วิลาสินี พรมจันทึก : การประยุกต์ใช้เทคนิคความเป็นอมตะของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ผ่านกลไกของเซอทูอีนวันและศึกษาถึงความเกี่ยวเนื่องของไมโครอาร์เอ็นเอ (TECHNOLOGICAL APPROACHES FOR IMMORTALIZATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS THROUGH SIRT1 AND THE INVOLVEMENT OF MICRO-RNA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา น้อยสา, 110 หน้า

เซลล์ผิวหนังมนุษย์ทำหน้าที่สำคัญในการสร้างคอลลาเจน และอิลาสติน เพื่อใช้สำหรับการซ่อมแซมและรักษาบาดแผลในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเซลล์ผิวหนังมนุษย์ถูกนำมาใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาสรีรวิทยาของเซลล์ อีกทั้งยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมความงาม อย่างไรก็ตามเซลล์ผิวหนังมนุษย์มีข้อจำกัดในเรื่องของการเพิ่มจำนวนและการเข้าสู่ภาวะชราของเซลล์นำไปสู่การตายของเซลล์อย่างรวดเร็ว การเพิ่มปริมาณของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ได้อย่างไม่จำกัดจึงมีความสำคัญต่อภาวะอมตะของเซลล์ หรือการหลีกหนีความชราของเซลล์ เทโลเมียร์ และเอนไซม์เทโลเมอเรส ซึ่งเป็นหนึ่งในแนวทางการเป็นอมตะของเซลล์ เนื่องจากเทโลเมียร์เป็นดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณปลายสุดของโครโมโซม มีกลไกสำคัญในการควบคุมความชราของเซลล์ เปรียบเสมือนนาฬิกาชีวิตของเซลล์ นอกจากนี้ Simian virus 40 (SV40) large T antigen ในเซลล์ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้โดยการไปยับยั้ง pRB และ p53 ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะอมตะของเซลล์ผิวหนังมนุษย์โดยการส่งถ่ายพลาสมิด hTERT, SV40 large T antigen และการทำงานร่วมกันของทั้งสองพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพื่อชักนำให้เกิดภาวะอมตะของเซลล์ และเพิ่มปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะอมตะ สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อการเลี้ยงได้มากกว่า 60 ครั้งของการเลี้ยง และมีการทำงานของเทโลเมียร์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังไม่มีการแสดงออกของลักษณะการกลายเป็นเซลล์มะเร็งโดยการทดสอบโคโลนีฟอร์เมชั่น การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะอมตะถูกตรวจสอบด้วยการแสดงออกของยีน ได้แก่ คอลลาเจน1ชนิด1 คอลลาเจน3ชนิด1 อีลาสติน ไวเมนติน และ p53 พบว่า มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากเซลล์ปกติ สอดคล้องกับการแสดงออกของเซอทูอีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ ผลที่ได้จากการแสดงออกของยีนถูกนำมาศึกษาต่อในระดับโปรตีนด้วยวิธีการย้อมสีโปรตีนด้วยแอนติบอดี้หรือที่เรียกว่าเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ การเพิ่มขึ้นของโปรตีนเซอทูอีนถูกตรวจสอบกลไกการทำงานด้วยการส่งถ่าย shRNA เพื่อลดการแสดงออกของเซอทูอีน เรสเวราทอลถูกใช้เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของเซอทูอีน และเซอทีนอลซึ่งเป็นตัวยับยั้งการแสดงของเซอทูอีน จากผลการทดสอบพบว่า เซลล์ที่ถูกลดการแสดงออก

