

การศึกษาการใช้เซลล์ไฟโบริบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง
ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

นางสาววิภาวี ปวรจารย์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A study of human cesarean scar-derived fibroblasts as a potential feeder cells
for culturing the human pluripotent stem cells

Miss Wipawee Pavarajarn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์
โดย	นางสาววิภาวี ปวรอาจารย์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ กำธร พุกษานานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	นายสัตวแพทย์ ดร. รัฐจักร รังสิวิวัฒน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ กำธร พุกษานานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(นายสัตวแพทย์ ดร. รัฐจักร รังสิวิวัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กฤษณากรณ์ พริ้งเพระ)

วิภาวี ปวราจารย์ : การศึกษาการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (A study of human cesarean scar-derived fibroblasts as a potential feeder cells for culturing the human pluripotent stem cells) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. กำธร พฤษพานานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: น.สพ. ดร. รัฐจักร รังสิวิวัฒน์, 80 หน้า.

จุดประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด (HSFs) ในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (hPSCs) กลุ่มควบคุมคือเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังหุ้มองคชาติของทารก (HFFs) ตรวจสอบคุณสมบัติของ HSFs ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ, ความสามารถในการแบ่งตัวโดย BrdU proliferation assay, การแสดงออกของ supportive feeder markers โดย q-PCR, วัดปริมาณการสร้าง bFGF โดย ELISA และทดสอบ colony forming unit assay (CFU) ทดลองใช้ HSFs เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ hPSCs (Chula2.hES, PFX[#]12) และตรวจสอบ hPSCs หลังการเลี้ยง 10 passages ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ, คุณสมบัติพลูริโพเทนต์โดย q-PCR, immunocytochemistry และ flow cytometry ตรวจสอบ karyotyping และ *in vitro* differentiation ผลพบว่า HSFs มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกับ HFFs และมีสัดส่วนจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ BrdU ต่อเซลล์ทั้งหมดสูงกว่า HFFs ($P=0.006$) มีการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1 ไม่แตกต่างกัน ส่วน HSFs มี BMP4, Collagen I, Fibronectin ต่ำกว่า HFFs ($P<0.001$) HSFs สร้าง bFGF ได้ 0.033 ng/ml ใน 24 ชั่วโมง ผล CFU พบว่าบน HSFs มีโคโลนีของ hPSCs น้อยกว่า HFFs ($P=0.008$) HSFs เป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของ hPSCs อย่างน้อย 10 passages ได้ โดย hPSCs ที่เลี้ยงบน HSFs มีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกับ hPSCs ที่เลี้ยงบน HFFs มี pluripotent และ differentiation marker ไม่แตกต่างกัน มีโครโมโซมปกติและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อ 3 ชั้นได้ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า HSFs ใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ hPSCs ได้ และพบว่าเมื่อใช้ HSFs เป็นเซลล์พี่เลี้ยง สามารถเลี้ยง Chula2.hES ได้ โดยที่ไม่เติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ดังนั้น HSFs สามารถใช้ในการเลี้ยง hPSCs ได้และมีแนวโน้มว่าสามารถเลี้ยง hPSCs ได้โดยไม่ต้องเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674073030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: FIBROBLASTS / SCAR / FEEDER CELLS / STEM CELLS / PLURIPOTENT

WIPAWEE PAVARAJARN: A study of human cesarean scar-derived fibroblasts as a potential feeder cells for culturing the human pluripotent stem cells.
 ADVISOR: ASSOC. PROF. KAMTHORN PRUKSANANONDA, CO-ADVISOR: DR. RUTTACHUK RUNGSIWIVAT, 80 pp.

This study was aimed to determine the characteristics of human cesarean scar-derived fibroblast (HSFs) and their feasibility for co-culturing with human pluripotent stem cells (hPSCs). Human foreskin fibroblasts (HFFs) were used as the control group. HSFs were studied for their morphology, proliferation by BrdU proliferation assay, the expression of supportive feeder marker by q-PCR, bFGF secretion by ELISA and colony forming unit assay (CFU). Then, hPSCs (Chula2.hES, PFX[#]12) were co-cultured with HSFs for 10 passages, their morphology were observed and hPSCs pluripotency were tested by q-PCR, immunocytochemistry, flow cytometry, karyotyping and *in vitro* differentiation. The results showed that HSFs morphology was similar to HFFs and the proliferation rate of HSFs was higher than the HFFs (P=0.006). Inactivated HSFs expressed Activin A, bFGF, TGF- β 1 while BMP4, Collagen I, Fibronectin was lower than HFFs (P<0.001). The bFGF secreted by HSFs was 0.033 ng/ml in 24 hours. CFU of hPSCs on HSFs was lower than HFFs (P=0.008). HSFs could support the hPSCs more than 10 passages. Morphology and expression of pluripotent and differentiation markers of hPSCs co-cultured with HSFs were similar to HFFs and hPSCs have normal karyotype and could differentiated *in vitro* into embryonic three germ layers. In addition, HSFs could maintain the pluripotency of Chula2.hES without bFGF in the culture medium. In conclusion, HSFs can be used as feeder cell for co-culturing the hPSCs and bFGF supplementation may be unnecessary when using HSFs as the feeder cells for hPSCs.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.นพ.กำธร พุกชานนนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ นายสัตวแพทย์ ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับการให้ความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์กิตติคุณ นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน สำหรับ คำแนะนำและข้อคิดในการทำงานที่มีคุณค่าเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ Prof. Shin Kawamata จาก RIKEN Center of Developmental Biology, Kobe, Japan สำหรับการสร้างเซลล์ไลน์ PFX#12 ซึ่งใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณปราณี นำชัยศรีคำ สำหรับการอำนวยความสะดวกด้านวัสดุ อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวแพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ, นางสาวเนตรชนก ลีลาอดิศร, นางสาว ภัทรวรรณ มีฮาตร์ สำหรับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ flow cytometry ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวพรทิพย์ เมฆฉาย, นางสาวปัญชลี จ้างประเสริฐ, นางสาวศิริประภา ทองกอบเพชร, นางสาวกนกวรรณ สกลพงศ์ไพโรจน์, นายปานเดช จิวศรี, นายพงศธรณ์ ไชยทรัพย์ และ นายชาติกร บุญไกร สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย รวมถึงคำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ ที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ นางสาวสุกัญญา อุ่สนธิ์ สำหรับความช่วยเหลือเป็นอย่างดีและเป็น กำลังใจที่สำคัญ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมถึงกำลังใจที่สำคัญและเป็นแรงผลักดันให้สำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	17
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย.....	17
1.2 คำถามงานวิจัย.....	18
1.3 วัตถุประสงค์	19
1.4 สมมติฐาน	19
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	19
1.6 คำสำคัญ	20
1.7 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....	20
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
2.1 เซลล์ต้นกำเนิด.....	21
2.2 เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (human pluripotent stem cells).....	22
2.3 ระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	23
2.4 Basic fibroblast growth factor กับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	24
2.5 เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 รูปแบบการวิจัย	27

3.2 การเตรียมและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์.....	27
3.3 การตรวจสอบการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Examination of fibroblast proliferation).....	28
3.4 การตรวจสอบ mesenchymal stem cell markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน (Immunocytochemistry)	28
3.5 การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง	29
3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงไฟโบรบลาสต์.....	29
3.6.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ (morphological analysis).....	29
3.6.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (gene expression analysis).....	30
3.6.3 การตรวจสอบการสร้าง basic fibroblast growth factor (bFGF secretion analysis).....	32
3.7 การเตรียม การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ และการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด	32
3.7.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	32
3.7.2 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์.....	33
3.7.3 การทดสอบความสามารถเบื้องต้น ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นผ่าตัดคลอด	33
3.7.4 การพิสูจน์คุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์.....	34
3.7.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ.....	34
3.7.4.2 การตรวจการแสดงออกของยีน (gene expression analysis)	35
3.7.4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน (Immunocytochemistry).....	35

3.7.4.4 การตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stage-specific embryonic antigen-4.....	37
3.7.4.5 การตรวจสอบลักษณะของโครโมโซม	38
3.7.4.6 การเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในงานเพาะเลี้ยง (in vitro differentiation).....	38
3.8 การทดสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็น ผ่าตัดคลอด เมื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี basic fibroblast growth factor.....	39
3.9 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	40
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	40
3.11 การพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical consideration).....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	41
4.1 ผลการทดลองที่ 1: คุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด	41
4.1.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น	41
4.1.2 การตรวจสอบ mesenchymal stem cell markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น	41
4.1.3 ผลการตรวจสอบ proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น	43
4.2 ผลการทดลองที่ 2: คุณสมบัติการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น หลังการผ่าตัดคลอด.....	44
4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นที่ทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย mitomycin C	44
4.2.2 ตรวจสอบ supportive feeder markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction	44

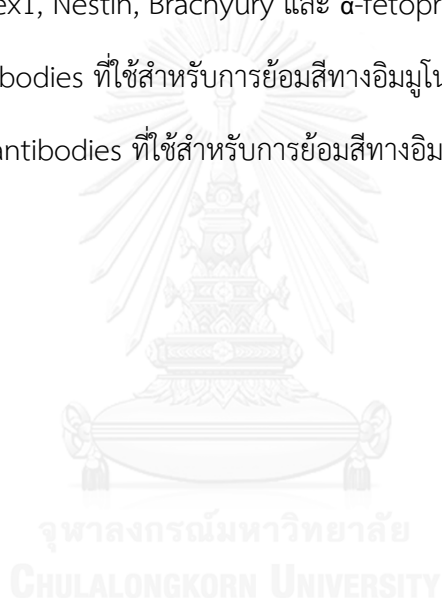
4.3 ผลการทดลองที่ 3: ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดที่ใช้เป็นเซลล์ พีเลี้ยง	46
4.3.1 การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ในการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนจากเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากแผลเป็น	46
4.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	46
4.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent และ differentiation markers ใน เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction.....	48
4.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิด พลูริโพ เทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน	50
4.3.5 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิด พลูริโพ เทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Flow cytometry	54
4.3.6 การตรวจสอบโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	54
4.3.7 การตรวจสอบคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในจาน เพาะเลี้ยงเซลล์.....	55
4.4 ผลการทดลองที่ 4: ผลของ basic fibroblast growth factor ต่อคุณสมบัติ pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พีเลี้ยงที่ แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด	60
4.4.1 ปริมาณการหลั่ง basic fibroblast growth factor ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จาก แผลเป็น	60
4.4.2 ผลของ basic fibroblast growth factor ต่อเซลล์พีเลี้ยงจากเซลล์ไฟโบร بلاสต์ จากแผลเป็น.....	60
4.4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากแผลเป็น.....	60

4.4.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของ supportive feeder markers ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction.....	61
4.4.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นที่ใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงโดยเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ที่ไม่เติม bFGF	62
4.4.3.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์	62
4.4.3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent และ differentiation markers ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction.....	62
4.4.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน.....	63
4.4.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Flow cytometry.....	64
4.4.3.5 การตรวจสอบคาร์ิโอไทป์ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์.....	65
4.4.3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในจานเพาะเลี้ยงเซลล์.....	66
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย.....	68
รายการอ้างอิง	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	80

