความอ่อนเยาว์ของ stem cells จากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ ESCM+EGF ในการสนับสนุนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs พร้อมทั้งสามารถคงสภาพความอ่อนเยาว์ของ stem cells เอาไว้ได้

เมื่อพิจารณาถึงสาเหตุที่ทำให้ ESCM มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เป็นอย่างดี พบว่าปัจจัยหลักๆน่าจะมาจาก growth factors หรือ cytokines ต่างๆที่อยู่ในอาหารนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า human foreskin fibroblast ซึ่งทำหน้าที่เป็น feeder ให้กับ ES เซลล์สามารถหลั่ง bFGF ซึ่งเป็น growth factor ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการรักษาสภาวะ pluripotency และความอ่อนเยาว์ของ ES เซลล์ (Park et al., 2011) และการศึกษาต่อมาได้ช่วยสนับสนุนความสำคัญของ bFGF ต่อ ES เซลล์ ซึ่งพบว่าแม้ ES เซลล์ไม่ได้ถูกเลี้ยงบน feeder ก็สามารถรักษาสภาวะ pluripotency และความอ่อนเยาว์ไว้ได้ โดยการเติม bFGF เข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ทดแทนจากการขาด feeder (Levenstein et al., 2006) สำหรับ MSCs มีการศึกษาพบว่า bFGF สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เช่นกัน (Bianchi et al., 2003) จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้ได้ข้อ

สันนิษฐานว่า bFGF ที่ถูกหลั่งจาก feeder ออกมาใน ESCM น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ในการศึกษา^{นี้} นอกจากนี้ตัว ES เซลล์เอง น่าจะมีการหลั่ง factors ต่างๆ ออกมาร่วมด้วยใน ESCM ดังนั้นนอกจาก bFGF แล้วน่าจะมี growth factors หรือ cytokines อื่นๆด้วย ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs ซึ่งหนึ่งในนั้นมี EGF รวมอยู่ด้วย เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า EGF สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ MSCs ได้เป็นอย่างดี (Tamama, Fan, Griffith, Blair, & Wells, 2006) เช่นเดียวกันกับการศึกษา^{นี้} นอกจากนี้มีการรายงาน^{ว่า} human H1/H9 ES cells line สามารถหลั่งโปรตีน bFGF และ TGF β 1 ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ (Bendall et al., 2009) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้^{น่าจะ}พบอยู่ใน ESCM และน่าจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ WJ-MSCs เนื่องจากเคยมีการรายงาน^{ว่า}โปรตีนเหล่านี้มีศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ MSCs มาก่อน (Jian et al., 2006)



