วชิระ พันธ์ทา : ผลของโซเดียมบิวทิเรทต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อวาร์ตันเจลลี่มนุษย์เป็นเซลล์ตับ (EFFECT OF SODIUM BUTYRATE ON HEPATOGENIC TRANSDIFFERENTIATION OF HUMAN WHARTON'S JELLY-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 104 หน้า.

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นเซลล์ที่เกิดจากเนื้อเยื่อชั้นมีโซเดิร์ม ที่มีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวน และพัฒนาไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อชั้นมีโซเดิร์มได้ทุกชนิด อีกทั้งยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อประสาทชั้นเอ็กโตเดิร์ม และเซลล์ของเนื้อเยื่อชั้นเอ็นโดเดิร์มบางชนิดได้ รวมทั้งเซลล์ตับ ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อวาร์ตันเจลลี่ที่เก็บได้จากสายสะดือมนุษย์ (Human Wharton's jelly-derived MSCs, hWJ-MSCs) ถือได้ว่าเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับนำมารักษาโรคด้วยวิธีเซลล์บำบัด แม้ว่านักวิจัยหลายคนสามารถเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับได้ แต่ด้วยสารเคมีที่มีราคาแพงและระยะเวลาการเหนี่ยวนำที่นาน เป็นข้อจำกัดของการได้เซลล์คล้ายเซลล์ตับ ดังนั้น การใช้สารเคมีชนิดอื่นที่ถูกกว่าและใช้เวลาสั้น เพื่อช่วยส่งเสริมให้ hWJ-MSCs เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับเป็นสิ่งที่ควรทำ มีงานวิจัยจำนวนมาก พบว่า โซเดียมบิวทิเรท (NaB) สามารถส่งเสริมการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับได้

วัตถุประสงค์การศึกษานี้ คือ เพื่อหาผลของ NaB ที่ใช้ร่วมกับ Epidermal growth factor (EGF) และ Basic fibroblast growth factor (bFGF) ต่อการเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับของเนื้อเยื่อชั้นเอ็นโดเดิร์ม นอกจากนี้ยังตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaB ที่ใช้ร่วมกับ EGF และ bFGF ก่อนการเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์ตับ โดยใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นเซลล์ในชั้นเอ็นโดเดิร์มด้วยวิธี qPCR และการแสดงออกของโปรตีน SOX17 ด้วยวิธี Immunocytochemistry ทำการเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับระหว่างกลุ่มน้ำยาเหนี่ยวนำเซลล์ตับที่เติม NaB ช่วงก่อนการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตับร่วมกับ EGF และ bFGF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Hepatogenic medium + NaB pre-treated) และกลุ่มน้ำยาเหนี่ยวนำเซลล์ตับที่ไม่เติม NaB ช่วงก่อนการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตับร่วมกับ EGF และ bFGF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Hepatogenic medium - NaB pre-treated) โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับด้วยวิธี Immunocytochemistry, qPCR, Periodic acid-Schiff (PAS) reaction และ Urea production assay ของวันที่ 3, 10, 17 และ 24 ของการเหนี่ยวนำ นอกจากนี้ยังตรวจสอบผลของ NaB ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Histone deacetylase inhibitor 1