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP-4, Collagen type I และ Fibronectin.....	31
ตารางที่ 2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP-4, Collagen type I และ Fibronectin	31
ตารางที่ 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Oct4, Nanog, Sox2, UTF1, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein.....	36
ตารางที่ 4	Primary antibodies ที่ใช้สำหรับการย้อมสีทางอิมมูโน.....	37
ตารางที่ 5	Secondary antibodies ที่ใช้สำหรับการย้อมสีทางอิมมูโน	37



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ตัวอย่างของมนุษย์ระยะบลาสโตซิสต์.....	21
รูปที่ 2 ระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดแบบไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงและใช้เซลล์พี่เลี้ยง	24
รูปที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อเยื่อของแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด	25
รูปที่ 4 Colony-forming unit assay	34
รูปที่ 5 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดหลังเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดซึ่งเป็นเซลล์พี่เลี้ยง	39
รูปที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของ HSFs และ HFFs (P6, P10, P14) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์	41
รูปที่ 7 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ mesenchymal stem cell markers ของ HSFs (P7).....	42
รูปที่ 8 A: ผลการย้อมสีอิมมูโนของ HSFs และ HFFs (P15) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ B: เปรียบเทียบสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก ต่อ BrdU ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดของ HSFs และ HFFs (P15)	43
รูปที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของ HSFs และ HFFs (P8) หลังจากทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย mitomycin C.....	44
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP4, Collagen I และ Fibronectin ระหว่างใน HSFs กับ HFFs (P8-10)	45
รูปที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของ Chula2.hES (P15+5) ที่สร้างขึ้นจากเซลล์เดี่ยวบนเซลล์พี่เลี้ยง HSFs (P9) และ HFFs (P6).....	46
รูปที่ 12 ตัวอย่างการจำแนกลักษณะทางกายภาพของโคโลนีเป็น 3 เกรด	47
รูปที่ 13 ตัวอย่างลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์เกรด A.....	47
รูปที่ 14 กราฟแสดงร้อยละของโคโลนีเกรด A, B และ C ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ PFX [#] 12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด	47

- รูปที่ 15** เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Oct4, Sox2, UTF, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน **A:** Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ **B:** PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 49
- รูปที่ 16** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 50
- รูปที่ 17** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase ของ PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 51
- รูปที่ 18** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 52
- รูปที่ 19** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase ของ PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 53
- รูปที่ 20** เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับ เซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด..... 54
- รูปที่ 21** ผลการตรวจคาร์โบไฮโปของ Chula2.hES (P15+15) และ PFX[#]12 (P30+15) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด 55
- รูปที่ 22 A:** embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อม สำหรับ spontaneous differentiation 56
- รูปที่ 23 A:** embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs

(P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อม สำหรับ spontaneous differentiation	57
รูปที่ 24 A: embryoid body B: ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อม สำหรับ spontaneous differentiation	58
รูปที่ 25 A: embryoid body B: ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน PFX [#] 12 (P30+10 – P30+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อม สำหรับ spontaneous differentiation	59
รูปที่ 26 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของ HSFs (P8) เมื่อเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ที่มีและไม่มี bFGF โดยติดตามผลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน	60
รูปที่ 27 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP4, Collagen I และ Fibronectin ระหว่างใน HSFs (P8-10) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ที่มีและไม่มี bFGF	61
รูปที่ 28 กราฟแสดงร้อยละของโคโลนีเกรด A, B และ C ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF.....	62
รูปที่ 29 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Oct4, Sox2, UTF, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีและไม่มี bFGF.....	63
รูปที่ 30 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF.....	64
รูปที่ 31 เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีและไม่มี bFGF.....	65

รูปที่ 32 ผลการตรวจการไอโทป์ของ Chula2.hES (P15+15) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง จาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด..... 65

รูปที่ 33 A: embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง จาก HSFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF และเลี้ยงในสภาพแวดล้อม สำหรับ spontaneous differentiation 67



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติพลูริโพเทนต์คือเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้เซลล์ใหม่ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ตั้งต้นโดยที่เซลล์นั้นยังไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่จำเพาะอย่าง เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (hPSCs) สร้างจากอินเนอร์เซลล์แมสของตัวอ่อนก่อนการฝังตัวระยะบลาสโตซิสต์หรือสร้างจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกายเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไปในด้านต่างๆ เช่น ด้านการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนมนุษย์ การทดสอบทางพิษวิทยาของยา รวมถึงทางด้านเวชศาสตร์ฟื้นฟูภาวะเสื่อม (1, 2) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต แต่การเลี้ยง hPSCs ในห้องปฏิบัติการยังมีปัญหาในเรื่องการคงคุณสมบัติพลูริโพเทนต์ของเซลล์เมื่อเลี้ยงต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เนื่องจาก hPSCs ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสูญเสียความเป็นพลูริโพเทนต์ได้ง่าย สามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและลักษณะการเจริญของเซลล์ ซึ่งลักษณะเหล่านี้มีความแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ของเซลล์และระบบในการเลี้ยงเซลล์อีกด้วย

โดยทั่วไประบบการเลี้ยง hPSCs แบบใช้เซลล์ที่เลี้ยงมักพบว่ามีการปนเปื้อนของส่วนประกอบจากสัตว์ เนื่องจากในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงมีซีรัมจากสัตว์เป็นส่วนประกอบและเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงจากเซลล์สัตว์อีกด้วย การปนเปื้อนส่วนประกอบจากสัตว์ที่มีรายงานค้นพบคือ Neu5Gc ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sialic acid ที่ไม่พบในมนุษย์และส่วนใหญ่ในมนุษย์ยังมีแอนติบอดีต่อ Neu5Gc ตามธรรมชาติอีกด้วย ดังนั้นเมื่อมนุษย์ได้รับเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดการต่อต้านต่อแอนติบอดีที่มีอยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิต ไปเข้าจับกับอิมมูโนโกลบูลินและตกตะกอน ทำให้เซลล์ในร่างกายมนุษย์ตายได้ ดังนั้น hPSCs ที่ปนเปื้อนส่วนประกอบจากสัตว์จึงเสี่ยงอันตรายและไม่เหมาะสมแก่การนำเซลล์ต้นกำเนิดที่ปนเปื้อนนี้ ไปใช้ปลูกถ่ายในมนุษย์ (3)

หลังจากนั้นจึงมีความพยายามในการแก้ไขปัญหาโดยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของส่วนประกอบจากสัตว์โดยการเลี้ยงเซลล์แบบไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยง (4-6) แต่มีรายงานที่พบปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมไปจากเซลล์ต้นกำเนิดตั้งต้นเนื่องจากตรวจพบ hPSCs มีโครโมโซมผิดปกติไปจากเดิมเมื่อผ่านการเลี้ยงเซลล์ในสถานะที่ไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยงเป็นเวลาต่อเนื่องตั้งแต่ 10 passages ขึ้นไป (7, 8) ทำให้ไม่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ในทางคลินิกและการเลี้ยง hPSCs แบบไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยงจำเป็นต้องใช้ recombinant extracellular matrices ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง อีกทางหนึ่ง

คือการใช้เซลล์ที่เลี้ยงที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของมนุษย์ซึ่งเป็นระบบการเลี้ยงที่สามารถเลี้ยง hPSCs ได้ เป็นระยะเวลายาวนาน ดังนั้น การพัฒนาการเลี้ยง hPSCs ร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจึงมีความสำคัญ อีกทั้ง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือคุณสมบัติและประสิทธิภาพของเซลล์ที่เลี้ยงที่ใช้ โดยทั่วไปการใช้เซลล์ที่เลี้ยงที่แยกได้จากคนนิยมใช้ human foreskin fibroblasts (HFFs) เป็นเซลล์ที่เลี้ยงเนื่องจากวิธีการแยกเนื้อเยื่อทำได้สะดวกและแหล่งของเซลล์หาได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยเนื้อเยื่อจากทารกในครรภ์หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการผ่าตัดที่ยุงยาก (9) อย่างไรก็ตามการแสดงคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่ดีของ HFFs ก็ยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคนหรือกระบวนการเตรียมเซลล์ ดังนั้นจึงพบว่า HFFs บางสายพันธุ์ไม่แสดงคุณสมบัติเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ดีของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (10)

ที่ห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาชนิดของเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกได้จากเนื้อเยื่อแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด หรือ human cesarean scar fibroblasts (HSFs) พบว่า HSFs มีศักยภาพในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของโคโลนีแรกเริ่ม (primary colony) ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (11) ดังนั้นจึงนำไปสู่จุดประสงค์ของงานวิจัย คือ HSFs สามารถใช้ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของ เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้หรือไม่ และ bFGF ที่มีอยู่ในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์จะส่งผลต่อ HSFs เมื่อนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงหรือไม่

1.2 คำถามงานวิจัย

1. เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดสามารถใช้ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้หรือไม่
2. เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF สามารถใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้หรือไม่

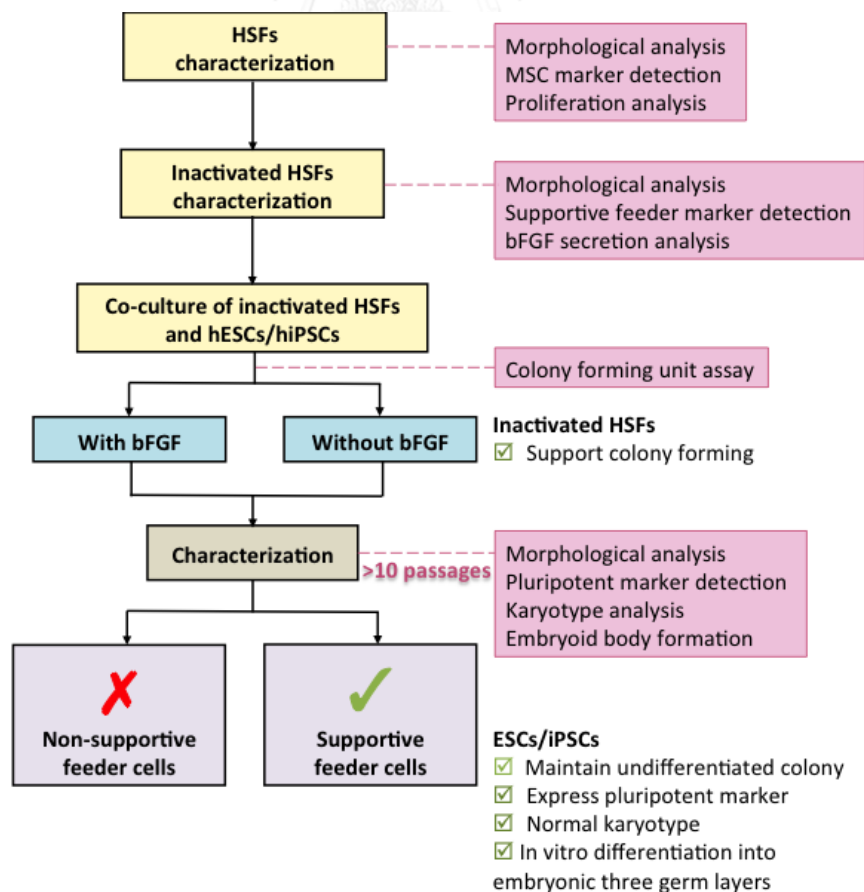
1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสามารถของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF