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

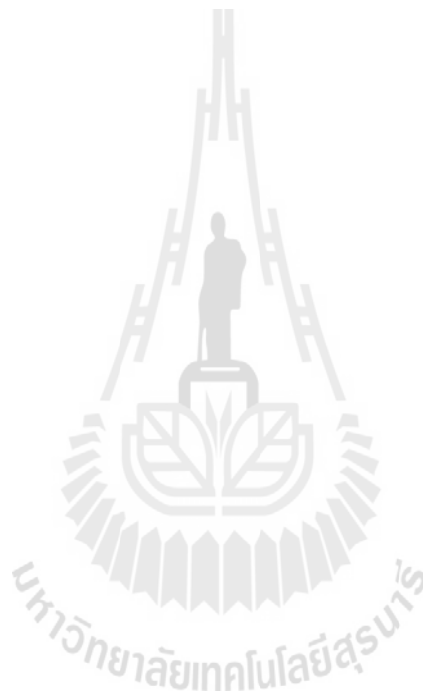
1. สรุป

โครงการนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวน mesenchymal stem cells ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงโดยสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากขึ้นเป็นจำนวนหลายเท่าอย่างมีนัยสำคัญในระยะเวลาที่สั้นลง ซึ่งจะสามารถแก้ปัญหาเรื่องการที่มีเซลล์ต้นกำเนิดอย่างจำกัดคือมีจำนวนน้อยไม่พอต่อการรักษาโรค ทำให้การรักษาโรคในผู้ป่วยให้ผลสำเร็จไม่สูงเท่าที่ควร นอกจากนี้วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบใหม่นี้ ยังสามารถคงคุณสมบัติความเป็น mesenchymal stem cells ของเซลล์ที่เลี้ยงได้รวมทั้งคงความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้ เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมได้แก่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็น osteocyte, chondrocyte และ adipocyte ซึ่งเป็นความสามารถหลักของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ นอกจากนี้หลังจากกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์แล้ว เซลล์ที่ได้ยังสามารถนำมาเก็บแช่แข็งและนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายรอบ ทำให้สามารถเก็บเซลล์ต้นกำเนิดไว้ใช้ในระยะเวลาได้ อีกทั้งยังช่วยลดงบประมาณในการเลี้ยงและเตรียมเซลล์ รวมทั้งไม่ต้องเก็บเซลล์จากผู้ป่วยหรือผู้บริจาคบ่อยครั้ง

วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบใหม่นี้ยังใช้น้ำยาที่เป็น animal serum free ทำให้สามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีในทางการแพทย์และยังสามารถเก็บแช่แข็งเป็นธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดไว้ใช้ในอนาคตในยามที่ต้องการ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อสังคมโดยรวม อีกทั้งยังช่วยทำให้การวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดของประเทศไทยมีความก้าวหน้าอีกทางหนึ่งและเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันในระดับนานาชาติของประเทศไทยโดยรวม

2. ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ควรมีการต่อยอดในการศึกษาการนำเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์นี้ไปทดสอบการรักษาโรคในสัตว์ทดลอง เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคตับ เป็นต้น นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้สามารถศึกษาต่อในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกหรือ mechanism ของเซลล์ที่ตอบสนองต่อ ESCM ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทดสอบกับสารโปรตีนที่สนใจแต่ละตัวและศึกษาถึงการแสดงออกทั้งในระดับยีนและโปรตีนของกลุ่ม signaling pathway ต่างๆที่สนใจต่อไปได้



บรรณานุกรม

- Baharvand, H., Hashemi, S. M., Kazemi Ashtiani, S. and Farrokhi, A. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol.* 50(7): 645-652.
- Baksh, D., Yao, R. and Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 25(6): 1384-1392.
- Battula, V. L., Bareiss, P. M., Treml, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S. and Buhring, H. J. (2007). Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation.* 75(4): 279-291.
- Bendall, S. C., Hughes, C., Campbell, J. L., Stewart, M. H., Pittock, P., Liu, S. and Lajoie, G. A. (2009). An enhanced mass spectrometry approach reveals human embryonic stem cell growth factors in culture. *Mol Cell Proteomics.* 8(3): 421-432.
- Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R. and Quarto, R. (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res.* 287(1): 98-105.
- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H. and Deng, H. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology.* 45(5): 1229-1239.

- Campard, D., Lysy, P. A., Najimi, M. and Sokal, E. M. (2008). Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology*. 134(3): 833-848.
- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 213(2): 341-347.
- Chambers, I. and Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 136(14): 2311-2322.
- Chao, K. C., Chao, K. F., Fu, Y. S. and Liu, S. H. (2008). Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*. 3(1): e1451.
- Chen, X. and Zeng, F. (2011). Directed hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Protein Cell*. 2(3): 180-188.
- Chiambaretta, F., De Graeve, F., Turet, G., Marceau, G., Gain, P., Dastugue, B. and Sapin, V. (2004). Cell and tissue specific expression of human Kruppel-like transcription factors in human ocular surface. *Mol Vis*. 10: 901-909.
- Chien, C. C., Yen, B. L., Lee, F. K., Lai, T. H., Chen, Y. C., Chan, S. H. and Huang, H. I. (2006). In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cells*. 24(7): 1759-1768.
- Darr, H., Mayshar, Y. and Benvenisty, N. (2006). Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 133(6): 1193-1201.