(HDAC1) ด้วยวิธี Immunocytochemistry, Western blot และ qPCR ผลการทดลองพบว่า การเติม NaB 1 mM ในน้ำยา ก่อนการเหนี่ยวไปเป็นเซลล์ตับ (PTM + 1 mM NaB) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HDAC1 และช่วยส่งเสริมให้ hWJ-MSCs เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในชั้นเอนโดเดิร์มได้ นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *CXCR4*, *SOX17* และ *GATA6* ยังสูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่น อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) อีกทั้งการแสดงออกของโปรตีน SOX17 ยังให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *SOX17* อีกด้วย ดังนั้นจึงเลือก NaB ความเข้มข้น 1 mM เติมในน้ำยาก่อนการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตับ ร่วมกับ EGF และ bFGF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนการเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับ ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม Hepatogenic medium + NaB pre-treated มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนของ early hepatic markers (AFP และ HNF3β), late hepatic markers (CK18 และ ALB) และความสามารถการทำหน้าที่ของเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่โตเต็มที่ (การสะสมไกลโคเจนและการผลิตยูเรีย) มากกว่ากลุ่ม Hepatogenic medium - NaB pre-treated อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การใช้ NaB ร่วมกับ EGF และ bFGF ช่วงก่อนการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับ มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์ในชั้นเอนโดเดิร์ม เซลล์ตั้งต้นเซลล์ตับ และเซลล์คล้ายเซลล์ตับที่สามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้น การเหนี่ยวนำ hWJ-MSCs ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ตับด้วยน้ำยา Hepatogenic medium + NaB pre-treated สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการทางเลือกในการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ตับ เพื่อนำมารักษาโรคด้วยวิธีเซลล์บำบัด และทดสอบประสิทธิภาพของยาในการประยุกต์ใช้งานทางคลีนิค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนักศึกษา____________
ปีการศึกษา 2559	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา____________

WACHIRA PANTA : EFFECT OF SODIUM BUTYRATE ON HEPATOGENIC TRANSDIFFERENTIATION OF HUMAN WHARTON'S JELLY-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 104 PP.

WHARTON'S JELLY-DERIVED STEM CELLS/HEPATOCYTE-LIKE CELLS/ HEPATOGENIC DIFFERENTIATION/SODIUM BUTYRATE/ HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS (HDACi)

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent mesoderm-derived cells that can self-renew and differentiate into all mesodermal, and some neuroectodermal and endodermal progenies include hepatocytes. Nowadays, human Wharton's jelly-derived MSCs (hWJ-MSCs) are an attractive source for cell-based therapy. Although, many investigators successfully used hWJ-MSCs to differentiate into hepatocyte-like cells, however, high chemical costs and long period of time for induction are the limitation factors. Therefore, the used of other cheaper chemical and less-time consuming to promote hWJ-MSCs into hepatocyte-like cells are needed. With many evidences, sodium butyrate (NaB) can promote embryonic stem cells (ESCs) differentiation toward hepatocyte-like cells.

The aim of this study was to verify the effect of NaB in combination with Epidermal growth factor (EGF) and Basic fibroblast growth factor (bFGF) on hWJ-MSCs transdifferentiation toward hepatoendodermal lineage. Furthermore, the optimal concentration of NaB in combination with EGF and bFGF right before hepatogenic

transdifferentiation of hWJ-MSCs was evaluated using the qPCR data of endodermal-related genes expression and immunocytochemistry of SOX17 protein expression. The differentiation of hWJ-MSCs into hepatocyte-like cells with hepatogenic medium with NaB-pretreatment (Hepatogenic medium + NaB-pretreated) and hepatogenic medium without NaB pre-treatment (Hepatogenic medium – NaB-pretreated) were also assessed by immunocytochemistry, qPCR, Periodic acid-Schiff (PAS) reaction and urea production assays at day 3, 10, 17 and 24 of differentiation. Besides, the effect of NaB on histone deacetylase 1 (HDAC1) inhibition was also investigated by immunofluorescence, Western blot and qPCR analyses. The results found that 1 mM NaB in pre-treatment medium (PTM + 1 mM NaB) group was found to be the optimum concentration for strong HDAC1 inhibition and promote endodermal transdifferentiation (up-regulated *CXCR4, SOX17* and *GATA6* transcripts and SOX17 protein expression) from hWJ-MSCs. The hepatogenic medium + NaB pre-treated group was found to express hepatoblastic markers (*AFP* and *HNF3β*), hepatic markers (*CK18* and *ALB)*, and functional matured hepatocyte-like cells (glycogen storage and urea production) greater than the Hepatogenic medium – NaB pre-treated group. This experiment can be concluded that combination of NaB with EGF and bFGF in pre-treatment step efficiently induced hWJ-MSCs toward endoderm, hepatoblast and hepatocyte-like cells. Thus, the differentiated hWJ-MSCs with NaB pre-treatment might be conceived as an alternative protocol to produce hepatocyte-like cells for cell-based therapy and drug screening in clinical applications.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology | Student's Signature Wachira Panta

Academic Year 2016 | Advisor's Signature ____________