1.4 สมมติฐาน

1. เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดสามารถใช้ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้
2. สามารถเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้ เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF

1.5 ขอบเขตของการวิจัย



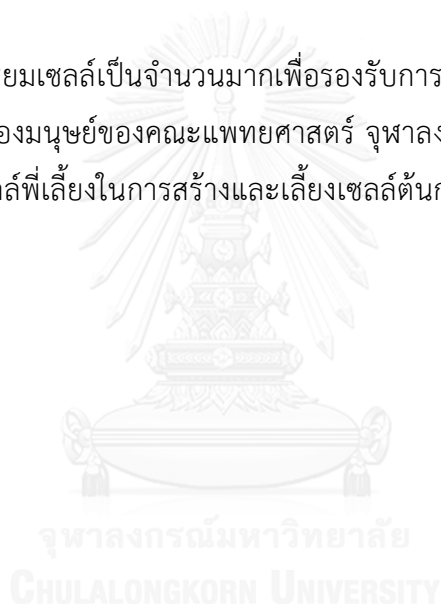
1.6 คำสำคัญ

Human pluripotent stem cells, Pluripotency, Feeder cells, Basic fibroblast growth factor, Differentiation

1.7 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ผลที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นแนวทางไปสู่การค้นพบเซลล์พี่เลี้ยงชนิดใหม่และพัฒนาระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต

2. สามารถเตรียมเซลล์เป็นจำนวนมากเพื่อรองรับการพัฒนางานทางด้านการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งในอนาคตมีแนวโน้มที่จะต้องการเซลล์พี่เลี้ยงในการสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์โดยเฉพาะจากผู้ป่วยอีกเป็นจำนวนมาก



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลล์ต้นกำเนิด

เซลล์ต้นกำเนิด คือ เซลล์ที่มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ได้เรื่อย ๆ เป็นระยะเวลานาน โดยเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นยังคงคุณสมบัติเหมือนเซลล์ต้นกำเนิดตั้งต้นและเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างได้หลายชนิด ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดจะมีความจำเพาะมากขึ้นขึ้นตามการพัฒนาของตัวอ่อน ในมนุษย์เมื่อสเปิร์ม (sperm) ผสมกับไข่ (oocyte) ได้ไซโกต (zygote) แล้วเซลล์จะมีการแบ่งตัวจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์และเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นเท่าตัว จนกระทั่งได้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันเป็นก้อนกลมเรียกว่ามอรูลา (morula) จากนั้นจะมีการแบ่งตัวต่อไปและกลุ่มเซลล์มีการจัดเรียงตัวใหม่ได้บลาสโตซิสต์ (blastocyst) ซึ่ง ประกอบด้วยโทรเฟคโตเดิร์ม (trophoblast) และอินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass) (รูปที่ 1) ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในอินเนอร์เซลล์แมสจะมีเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังมีคุณสมบัติพลูริโพเทนต์ (pluripotent) สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น epiblast cells, primitive ectoderm, definitive ectoderm, definitive endoderm และ definitive mesoderm โดยเมื่อเซลล์อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างดังกล่าวแล้ว เซลล์ต้นกำเนิดนั้นจะมีความจำเพาะมากขึ้น ในระดับนี้เรียกว่ามีคุณสมบัติมีลติโพเทนต์ (multipotent) จนกระทั่งเป็นเนื้อเยื่อจำเพาะในที่สุด (12)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 1 ตัวอ่อนของมนุษย์ระยะบลาสโตซิสต์ (13)

2.2 เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (human pluripotent stem cells)

เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่แยกจากตัวอ่อนระยะก่อนการฝังตัวเรียกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem cells; hESCs) และชนิดที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกายให้มีคุณสมบัติลักษณะทางกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เรียกว่าเซลล์ต้นกำเนิดอินดิวิจพลูริโพเทนต์ (human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)

James Alexander Thomson และคณะเป็นผู้สร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์เป็นครั้งแรกในปี 1998 ทำได้โดยการใช้เอมบริโอระยะคลีเวจ (cleavage) ที่ได้รับบริจาคจากหน่วยงานที่ใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ด้วยการปฏิสนธิ ภายนอกร่างกายหรือการทำเด็กหลอดแก้ว (In vitro fertilization; IVF) ผ่านการยินยอมจากเจ้าของเอมบริโอที่บริจาคเพื่อใช้ในงานวิจัย จากนั้นเลี้ยงเอมบริโอดังกล่าวในห้องทดลองจนกระทั่งเอมบริโอพัฒนาเป็นระยะบลาสโตซิสต์ จากนั้นแยกอินเนอร์เซลล์แมสออกมาเลี้ยง ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ และได้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ตามต้องการ (14) วิธีนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจและนิยมใช้สำหรับการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในหน่วยงาน IVF ที่สนใจแห่งอื่นอีกด้วย สำหรับเอมบริโอที่อยู่ในระยะบลาสโตซิสต์หรือบลาสโตโตเมียร์ก็สามารถนำไปใช้ในการแยกอินเนอร์เซลล์แมสได้เช่นกัน (15-17)

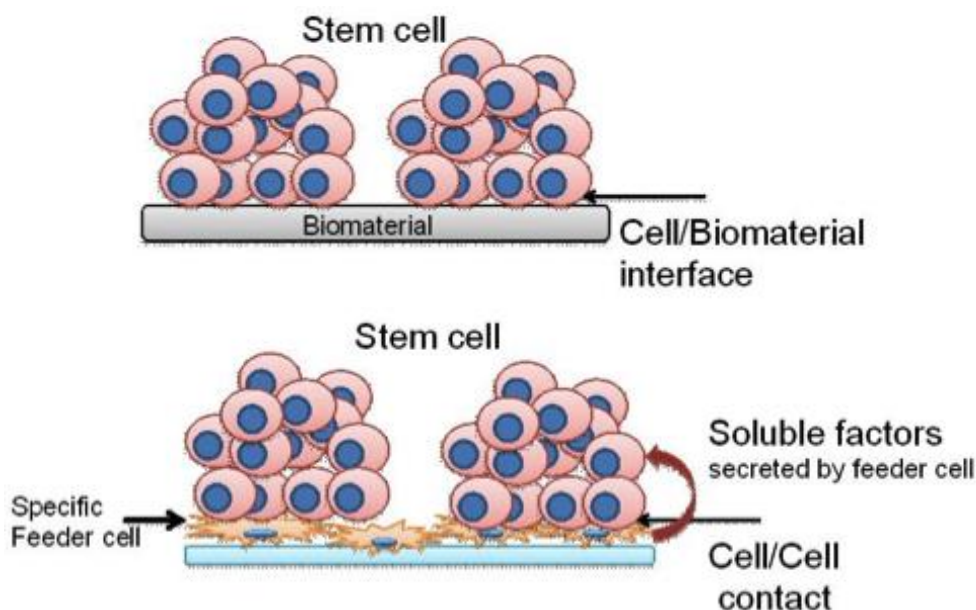
ในภายหลังได้มีการคิดค้นวิธีอื่นๆ ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ซึ่งมีการค้นพบครั้งสำคัญโดย Kazutoshi Takahashi และ Shinya Yamanaka ในปี 2006 ได้สร้างเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์จากเซลล์ของหนูที่โตเต็มวัยได้สำเร็จ ใช้วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ผู้ใหญ่ด้วยกลุ่มของ encoding transcription factor หลักที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกายเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ยีนที่ใช้ได้แก่ *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* และ *c-Myc* (18) เรียกเซลล์ดังกล่าวที่สร้างขึ้นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดอินดิวิจพลูริโพเทนต์ (induced pluripotent stem cells; iPSCs) นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นที่ใช้กลุ่มของยีนแตกต่างกันไป ในปีถัดมามีหลายทีมวิจัยที่สามารถพัฒนาการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ด้วยวิธีนี้ได้เช่นกัน (19) ซึ่งยีนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำอาจเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมพลูริโพเทนต์ตัวอื่นๆ เช่น ทีมวิจัยของ Thomson เลือกใช้ *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* และ *LIN28* ก็สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดอินดิวิจพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้สำเร็จ (20)

เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไปได้ทั้งทางด้านการพัฒนาของเอมบริโอ ด้านพิษวิทยาและด้านเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อมซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต (1, 2)

2.3 ระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

การเลี้ยง hPSCs จำเป็นต้องอาศัยระบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและคงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดไว้ได้ แรกเริ่มในการเลี้ยง hPSCs ทำได้โดยใช้ระบบการเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอมบริโอหนู โดยเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เติม basic fibroblast growth factor (bFGF) ร่วมกับ (14) ซึ่ง bFGF เป็น growth factor ที่สำคัญต่อกระบวนการแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์ตัวเองขึ้นมาใหม่ (21) หลังจากนั้นได้มีการคิดค้นและพัฒนากระบวนการเลี้ยง ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อลดการปนเปื้อนของส่วนประกอบจากสัตว์โดยวิธีหนึ่งคือการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ด้วยระบบการเลี้ยงแบบไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยง แต่จะใช้สาร extracellular matrix เคลือบบนพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงและใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของไฮโดรโค่นและสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (4-6, 22) แต่ระบบการเลี้ยงแบบนี้ยังมีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากมีรายงานที่ตรวจพบเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์มีโครโมโซมผิดปกติไปจากเดิมเมื่อผ่านการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลาต่อเนื่องตั้งแต่ 10 passages ขึ้นไป (7, 8) จึงเป็นข้อจำกัดของการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดด้วยระบบดังกล่าว

อีกวิธีหนึ่งคือการใช้ระบบการเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของมนุษย์ ซึ่งเซลล์ที่แยกได้นี้มีหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงได้และสนับสนุนการเจริญของ hPSCs เช่น เซลล์กล้ามเนื้อของฟetusหรือผู้ใหญ่ (human fetal/adult muscle) เซลล์จากท่อนำไข่ของผู้ใหญ่ (human adult fallopian tubal fibroblasts) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของฟetusหรือผู้ใหญ่ (human fetal/adult fibroblasts) (20) เซลล์รก (human umbilical cord) (23) เซลล์ไขกระดูก (human marrow cells) (24) ซึ่งที่นิยมใช้คือเซลล์ผิวหนังหุ้มองศาตของทารก (human foreskin fibroblasts; HFFs) (10, 25) เนื่องจากแหล่งของเซลล์สามารถหาได้ง่าย สามารถแยกได้สะดวกไม่ต้องอาศัยเนื้อเยื่อจากตัวอ่อนมนุษย์ในระยะฟetusหรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการผ่าตัดที่ยุ่งยาก (9) (รูปที่ 2)