ของเซอทูอีน มีการแสดงออกของภาวะชรา โดยไซโทพลาซึมมีลักษณะแบนนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น และการแบ่งตัวของเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นกลไกการทำงานของเซอทูอินจึงถูกนำมาศึกษาต่อ มีรายงานการนำไมโครอาร์เอ็นเอมาศึกษาความเกี่ยวข้องในการยับยั้งการถอดรหัสของโปรตีน และการควบคุมกลไกต่างๆ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความชรา และภาวะอมตะของเซลล์ ดังนั้นเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะอมตะจึงถูกทดสอบความเกี่ยวข้องกับไมโครอาร์เอ็นเอและเซอทูอีนด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ พบว่า มีไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับเซอทูอีนและภาวะอมตะของเซลล์ ได้แก่ ไมโครอาร์เอ็นเอ 22 34เอ 93 217 และ449 นอกจากนี้ยังไม่มีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 217 ในเซลล์ แตกต่างจากไมโครอาร์เอ 22 และ 449 ที่มีการแสดงออกสูงในเซลล์ที่ถูกส่งถ่ายด้วย SV40 large T antigen และไมโครอาร์เอ็นเอ 93 มีการแสดงออกสูงในเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนโดยเทริตพลาสมิด เป็นที่น่าสนใจว่ามีการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอ 34เอ ลดลงในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่กระตุ้นให้เกิดภาวะอมตะ ซึ่งการลดลงของไมโครอาร์เอ็นเอ 34เอ อาจจะส่งผลต่อการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ถึงแม้ว่าผลลัพธ์จะสอดคล้องกันแต่กลไกที่แน่ชัดระหว่างไมโครอาร์เอ็น และเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่กระตุ้นให้เกิดภาวะอมตะที่ถูกส่งถ่ายด้วยพลาสมิดทั้งสองชนิดยังคงต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อการพัฒนาสู่แบบจำลองเซลล์ผิวหนังสามมิติที่สมบูรณ์แบบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา Wilasinee P.

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

WILASINEE PROMJANTUEK: TECHNOLOGICAL APPROACHES FOR IMMORTALIZATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS THROUGH SIRT1 AND THE INVOLVEMENT OF MICRO-RNA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PARINYA NOISA, Ph.D., 110 PP.

HUMAN DERMAL FIBROBLAST/IMMORTALIZATION/SIRT1/MIRNA

Human dermal fibroblasts are some of the skin cells that act as a collagen and elastin production source in connective tissue for wound healing. Fibroblasts can be used as a model in the study of skin physiology. The advantages of fibroblasts have been exploited continuously in cosmetic and medical therapeutics. However, fibroblasts have limitations of cell proliferation and entering cellular senescence and leads to cell death. Immortalization or escape senescence can help to increase unlimited cell proliferation. The telomere length and telomerase enzyme are the components maintaining the integrative structure at the end of chromosome. Telomere is an important mechanism that controls the aging of cells or also known as a biological clock, in which telomere and telomerase can increase cell proliferation. In addition, the Simian virus 40 large T antigen can improve cell viability by suppressing *pRB* and *p53*. Therefore, the primary aim of these studies was to discover the mechanism of immortalized fibroblasts. Plasmids were transfected into fibroblasts to induce immortalization and increase cell proliferation by overexpression of plasmid hTERT, SV40 large T antigen and co-transfection. The results showed that immortalized cells can be sub-cultured over 60 passages and increase telomere activity and behave as non-tumor cells by colony formation. Further, immortalized cells investigated the

efficiency of cells by the fibroblasts markers such as *COL1A1*, *COL3A1*, *ELASTIN* and *VIMENTIN*. In addition, the *p53* expression was increased in the immortalized cells in accordance with *SIRT1*. The relationship of these genes was demonstrated in the protein levels by immunofluorescence technique. The role of increasing the SIRT1 level was investigated via shRNA-knockdown transfection then treated the activator SIRT1 or resveratrol and the sirtinol inhibitor SIRT1. These results suggested that knockdown SIRT cells showed the characteristics of cellular senescence such as the flattened of cytoplasm, large nucleus and distinct decreased passage. Therefore, the SIRT1 mechanism should be further studied. In the present, several roles of miRNA have been reported in protein translated inhibition which are relevant in the control of ageing and immortalization. Immortalized cells were found to involve in miRNA-SIRT1 by the prediction and analysis with qPCR including miR-22, miR-34a, miR-93, miR-217 and miR-449a. The results showed that miR-217 was not involved in the immortalized cells. Nevertheless, miR-22 and miR-449a were highly up-regulated in SV40 large T antigen-transfected cells. MiR-93 was extremely expressed in hTERT-transfected cells. Interestingly, miR-34a was down-regulated in the immortalized cells, in which the suppression of miR-34a could increase cell proliferation. This connection between SIRT1 and miRNAs will need further exploration. The successful immortalized fibroblasts could be further developed for cosmeceutical screening, such as the development of 3D-skin models.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology Student's Signature Wlasinee P.

Academic Year 2017 Advisor's Signature