จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ : การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจากเซลล์ตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว (EMBRYONIC STEM CELL LINES ESTABLISHMENT FROM MOUSE SINGLE BLASTOMERE) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 184 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีระบบภูมิคุ้มกันเหมือนกับเจ้าของเซลล์ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ตัวอ่อนหนูเป็นตัวอย่าง ในการทดลองนี้ได้เริ่มจากการศึกษาระบบการเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนหนูในหลอดแก้วเพื่อให้เจริญสู่ระยะบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่าเซลล์ตัวอ่อนหนูที่แยกจากตัวอ่อนระยะสองและสี่เซลล์สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสและเจริญเป็น outgrowth ได้ดีในหลอดแก้ว จากนั้นได้นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่เจริญมาจากตัวอ่อนตั้งต้นตัวเดียวกันมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงออกถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือ Oct-4 และ Sox-2 และยีนที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ trophectoderm คือ Cdx2 พบว่าเฉพาะบางตัวอ่อนและบาง outgrowth ที่ได้มาจากตัวอ่อนระยะสองและสี่เซลล์มีการแสดงออกของยีนแสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด จากการทดลองแรกพบว่าสามารถผลิตเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่มาจากตัวอ่อนหนูระยะสองเซลล์ได้ 4 สายพันธุ์ (5.6%; 4/72) แต่ไม่สามารถผลิตได้จากเซลล์ตัวอ่อนที่มาจากตัวอ่อนหนูระยะสี่เซลล์ จากนั้นนำ MAPK inhibitor (I) สองตัวคือ P38MAPK (I) และ MEK-1 (I) และฮอร์โมน ACTH มาใช้ทดสอบเพื่อเพิ่มความสำเร็จในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ตัวอ่อนหนู จากการทดลองพบว่า MEK-1 (I) และ P38MAPK (I) มีผลยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนปกติและตัวอ่อนที่เจริญมาจากเซลล์ตัวอ่อนระยะสองและสี่เซลล์ แต่ P38MAPK (I) จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนมากกว่า MEK-1 (I) จากการทดลองนี้ผลิตเซลล์ต้นกำเนิดได้ 17 สายพันธุ์ โดย 9 สายพันธุ์ ผลิตมาจากเซลล์ตัวอ่อนระยะสองเซลล์ที่เติม ACTH (12.5%; 9/72) 5 สายพันธุ์ผลิตมาจากตัวอ่อนระยะสองเซลล์ที่ไม่เติม ACTH (6.9%; 5/72) และ 3 สายพันธุ์ผลิตมาจากเซลล์ตัวอ่อนระยะสี่เซลล์ที่เติมด้วย ACTH (4.3%; 3/72) แต่ไม่สามารถผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ตัวอ่อนที่เลี้ยงใน MEK-1 (I) และ P38MAPK (I)ได้ จากการทดลองในตัวอ่อนหนูสามารถสรุปได้ว่าอัตราความสำเร็จในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนขึ้นอยู่กับอายุของตัวอ่อน คือถ้าตัวอ่อนอายุมากขึ้นจะมีอัตราความสำเร็จในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ตัวอ่อนที่นำมาจากตัวอ่อนอายุน้อยกว่า และ ACTH มีผลในการเพิ่มอัตราความสำเร็จในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ตัวอ่อน หลังการทดลองในตัวอ่อนหนูประสบความสำเร็จโดยสามารถผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจากเซลล์ตัวอ่อนได้แล้ว จึงได้ทำการทดลองต่อไปในตัวอ่อนลิงวอก โดยนำตัวอ่อนลิงระยะสองและสี่เซลล์มาแยกเซลล์ตัวอ่อนออกเป็นเซลล์เดี่ยวก่อนที่จะเลี้ยงในหลอดแก้ว จากการทดลองพบว่าเซลล์ตัวอ่อนที่มาจากตัวอ่อนระยะสองเซลล์หยุดการเจริญเติบโตหลังจากการแยกเซลล์ แต่เซลล์ตัวอ่อนที่มาจากตัวอ่อนระยะสี่เซลล์สามารถเจริญเป็น

ตัวอ่อนระยะ บลาสโตซีส (7.9%; 6/76) จากนั้นได้นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมาใช้ผลิตเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงปกติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

CHANCHAO LORTHONGPANICH : EMBRYONIC STEM CELL LINES ESTABLISHMENT FROM MOUSE SINGLE BLASTOMERE. THESIS ADVISOR : RANGSUN PARNPAI, Ph.D. 184 PP.

SINGLE BLASTOMERES/ EMBRYONIC STEM CELL/ PERSONAL STEM CELL/ ACTH/MAPK INHIBITOR

The objective of this study was to establish personal embryonic stem cell by using mouse embryonic stem cells as a model. First the suitable culture system for single blastomeres was studied. The result indicated that single blastomeres could be cultured individually and could form blastocyst and ICM outgrowth. The expression of ES cell markers was determined from each blastomeres which derived from the same embryo. The expression patterns of ES cells markers (Sox-2 and Oct-4) and trophectoderm marker (Cdx2) showed that only some but not all sister blastomeres derived from embryos and embryonic outgrowth expressed ES cell markers when two and four cell stage embryonic blastomeres were individually cultured. There were four ES cell lines (5.6%; 4/72) established from single blastomere derived from two-cell stage embryo (2CBD) while no ES cell line could be established from four-cell stage embryo. Two MAPK inhibitors (I), P38MAPK (I) and MEK-1 (I), and ACTH were individually used for the embryonic stem cell enhancement from single blastomeres derived from two and four-cell stage embryo. The results demonstrated that both MEK-1 (I) and P38MAPK (I) delay early development of normal embryos and inhibited the development of single blastomere derived embryos. The P38MAPK (I) had stronger inhibitory effect when compared to MEK-1 (I). As a result, a total of

seventeen ES cell lines were established. Among these ES cell lines, nine (12.5%; 9/72) and five (6.9%; 5/72) ES cell lines were established from single blastomere derived from two-cell embryo with and without the supplement of ACTH, respectively. In addition to 2CBD, three (4.3%; 3/72) ES cell lines were established from blastomere of four-cell embryo only with the supplement of ACTH. However, no ES cell line was established from culture supplemented with either MEK-1 (I) or P38MAPK (I). Based on this study, the success rate of establishing ES cells from single blastomere is influenced by embryonic stage. The more advance stage embryo resulted in lower success rate in establishing ES cells from single blastomere. After mouse ES cell lines were successfully established from single blastomere, two and four cell monkey embryos were then used for the establishment of ES cells from single blastomere. The results demonstrated that only blastomeres derived from four-cell embryos could develop to blastocyst (7.9%; 6/76) and four blastocysts were used for ES cell establishment. The results showed that colonies derived from those outgrowths had different morphology from normal monkey ES cell.

School of Biotechnology

Academic Year 2007

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____