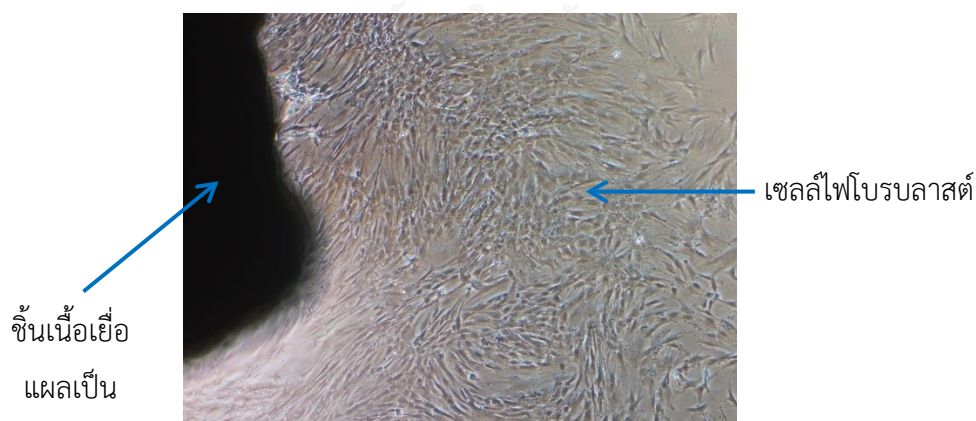
รูปที่ 2 ระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดแบบไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงและใช้เซลล์พี่เลี้ยง (26)

2.4 Basic fibroblast growth factor กับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

Basic fibroblast growth factor (bFGF) เป็นโปรตีนที่ทำงานในวิถีที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของมนุษย์ (developmental pathways) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการ self-renewal ของ hPSCs (27) และมีส่วนช่วยกระตุ้นการ proliferation และการเลี้ยง hPSCs ไม่ให้เกิด differentiation โดยที่ bFGF จะไปยับยั้ง bone morphogenetic protein (BMP) (28) ในการเลี้ยง hPSCs โดยทั่วไปจึงมีการเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์และสามารถเลี้ยงเซลล์ต่อไปได้ทั้งในระบบการเลี้ยงแบบใช้เซลล์พี่เลี้ยงและไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง (19) แรกเริ่มในน้ำยาเลี้ยง hPSCs ที่เติม bFGF จะใช้ที่ความเข้มข้น 4 ng/ml (19, 29) หลังจากนั้นมียางานการใช้ bFGF ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เช่น 8, 10, 24, 40, 100 และ 250 ng/ml สามารถใช้เลี้ยง hPSCs แบบใช้เซลล์พี่เลี้ยงได้เช่นกัน (11, 29) ในขณะที่ความเข้มข้น 100 ng/ml bFGF สามารถใช้เลี้ยง hPSCs แบบไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงได้มากกว่า 10 passages อีกด้วย (29) ถ้าหากไม่มี bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จะทำให้เซลล์ไม่สามารถคงคุณสมบัติพลูริโพเทนต์ได้และเกิดกระบวนการ differentiation ไปได้อย่างรวดเร็ว (30) ดังนั้น bFGF จึงมีความสำคัญต่อการเลี้ยง hPSCs เป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ใช้ mesenchymal stem cells (MSCs) เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ hPSCs โดยที่ไม่ต้องเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ได้ ซึ่งเป็นผลจากการที่เซลล์สามารถสร้าง bFGF ได้เพียงพอต่อการรักษาคุณสมบัติพลูริโพเทนต์ของ hPSCs (31-33)

2.5 เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

แผลเป็น คือ บริเวณของผิวหนังที่มีการสร้างเนื้อเยื่อ fibrous หลังกระบวนการสมานบาดแผล (healing process) และมีการสะสมของสารบางชนิดที่มากกว่าปกติ เช่น collagen, fibronectin (34, 35) หลังการผ่าตัดคลอดมักเกิดแผลเป็นซึ่งเนื้อเยื่อบริเวณแผลเป็นจะถูกผ่าตัดออกเมื่อเข้ารับการผ่าตัดคลอดบุตรครั้งที่สอง โดยที่ชิ้นเนื้อเยื่อแผลเป็นนี้ไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์แต่อย่างใดทั้งในทางการแพทย์และทางการวิจัย จากรายงานครั้งก่อนหน้าได้มีการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากชิ้นเนื้อเยื่อแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดได้ประสบความสำเร็จ (รูปที่ 3) อีกทั้งสามารถใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเกาะของอินเนอร์เซลล์แมสหรือระยะบลาสต์โตซิสต์ในขั้นตอนการสร้างเซลล์ ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และสามารถเลี้ยงโคลอนีแรกเริ่ม (primary colony) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์ได้ (11) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ต่อไปในระยะยาวบนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นดังกล่าว ทั้งนี้จึงสังเกตเห็นว่าถ้าหากนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้มาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ก็จะสอดคล้องต่อแนวทางในการลดการปนเปื้อนของส่วนประกอบจากสัตว์ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์วิธีหนึ่ง อย่างไรก็ตามมีเซลล์หลายชนิดที่สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อของมนุษย์แต่ไม่ใช่ทุกเซลล์ที่จะสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงแล้วสามารถสนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ได้



รูปที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อเยื่อของแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น หลังการผ่าตัดคลอดในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์และศึกษาผลของ bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ต่อความสามารถในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด โดยมุ่งหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์แก่งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ รวมถึงการพัฒนาด้านการนำเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้ในทางคลินิก



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาแบบงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) โดยโครงร่างการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) IRB No. 293/58

3.2 การเตรียมและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีสองชนิด ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากผิวหนังหุ้มองศาติของทารกแรกเกิด (Human neonatal foreskin fibroblasts; HFFs) ซึ่งซื้อจากบริษัท American Type Culture Collection (ATCC; catalog no. CRL-2429) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดของมนุษย์ (human cesarean scar-derived fibroblasts; HSFs) เซลล์ HSFs นี้ เป็นเซลล์ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อเยื่อจากผู้บริจาคที่ยินยอมให้นำชิ้นเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์เพื่องานวิจัย ในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ คือ โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อการนำไปใช้ทางคลินิก” สัญญาเลขที่ GRB-APS-03-57-30-01 โดย รศ.นพ.กำธร พลักษานานนท์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย โครงการวิจัยดังกล่าวผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No. 301/55

การทดลองนี้ ใช้ HFFs เป็นกลุ่มควบคุมเนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ และ catalog no. นี้ เป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (supportive feeder cells) และใช้สำหรับสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ได้ ขั้นตอนในการเตรียมและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้งสองชนิดใช้วิธีการเดียวกัน ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งประกอบด้วย Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; HyClone) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS; Millpore), 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies), 1% Glutamax (Life Technologies) ในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เมื่อเซลล์เจริญและมี confluency ประมาณ 80-90 % ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยใช้ 0.05% trypsin-EDTA (Life Technologies) ในการแยกเซลล์เดี่ยว

3.3 การตรวจสอบการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Examination of fibroblast proliferation)

ทำการตรวจสอบความสามารถในการแบ่งตัวของ HSFs และ HFFs ด้วยวิธี BrdU proliferation assay เลือกทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ ใน passage number ที่ 15 ทำการ fix เซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อมี confluent 90-100% ด้วย 4% paraformaldehyde fixative ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที permeabilization โดยใช้ 0.2% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ blocking solution (5% goat serum in PBS) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45-60 นาที ใส่ primary antibody (anti-BrdU) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน ในวันต่อมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45-60 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และใส่สีย้อม DAPI ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นขั้นตอนการย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์เพื่อให้ทราบตำแหน่งของนิวเคลียสภายในเซลล์ ตรวจสอบผลการย้อมสีทางอิมมูโนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีและคำนวณสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ BrdU ต่อจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ DAPI

3.4 การตรวจสอบ mesenchymal stem cell markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน (Immunocytochemistry)

ตรึงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วย 4% paraformaldehyde fixative ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที permeabilization โดยใช้ 0.2% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-20 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ blocking solution (5% goat serum in PBS) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45-60 นาที ใส่ primary antibody ของ markers ที่ต้องการตรวจสอบจาก human mesenchymal stem cell characterization kit (Millipore; Cat No. SCR067) ประกอบด้วย MSC positive markers ได้แก่ HCAM, MCAM (CD146), Stro1, Thy1 (CD90) และ MSC negative markers ได้แก่ CD14, CD19 บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ในวันต่อมา ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น ใส่ secondary antibody (Alexa-Fluor conjugated with goat anti mouse IgG, IgM Cat No. a10680; Life Technologies) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45-60 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และใส่สีย้อม DAPI ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบการย้อมติดสีของเซลล์

3.5 การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง

เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์มี confluent 90-100% ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 cm² จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวด้วย 10 µg/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich) บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2.5-3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 10 ml แยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.05% trypsin-EDTA และย้ายเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 mm ที่เคลือบพื้นผิวด้วย 0.1% gelatin เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10⁴ cells/cm² เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C จนกว่าจะถูกนำมาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงหรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงไฟโบรบลาสต์

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่เลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด ประกอบด้วยลักษณะทางกายภาพ, การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์, การสร้าง basic fibroblast growth factor และผลของ basic fibroblast growth factor ต่อคุณสมบัติการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

3.6.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ (morphological analysis)

ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ HSFs เมื่อถูกยับยั้งการแบ่งตัว ด้วย mitomycin C ในกระบวนการเตรียมเซลล์ที่เลี้ยงและเปรียบเทียบกับ HFFs โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast microscope ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า และตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ HSFs เมื่อถูกยับยั้งการแบ่งตัวเปรียบเทียบกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ HSFs เมื่อเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่มี หรือ ไม่มี ส่วนประกอบของ basic fibroblast growth factor ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เก็บข้อมูลโดยการถ่ายรูปด้วยกล้องถ่ายรูปที่กำลังขยาย 40 เท่า

3.6.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ (gene expression analysis)

ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เลี้ยงเซลล์ HSFs ที่ผ่านกระบวนการเตรียมเซลล์ที่เลี้ยงด้วย mitomycin C มาแล้ว ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ซึ่งประกอบด้วย Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (KO-DMEM; Life Technologies) ที่มี 20% Knockout serum replacement (KSR; Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid (Life Technologies), 0.055 mM β -mercaptoethanol (Life Technologies) ที่มี หรือไม่มี 8 ng/ml bFGF (R&D Systems) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C ทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJet (Fermentas, Thermo Scientific) จากนั้น 1 μ g RNA ถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดย RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Scientific) เพิ่มจำนวน cDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP-4, Collagen type I และ Fibronectin ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) แบบ real-time PCR โดย Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) และทำให้อยู่ในสภาวะที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ real-time PCR ที่ขั้นตอน extension ด้วย ABI Sequence Detection Software (Applied Biosystems) เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล คำนวณ relative quantification โดยวิธี $\Delta\Delta$ CT ดังสมการ

$$\Delta\text{CT}_{\text{sample}} = \text{Ct}_{\text{target}_{\text{sample}}} - \text{Ct}_{\text{reference}_{\text{sample}}}$$

$$\Delta\text{CT}_{\text{calibrator}} = \text{Ct}_{\text{target}_{\text{calibrator}}} - \text{Ct}_{\text{reference}_{\text{calibrator}}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{sample}} - \Delta\text{CT}_{\text{calibrator}}$$

$$\text{ดังนั้น relative quantification} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

ตารางที่ 1 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP-4, Collagen type I และ Fibronectin

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (C°)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	2 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	
Extention	72	1 นาที	
Final extention	72	2 นาที	