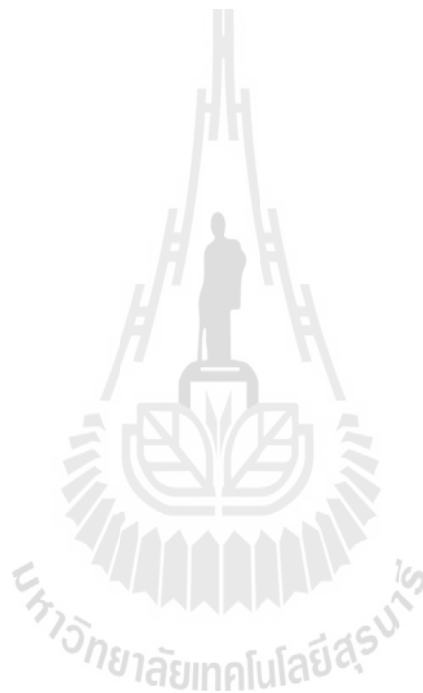
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4): 315-317.
- Dos Santos, F., Andrade, P. Z., Boura, J. S., Abecasis, M. M., da Silva, C. L. and Cabral, J. M. (2010). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 223(1): 27-35.
- Enomoto, H., Nakamura, H., Liu, W., Yoshida, K., Okuda, Y., Imanishi, H. and Nishiguchi, S. (2009). Hepatoma-derived growth factor is induced in liver regeneration. *Hepatol Res*. 39(10): 988-997.
- Enomoto, H., Yoshida, K., Kishima, Y., Kinoshita, T., Yamamoto, M., Everett, A. D. and Nakamura, H. (2002). Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology*. 36(6): 1519-1527.
- Han, J. C., Zhang, K. L., Chen, X. Y., Jiang, H. F., Kong, Q. Y., Sun, Y. and Liu, J. (2007). Expression of seven gastric cancer-associated genes and its relevance for Wnt, NF-kappaB and Stat3 signaling. *APMIS*. 115(12): 1331-1343.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M. and Brenner, M. K. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 5(3): 309-313.
- in 't Anker, P. S., Noort, W. A., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A. B., van Bezooijen, R. L. and Fibbe, W. E. (2003). Mesenchymal stem cells in human second-

- trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 88(8): 845-852.
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E. and Kanhai, H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 22(7): 1338-1345.
- Jian, H., Shen, X., Liu, I., Semenov, M., He, X. and Wang, X. F. (2006). Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev*. 20(6): 666-674.
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O. and Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 25(2): 319-331.
- Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D. and Thomson, J. A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*. 24(3): 568-574.
- Liu, T. M., Wu, Y. N., Guo, X. M., Hui, J. H., Lee, E. H. and Lim, B. (2009). Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 18(7): 1013-1022.
- Majore, I., Moretti, P., Hass, R. and Kasper, C. (2009). Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal*. 7: 6.

- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L. and Medicetty, S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 21(1): 50-60.
- Park, Y., Kim, J. H., Lee, S. J., Choi, I. Y., Park, S. J., Lee, S. R. and Kim, B. S. (2011). Human Feeder Cells Can Support the Undifferentiated Growth of Human and Mouse Embryonic Stem Cells Using Their Own Basic Fibroblast Growth Factors. *Stem Cells Dev*.
- Pereira, W. C., Khushnooma, I., Madkaikar, M. and Ghosh, K. (2008). Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2(7): 394-399.
- Schugar, R. C., Chirieleison, S. M., Wescoe, K. E., Schmidt, B. T., Askew, Y., Nance, J. J. and Deasy, B. M. (2009). High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*. 2009. 789526.
- Sidhu, J. S., Liu, F. and Omiecinski, C. J. (2004). Phenobarbital responsiveness as a uniquely sensitive indicator of hepatocyte differentiation status: requirement of dexamethasone and extracellular matrix in establishing the functional integrity of cultured primary rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. 292(2): 252-264.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H. and Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 361(9351): 45-46.
- Talens-Visconti, R., Bonora, A., Jover, R., Mirabet, V., Carbonell, F., Castell, J. V. and Gomez-Lechon, M. J. (2006). Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from

- adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 12(36): 5834-5845.
- Tamama, K., Fan, V. H., Griffith, L. G., Blair, H. C. and Wells, A. (2006). Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24(3): 686-695.
- Troyer, D. L. and Weiss, M. L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 26(3): 591-599.
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J. and Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 19(6): 1450-1456.
- Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Mihara, M., Tanaka, H., Takenaka, Y., Yamamura, Y. and Tatematsu, M. (2005). Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology.* 46(6): 649-658.
- Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J. and Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 22(7): 1330-1337.
- Weiss, M. L. and Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2(2): 155-162.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A. and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(18): 6907-6912.