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP-4, Collagen type I และ Fibronectin (F: forward primer; R: reverse primer, hGAPDH: human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ECM: extracellular matrix)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	หมายเหตุ	เอกสารอ้างอิง
Activin A - F	AGAAGAGACCCGATGTCACC	Supportive feeder markers	(36)
Activin A - R	ACAGGTCAGTGCCTTCCTTG		
bFGF - F	GCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTC		
bFGF - R	ACTGCCAGTTCGTTTCAGT		
TGF- β 1 - F	GTCACCCGCGTGCTAATG		
TGF- β 1 - R	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC		
BMP4 - F	GACTTCGAGGCGACACTTCT	ECM markers	(37)
BMP4 - R	CCTGGGATGTTCTCCAGATG		
Collagen I - F	GGGATTCCCTGGACCTAAAG	ECM markers	(37)
Collagen I - R	GGAACACCTCGCTCTCCA		
Fibronectin - F	GCCACTGGAGTCTTTACCACA	Endogenous control	(36)
Fibronectin - R	CCTCGGTGTTGTAAGGTGGA		
hGAPDH - F	TCGCTCAGACACC AGCCACA	Endogenous control	(36)
hGAPDH - R	GTAATCAGCGCCAGCATCG		

3.6.3 การตรวจสอบการสร้าง basic fibroblast growth factor (bFGF secretion analysis)

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดที่ผ่านกระบวนการเตรียมเซลล์ที่เลี้ยงด้วย mitomycin C มาแล้ว ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มีส่วนประกอบของ basic fibroblast growth factor ในตู้ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (condition medium) มาตรวจสอบปริมาณของ bFGF ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดย ELISA Development Kit ประกอบด้วย DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D systems) และ Human FGF basic DuoSet (R&D systems) ตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ ELISA ด้วย microplate reader รุ่น Varioskan Flash (Thermo Scientific) เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล ใช้ น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มีส่วนประกอบของ basic fibroblast growth factor ไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ HSFs แต่บ่มในตู้ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นกลุ่มควบคุม

3.7 การเตรียม การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ และการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

3.7.1 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Human embryonic stem cells (hESCs) และ Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) สำหรับ hESCs ใช้ Chula2.hES cell line เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อน มีคุณสมบัติ pluripotency ถูกสร้างและนำไปใช้ในงานวิจัยมาก่อน (11, 38, 39) และได้ขึ้นทะเบียนที่ Human Pluripotent Stem Cell Registry (hESCreg Name: CHULAE001-A; Alternative name: Chula2.hES) สำหรับ hiPSCs ใช้ PFX#12 cell line ซึ่ง cell line นี้ ได้มาจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34⁺ ที่แยกได้จาก cord blood ของมนุษย์ ใช้ reprogramming factor ได้แก่ Oct4, Sox2, Klf4 และ c-Myc ด้วย Sendai virus (19) PFX#12 นี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ Shin Kawamata แห่งสถาบัน RIKEN Center of Developmental Biology, Kobe ประเทศญี่ปุ่น โดยขั้นตอนการขอใช้เซลล์ผ่านการทำ Materials Transfer Agreement (MTA)

การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองสายพันธุ์ ก่อนเริ่มกระบวนการทดลองมีความแตกต่างกัน โดย Chula2.hES ถูกสร้างและเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงชนิด HFFs ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ซึ่งประกอบด้วย Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (KO-DMEM; Life Technologies) ที่มี 20% Knockout serum replacement (KSR; Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid (Life Technologies), 0.055 mM β -mercaptoethanol (Life Technologies) ที่มี 8 ng/ml bFGF (R&D Systems) เป็นส่วนประกอบ ในขณะที่ PFX^{#12} ถูกสร้างและเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเซลล์ที่เลี้ยง คือ เลี้ยงบน pronectin extracellular matrix ในน้ำยา ReproFF (ReproCeLL, Japan)

3.7.2 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

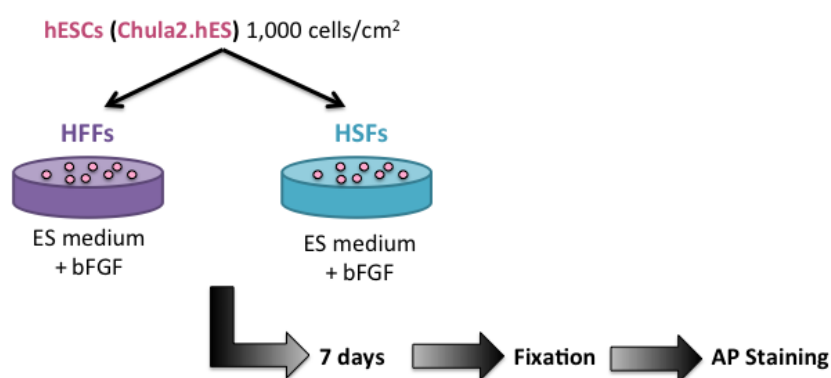
เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ในตู้ CO₂ incubator ที่มี สภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน สังเกตเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์ต้นกำเนิดแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเห็นเป็นกลุ่มของเซลล์หรือโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1,000-2,000 μ m จากนั้น นำเข็ม หรือ ไปเปิดแก้ว ตัดโคโลนีของเซลล์ต้นกำเนิด ให้ได้โคโลนีที่มีขนาดประมาณ 100 μ m และย้ายลงสู่จานเพาะเลี้ยงใหม่ นำเข้าสู่ CO₂ incubator ที่มี สภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C และทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน

3.7.3 การทดสอบความสามารถเบื้องต้น ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นผ่าตัดคลอด

การทดลองนี้ เลือกใช้ Colony-forming unit assay เพื่อทดสอบความสามารถของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นผ่าตัดคลอด ในการสนับสนุนให้เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ Chula2.hES แบ่งตัวและเจริญเติบโตจากเซลล์เดี่ยว (single cell)

ทำการแยกเซลล์ Chula2.hES เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้ TrypLE select (Life Technologies) นับและเลี้ยงเซลล์ Chula2.hES จำนวน 1,000 เซลล์/cm² ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm ร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงชนิด HSFs โดยมีเซลล์ที่เลี้ยงชนิด HFFs เป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ซึ่งประกอบด้วย Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (KO-DMEM; Life Technologies) ที่มี 20% Knockout serum replacement (KSR; Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid (Life Technologies), 0.055 mM β -

mercaptoethanol (Life Technologies) ที่มี 8 ng/ml bFGF (R&D Systems) เลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ในตู้ CO₂ incubator ที่มี สภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C โดยทำการเปลี่ยนน้ำยา เลี้ยงเซลล์ทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน ทำการตรึงเซลล์ต้นกำเนิด Chula2.hES ด้วย 4% paraformaldehyde fixative ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบ alkaline phosphatase (AP) ด้วย alkaline phosphatase characterization kit (Sigma-Aldrich) ประเมินผลโดย นับจำนวนโคโลนีที่ติดสี AP (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 Colony-forming unit assay (AP: alkaline phosphatase)

3.7.4 การพิสูจน์คุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

3.7.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ

หลังจากเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวนอย่างน้อย 10 passages ประมาณ 3-4 เดือน วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อประเมินความสามารถของการคงลักษณะ undifferentiated morphology ของเซลล์ต้นกำเนิด โดยขนาดของ โคโลนีที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500-1,000 μm จำแนกกลุ่มของโคโลนีด้วยการสังเกตจากบริเวณที่ undifferentiated โดยใช้หลักเกณฑ์จากงานวิจัยของ Heng และคณะ ในปี 2006 (40) แบ่งเป็น

เกรด A มีบริเวณที่ undifferentiated มากกว่า 90%

เกรด B มีบริเวณที่ undifferentiated 50-90%

เกรด C มีบริเวณที่ undifferentiated น้อยกว่า 50%

3.7.4.2 การตรวจการแสดงออกของยีน (*gene expression analysis*)

ทำการสกัด RNA จากเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ โดยชุดสกัด RNA สำเร็จรูป GeneJet จากนั้น 1 μ g RNA ถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดย RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit เพิ่มจำนวน cDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่เป็น pluripotent marker ได้แก่ Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4), Nanog homeobox (Nanog), Sex determining region Y-box 2 (Sox2), Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1) และ RNA exonuclease 1 homolog (Rex1) และยีนที่เป็น differentiation marker ได้แก่ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein (ตารางที่ 3) ด้วยเทคนิค real-time PCR โดย Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix และทำให้อยู่ในสถานะที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง ABI 7500 Real-Time PCR System ตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการทำ real-time PCR ที่ขั้นตอน extension ด้วย ABI Sequence Detection Software เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล คำนวณ relative quantification โดยวิธี $\Delta\Delta$ CT ดังสมการ

$$\Delta\text{CT sample} = \text{Ct target}_{\text{sample}} - \text{Ct reference}_{\text{sample}}$$

$$\Delta\text{CT calibrator} = \text{Ct target}_{\text{calibrator}} - \text{Ct reference}_{\text{calibrator}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT sample} - \Delta\text{CT calibrator}$$

$$\text{ดังนั้น relative quantification} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.7.4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน (Immunocytochemistry)

ตรึงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ด้วย 4% paraformaldehyde fixative ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สำหรับการตรวจสอบโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular marker) ได้แก่ Oct4, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ต้องผ่านการ permeabilization โดยใช้ 0.2% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) ใน PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15-20 นาที ส่วนการตรวจสอบโปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์ไม่ต้องผ่านการ permeabilization ก่อน ได้แก่ Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) และ Tumor rejection antigen-1-60 (TRA-1-60) (ตารางที่ 4) จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ 5% blocking serum ซึ่ง blocking serum ที่ใช้เป็น goat serum หรือ rabbit serum ขึ้นอยู่กับ specific antibody ที่ใช้ในการย้อมสีทางอิมมูโน ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45-60 นาที ใส่ primary antibody เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในวันต่อมา ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นใส่ secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45-60 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5

นาที และใส่สีย้อม DAPI ที่งัวที่อุณหภูมิต้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจากนั้นตรวจสอบการย้อมติดสีของเซลล์และตรวจสอบ alkaline phosphatase marker ด้วย alkaline phosphatase detection kit (Sigma-Aldrich) ดังขั้นตอนที่ได้อธิบายแล้วในข้อ 3.7.3

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR ของยีน Oct4, Nanog, Sox2, UTF1, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein (F: forward primer; R: reverse primer, hGAPDH: human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	หมายเหตุ	เอกสารอ้างอิง
Oct4 - F	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	Pluripotent marker	(17)
Oct4 - R	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAC		
Nanog - F	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC		
Nanog - R	CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC		
Sox2 - F	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG		
Sox2 - R	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG		
UTF - F	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG		
UTF - R	CGCGCTGCCCAAGATGAAGCCAC		
Rex1 - F	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT		
Rex1 - R	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA		
Nestin - F	CTCTGACCTGTGAGAAGAAT	Ectoderm marker	(36)
Nestin - R	CCCCTTTCTTCTCATCTG		
Brachyury - F	GCCCTCTCCCTCCCTCCACGCACAG	Mesoderm marker	
Brachyury - R	CGGCGCCGTTGCTCACAGACCACAGG		
α -fetoprotein - F	GAATGCTGCAAACAGGACGCTGGAAC	Endoderm marker	
α -fetoprotein - R	TGGCATTCAAGAGGGTTTTCAGTCTGGA		
hGAPDH - F	AGCCACA TCGCTCAGACACC	Endogenous control	
hGAPDH - R	GTAATCAGCGCCAGCATCG		

ตารางที่ 4 Primary antibodies ที่ใช้สำหรับการย้อมสีทางอิมมูโน

Primary Antibody	Type	No. catalog	Company
Oct4	Rabbit polyclonal IgG	ab18976	Abcam
SSEA3	Rat monoclonal IgM	ab16286	Abcam
TRA-1-60	Mouse monoclonal IgM	MAB4360	Millipore
Nestin	Mouse monoclonal IgG1 κ	656802	BioLegend
Brachyury	Rabbit polyclonal IgG	ab20680	Abcam
α -fetoprotein	Mouse monoclonal IgG1	ab3969	Abcam

ตารางที่ 5 Secondary antibodies ที่ใช้สำหรับการย้อมสีทางอิมมูโน

Secondary antibody	No. catalog	Company
Alexa-Fluor conjugated with goat anti mouse IgG, IgM	a10680	Life Technologies
Alexa-Fluor conjugated with goat anti rabbit IgG, IgM	a11036	Life Technologies
Cyt3 conjugated with goat anti mouse IgG	AP181C	Millipore

3.7.4.4 การตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Stage-specific embryonic antigen-4

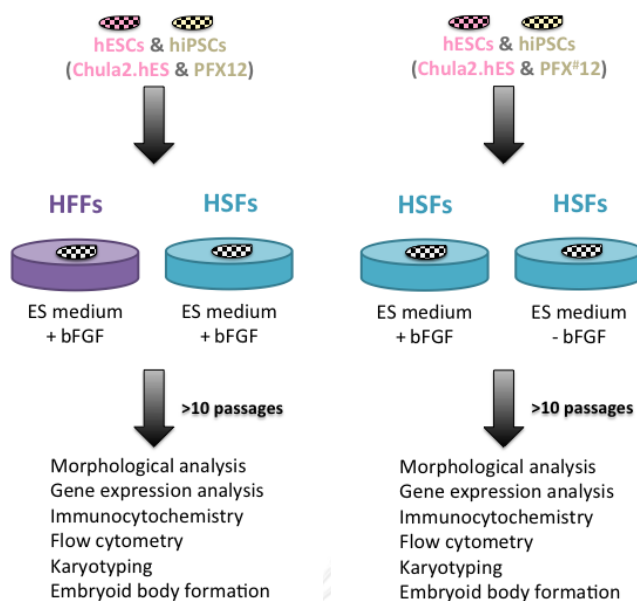
ล้างเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ด้วย PBS 1 ครั้ง แยกเซลล์ต้นกำเนิดออกจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย Versene (Life Technologies) จากนั้นย้ายเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml ปั่นเหวี่ยงด้วย ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 24°C เป็นเวลา 5 นาที และปั่นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เติม 100 μ g/ μ l FITC anti-human Stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA4) (BioLegend) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ย้อมเซลล์ตาย และนิวเคลียสของเซลล์ด้วย propidium iodide (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดใน 500 μ l PBS กรองผ่าน filter ขนาด 100 μ m ลงในหลอดทดลองสำหรับตรวจสอบด้วย flow cytometry และประมวลผลด้วย flow cytometer (BD Bioscience)

3.7.4.5 การตรวจสอบลักษณะของโครโมโซม

ทำการตรวจสอบลักษณะของโครโมโซม ด้วยเทคนิค G-banding ทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ metaphase ด้วย 0.05 µg/ml Colcemid solution (Biological Industries) บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2.5-3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง Versene (Life Technologies) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายด้านบนออก ให้เหลือเพียงตะกอนเซลล์ เติมหypotonic solution (0.075 M KCl) 5 ml บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15-20 นาที ขั้นตอน pre-fixed เติมหาสารละลาย fixative 5 ml (Methanol : Acetic acid; 3:1) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำขั้นตอน fix โดยเติมหาสารละลาย fixative 5 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำขั้นตอน fixed อีก 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค chromosomal G-banding โดยผู้เชี่ยวชาญด้าน cytogenetic

3.7.4.6 การเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในจานเพาะเลี้ยง (*in vitro differentiation*)

ตัดโคโลนีของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ให้เป็นชิ้นเล็กด้วยการใช้เข็มตัดย้ายเซลล์ลงสู่จานเพาะเลี้ยงแบบ low adhesion เพื่อเลี้ยงชิ้นโคโลนีแบบแขวนลอย ในจานเพาะเลี้ยง เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชิ้นโคโลนีจะฟอร์มเป็นรูปทรงกลม (embryoid bodies; EB) จากนั้นเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยง EB ซึ่งประกอบด้วย knock out DMEM ที่มี 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid, 0.055 mM β-mercaptoethanol เพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่มีสภาวะ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37°C โดยเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยง EB ทุก 3 วัน เป็นเวลา 10 วัน ย้าย EB ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบผิวด้วย 0.1% gelatin และเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยง EB ต่อไป อีก 12-14 วัน และทำการย้อมสีทางอิมมูโนเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ Nestin (ectoderm marker), Brachyury (mesoderm marker) และ α-fetoprotein (endoderm marker) ดังขั้นตอนและวิธีการในข้อ 4.4.3



รูปที่ 5 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดหลังเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยง

3.8 การทดสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็น ผ่าตัดคลอด เมื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี basic fibroblast growth factor

เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์บนเซลล์ที่เลี้ยง ชนิดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็น ผ่าตัดคลอด ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ซึ่งประกอบด้วย Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (KO-DMEM; Life Technologies) ที่มี 20% Knockout serum replacement (KSR; Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non-essential amino acid (Life Technologies), 0.055 mM β -mercaptoethanol (Life Technologies) ที่มี 8 ng/ml bFGF (R&D Systems) หรือ ไม่มี 8 ng/ml bFGF

ทำการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 4.2

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ด้วยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ, ตรวจการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA, ตรวจการแสดงออก pluripotent markers ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน (Immunocytochemistry), เหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในงานเพาะเลี้ยง (in vitro differentiation), ตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมด้วยขั้นตอนและวิธีที่ได้อธิบายแล้วข้างต้น

3.9 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ประกอบด้วยรูปถ่ายและผลการคำนวณจากโปรแกรม ข้อมูลที่เก็บรวบรวมจะนำไปใช้เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

คำนวณทางสถิติแบบ One-way ANOVA และ student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22.0 รายงานผล เป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคาดเคลื่อนมาตรฐานของ ค่าเฉลี่ย

3.11 การพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการวิจัยนี้ได้ปฏิบัติตามหลักจริยธรรมการวิจัย 3 ข้อ ดังนี้

หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลอย่างครบถ้วน จนผู้ที่ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการวิจัยเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอม เข้าร่วมในการวิจัย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของอาสาสมัครโดยไม่มี identifier ในแบบบันทึก ข้อมูลที่จะระบุถึงตัวอาสาสมัคร ส่วนการใช้ cesarean scar fibroblasts ที่เก็บไว้ของโครงการ หมายเลข 301/55 ผู้วิจัยไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้บริจาค จึงจะขอยกเว้นการขอ ความยินยอมจากผู้ที่ได้รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) เนื่องจาก เนื้อเยื่อแผลเป็นเดิมหลังจากผ่าตัดออกตามกระบวนการผ่าตัดคลอดตามปกติจะถูกนำไปทิ้ง ดังนั้น การบริจาคจึงไม่มีความเสี่ยงต่อผู้บริจาค ผู้บริจาคจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลจากการศึกษาที่ได้จะเกิดประโยชน์ต่อการวิจัย ความก้าวหน้าทางวิชาการแพทย์

หลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน มีการกระจาย ความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน

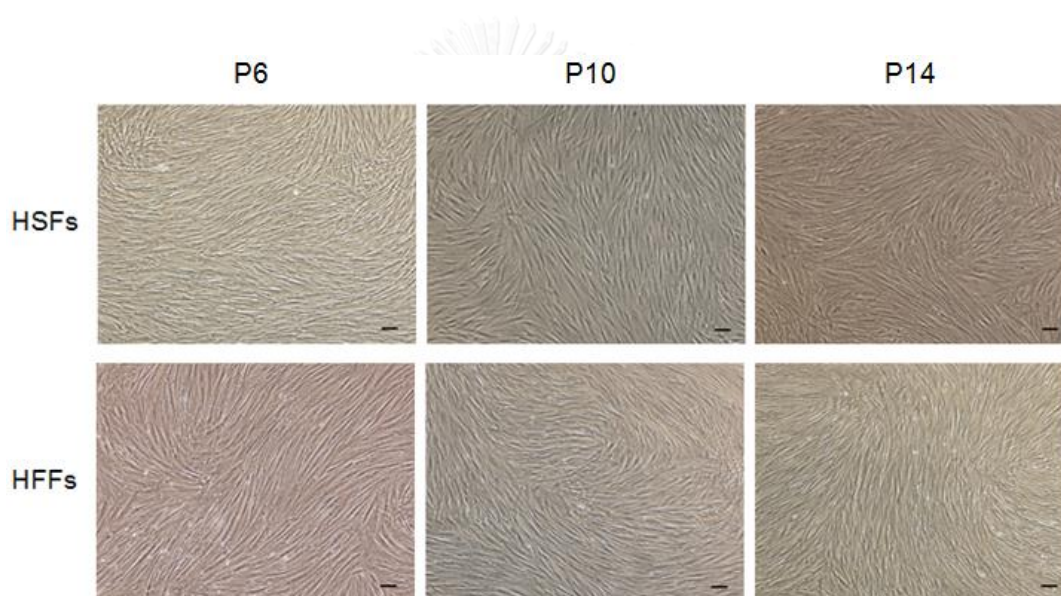
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดลองที่ 1: คุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