- Zhang, Y. N., Lie, P. C. and Wei, X. (2009). Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 11(5): 548-558.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H. and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13(12): 4279-4295.



ภาคผนวก

1. การเตรียม complete DMEM (cDMEM)

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- DMEM (low glucose)	10.00	g
- FBS	100.00	ml
- NaHCO_3	3.70	g
- 1000 U/ml Penicillin/1000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin	10.00	ml
- 2 mg/ml Amphotericin B	0.20	ml

เติมน้ำ sterile ultra-pure water เพื่อให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่าง

ที่ pH 7.4 และนำไปกรองเพื่อ sterile

2. การเตรียม PBS

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- NaCl	8.00	g
- Na_2HPO_4	1.44	g
- KCl	0.20	g
- KH_2PO_4	0.24	g

เติมน้ำ sterile ultra-pure water เพื่อให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่าง

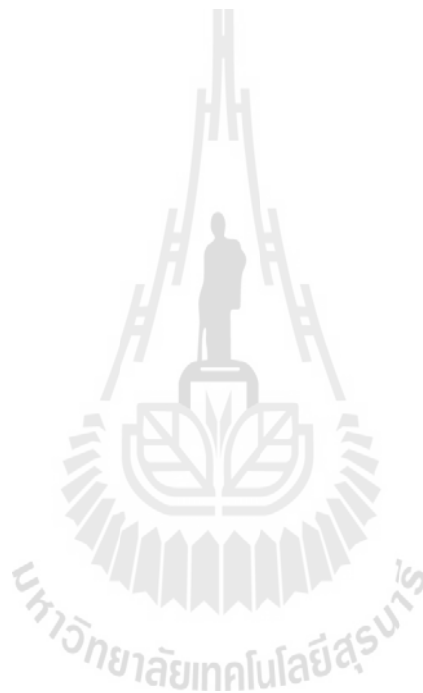
ที่ pH 7.4 และนำไป autoclave เพื่อ sterile ที่ 121°C นาน 15 นาที

3. การเตรียม 0.25% Trypsin/EDTA

ชั่งตวงและผสมสารต่างๆเหล่านี้เข้าด้วยกัน

- Trypsin 0.25 g
- EDTA 0.04 g

เติมสาร sterile PBS เพื่อให้ได้ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปกรองเพื่อ sterile



ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์ (พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์ และ เซลล์ต้นกำเนิด ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน stem cell transplantation and stem cell regulation ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ National Institute of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2545-2546) ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ทำงานในตำแหน่งอาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์วิไลรัตน์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล Excellent Research Award (Stem cell), USA, Key Stone Symposium (พ.ศ. 2550), American Society of Hematology Traveling Award, USA (พ.ศ. 2546), Traveling Award, International Society for Stem Cell Research, Australia (พ.ศ.2547) / USA (พ.ศ. 2551), รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล พ.ศ. 2551-2554 และ รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นด้านวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบันอาจารย์วิไลรัตน์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 30 ผลงาน สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 e-mail : wilairat@g.sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2509 สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี วท.บ. แพทยศาสตร์ (พ.ศ. 2533) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Diploma Thai Board สาขา Anatomical Pathology จาก ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จากนั้นได้ศึกษา ต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Pathology ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2543 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน Molecular Pathology ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2544) ปัจจุบัน อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม ทำงานในตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาพยาธิวิทยา และเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชา พยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบันอาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 15 ผลงาน และผลงานจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง “A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999 Joy L Ware, ChavaboonDechsukhum, Carleton T Garrett (Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia) สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาพยาธิ วิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 _ e-mail : chavaboon@sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว พัชรี ปราศจาก เกิดวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2523 สถานที่เกิด จ.ปราจีนบุรี สำเร็จวุฒิ
การศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาเทคนิคการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยมหิดลในปี พ.ศ. 2546
และสำเร็จวุฒิการศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. สาขาจุลชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยมหิดลในปี พ.ศ.
2549 นางสาว พัชรี ได้รับรางวัล International Society for Stem Cell Research (ISSCR) travel
award in ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain พ.ศ. 2552 สถานที่ติดต่อ สาขาวิชา
จุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี
อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