4.1.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

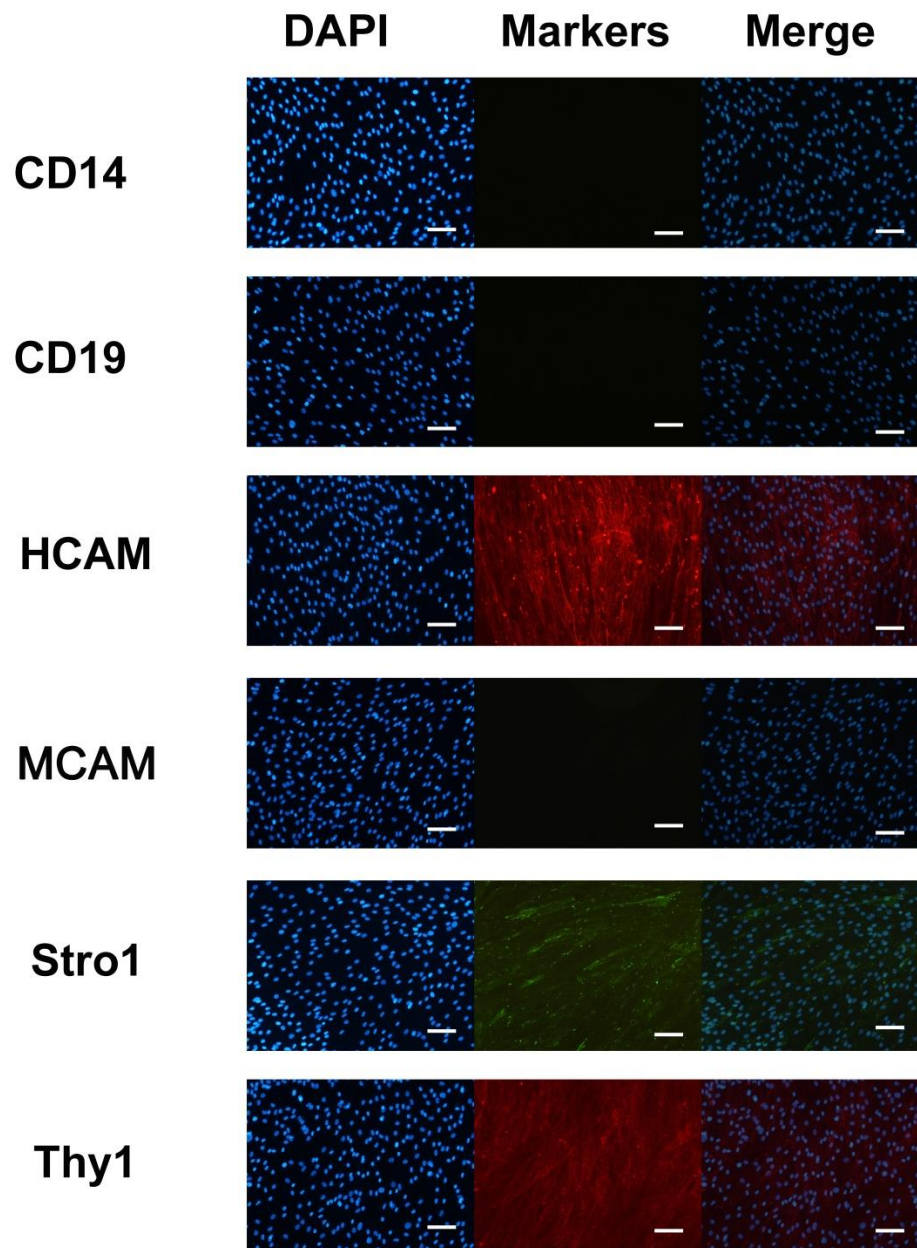
ผลการทดลองพบว่า HSFs มีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกับ HFFs คือ มีลักษณะเรียวยาว เป็นรูปกระสวย เรียงตัวเป็นระเบียบ พบลักษณะดังกล่าวในทุก passage number ที่ตรวจสอบ ได้แก่ passage number ที่ 6, 10 และ 14 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของ HSFs และ HFFs (P6, P10, P14) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Scale bar=100 μ m)

4.1.2 การตรวจสอบ mesenchymal stem cell markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

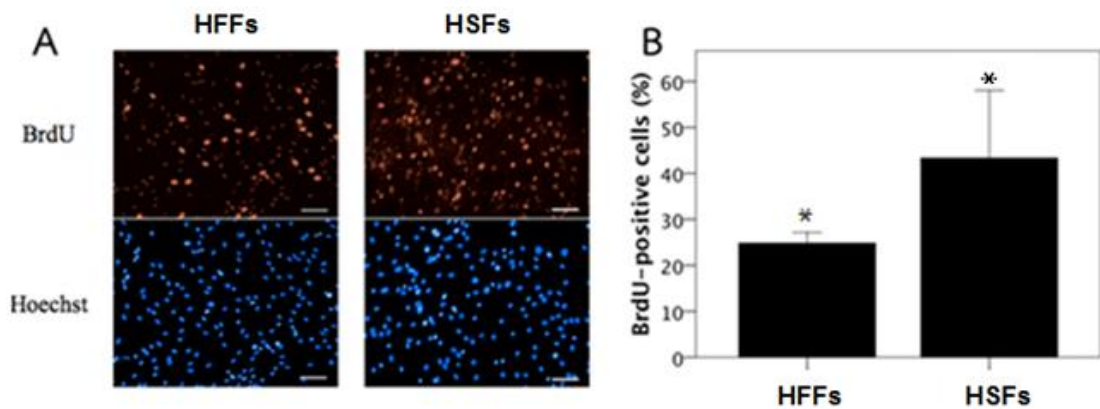
ผลการทดลองพบว่า HSFs มีการแสดงออกของ mesenchymal stem cell (MSC) markers โดยให้ผลบวกต่อ MSC positive markers 3 ชนิด ได้แก่ HCAM, Stro1 และ Thy1 (CD90) ให้ผลลบ 1 ชนิด ได้แก่ MCAM (CD146) และให้ผลลบต่อ MSC negative markers ได้แก่ CD14 และ CD19 (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ mesenchymal stem cell markers ของ HSFs (P7) (Scale bar=100 μ m)

4.1.3 ผลการตรวจสอบ proliferation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

หลังจากการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ 15 passages และทดสอบการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วยวิธี BrdU proliferation assay นับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี (รูปที่ 8A) พบว่าสัดส่วนของจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ให้ผลบวกต่อ BrdU ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดใน HSFs ($43.35 \pm 3.42\%$) สูงกว่าใน HFFs ($24.83 \pm 0.54\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.006$) (รูปที่ 8B)

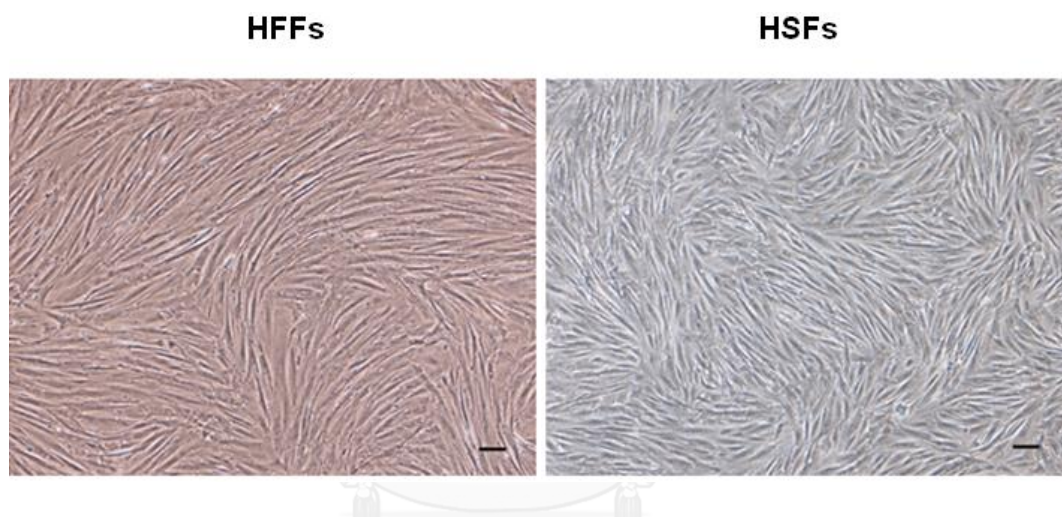


รูปที่ 8 A: ผลการย้อมสีย้อมสีทางอิมมูโนของ HSFs และ HFFs (P15) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Scale bar = 100 μm) B: เปรียบเทียบสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ BrdU ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด ของ HSFs และ HFFs (P15) (* $P=0.006$)

4.2 ผลการทดลองที่ 2: คุณสมบัติการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นที่ทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย mitomycin C

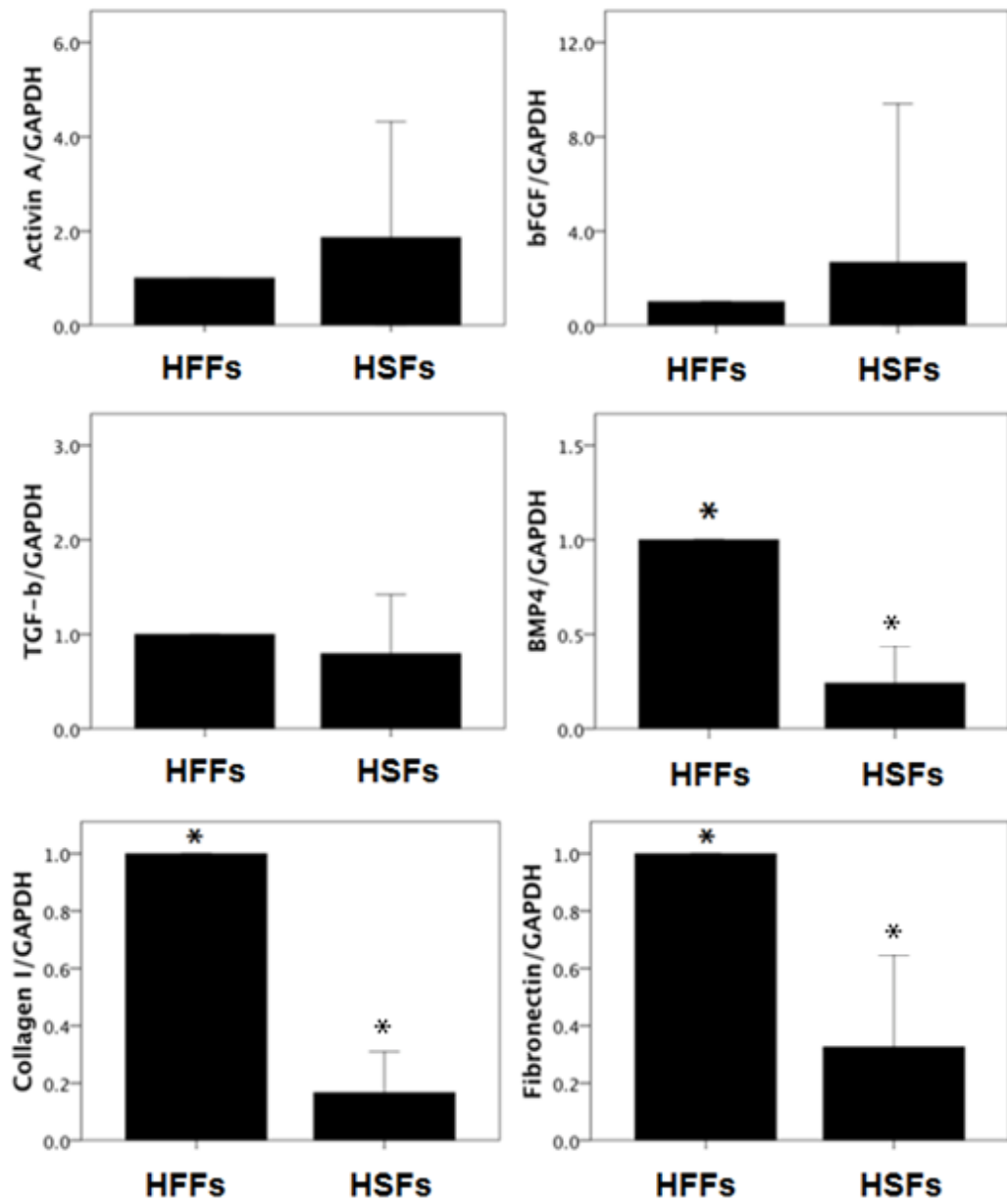
ผลการทดลองพบว่า mitomycin C ไม่ทำให้ HSFs ตาย และเซลล์มีลักษณะทางกายภาพ เรียวยาว เป็นรูปกระสวย เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ตามปกติ ซึ่งคล้ายคลึงกับ HFFs (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของ HSFs และ HFFs (P8) หลังจากทำให้หยุดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย mitomycin C (Scale bar=100 μ m)

4.2.2 ตรวจสอบ supportive feeder markers ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction

ผลการทดลองพบว่า HSFs กับ HFFs มีการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1 ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ HSFs มีการแสดงออกของยีน BMP4, Collagen I และ Fibronectin ในระดับที่ต่ำกว่า ใน HFFs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (รูปที่ 10)

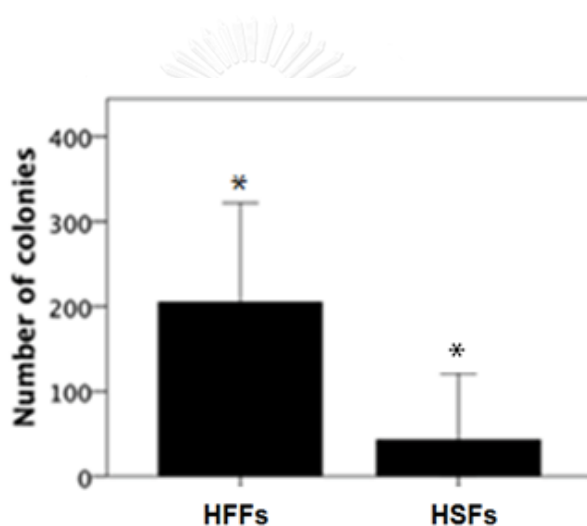


รูปที่ 10 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP4, Collagen I และ Fibronectin ระหว่างใน HSFs กับ HFFs (P8-10) (* P<0.001)

4.3 ผลการทดลองที่ 3: ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอดที่ใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง

4.3.1 การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

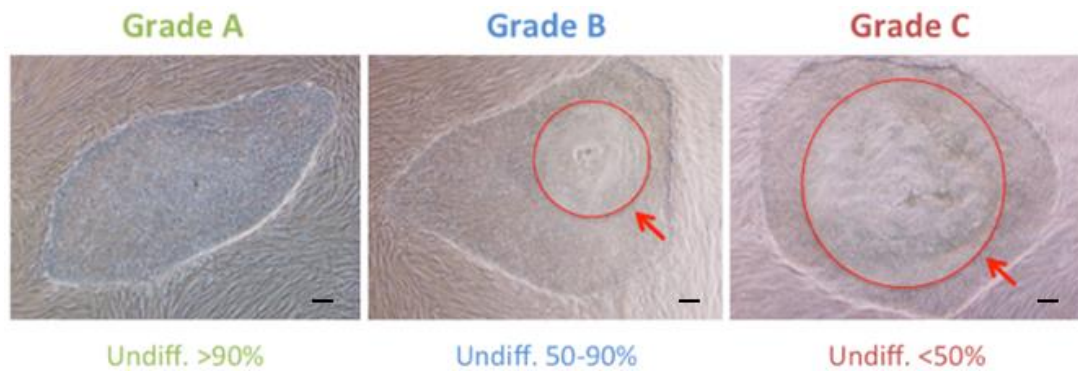
ผลการทดลองพบว่า HSFs สามารถสนับสนุนให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์มีศักยภาพในการแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีจากเซลล์เดี่ยวได้ โดยมีโคโลนีที่ให้ผลบวกต่อ Alkaline phosphatase เป็นจำนวน 43 ± 18.00 โคโลนี ซึ่งน้อยกว่า ใน HFFs ที่มีจำนวน 205 ± 27.15 โคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.008$) (รูปที่ 11)



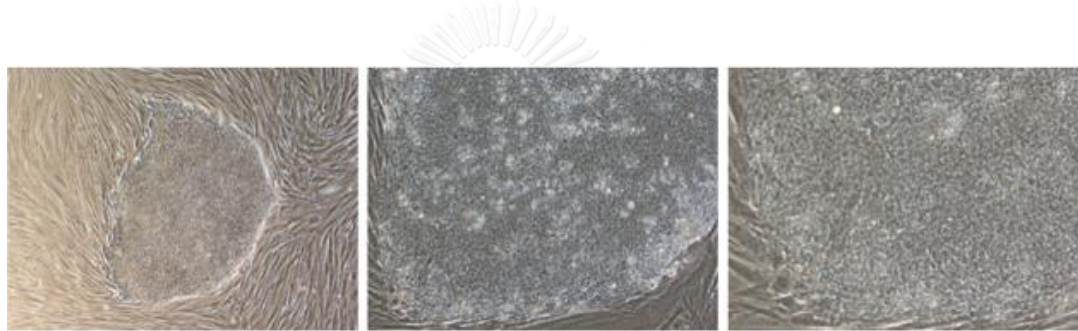
รูปที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของ Chula2.hES (P15+5) ที่สร้างขึ้นจากเซลล์เดี่ยวบนเซลล์พี่เลี้ยง HSFs (P9) และ HFFs (P6) (* $P=0.008$)

4.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

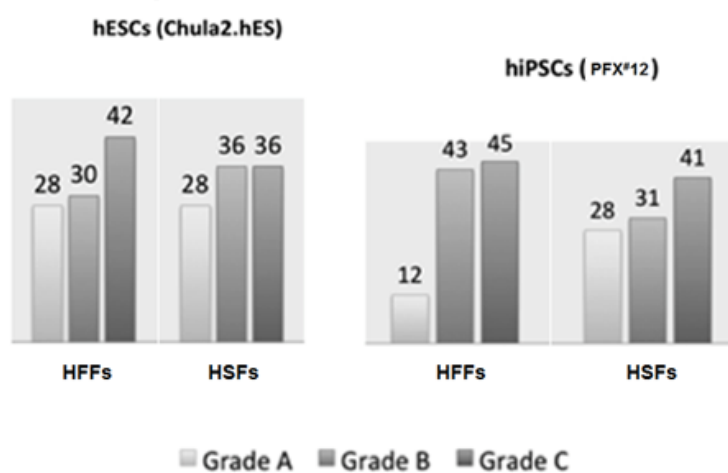
หลังจากที่ทดลองใช้ HSFs เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ hESCs (Chula2.hES) และ hiPSCs (PFX[#]12) พบว่า HSFs สามารถสนับสนุนการเจริญของ Chula2.hES และ PFX[#]12 ได้มากกว่า 10 passages จากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนีและจัดจำแนกเป็น 3 เกรด ตามเกณฑ์ของงานวิจัยก่อนหน้า (40) (รูปที่ 12-13) พบว่า Chula2.hES ที่เลี้ยงบน HSFs มีจำนวนโคโลนีเกรด A และ B ใกล้เคียงกับที่เลี้ยงบน HFFs ส่วนใน PFX[#]12 กลุ่มที่เลี้ยงบน HSFs พบโคโลนีเกรด A จำนวนมากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงบน HFFs ในปริมาณมาก ดังนั้น HSFs น่าจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงสำหรับ Chula2.hES และ PFX[#]12 นี้ได้ดีกว่า HFFs (รูปที่ 14)



รูปที่ 12 ตัวอย่างการจำแนกลักษณะทางกายภาพของโคโลนีเป็น 3 เกรด ลูกศรชี้แสดงบริเวณที่ differentiate (Undiff.: Undifferentiated region of hPSC colony, scale bar = 100 μ m)



รูปที่ 13 ตัวอย่างลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ เกรด A ที่กำลังขยาย 40X, 100X และ 200X ตามลำดับ

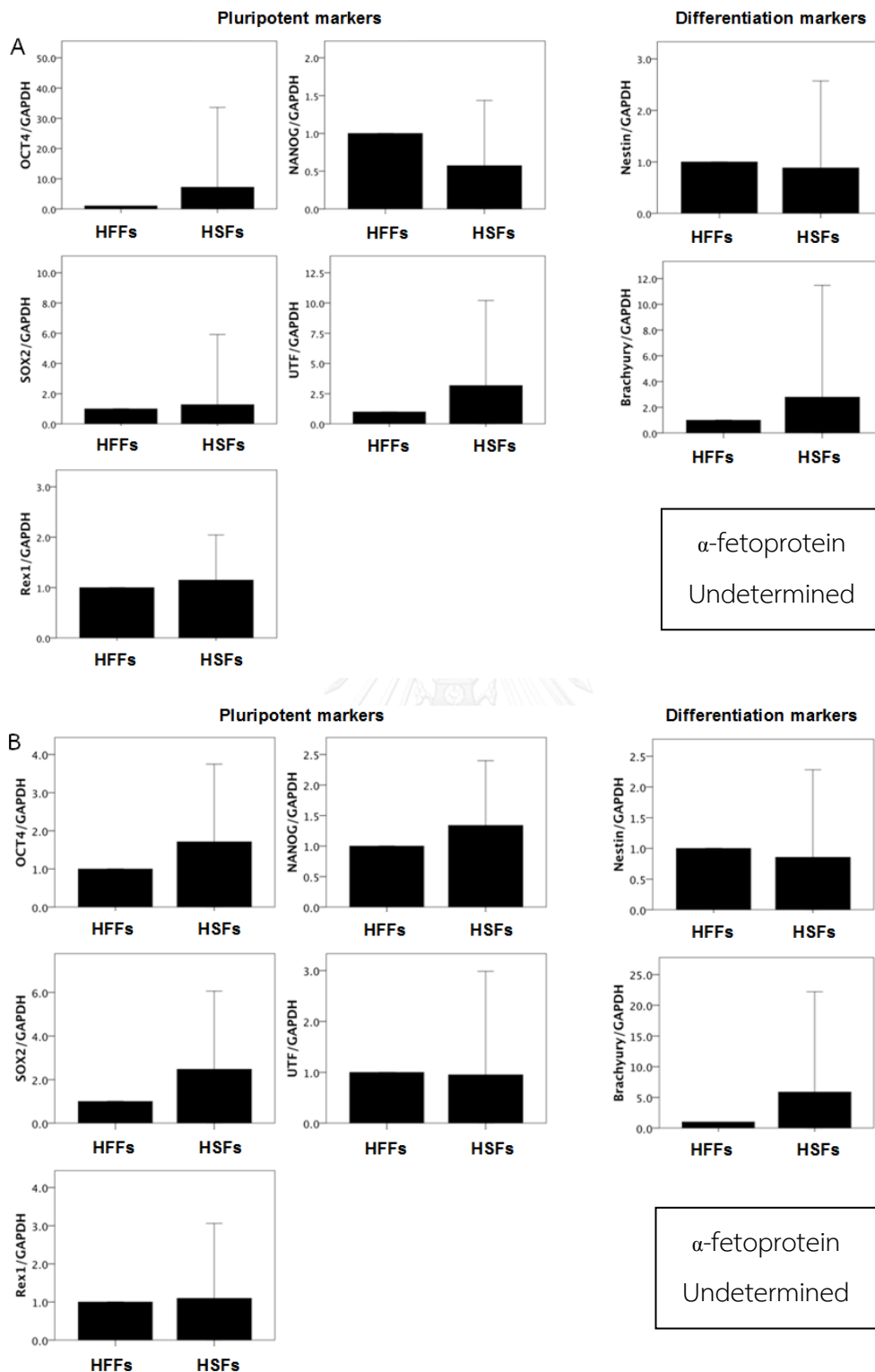


รูปที่ 14 กราฟแสดงร้อยละของโคโลนีเกรด A, B และ C ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ PFX^{#12} (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง จาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

4.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent และ differentiation markers ใน เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction

ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES และ PFX^{#12} ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs มีการแสดงออกของ pluripotent marker ได้แก่ ยีน Oct4, Nanog, Sox2, UTF และ Rex1 ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน มีการแสดงออกของ differentiation marker ได้แก่ ยีน Nestin, Brachyury ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน และ ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน α -fetoprotein ทั้งใน Chula2.hES และ PFX^{#12} ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (รูปที่ 15)

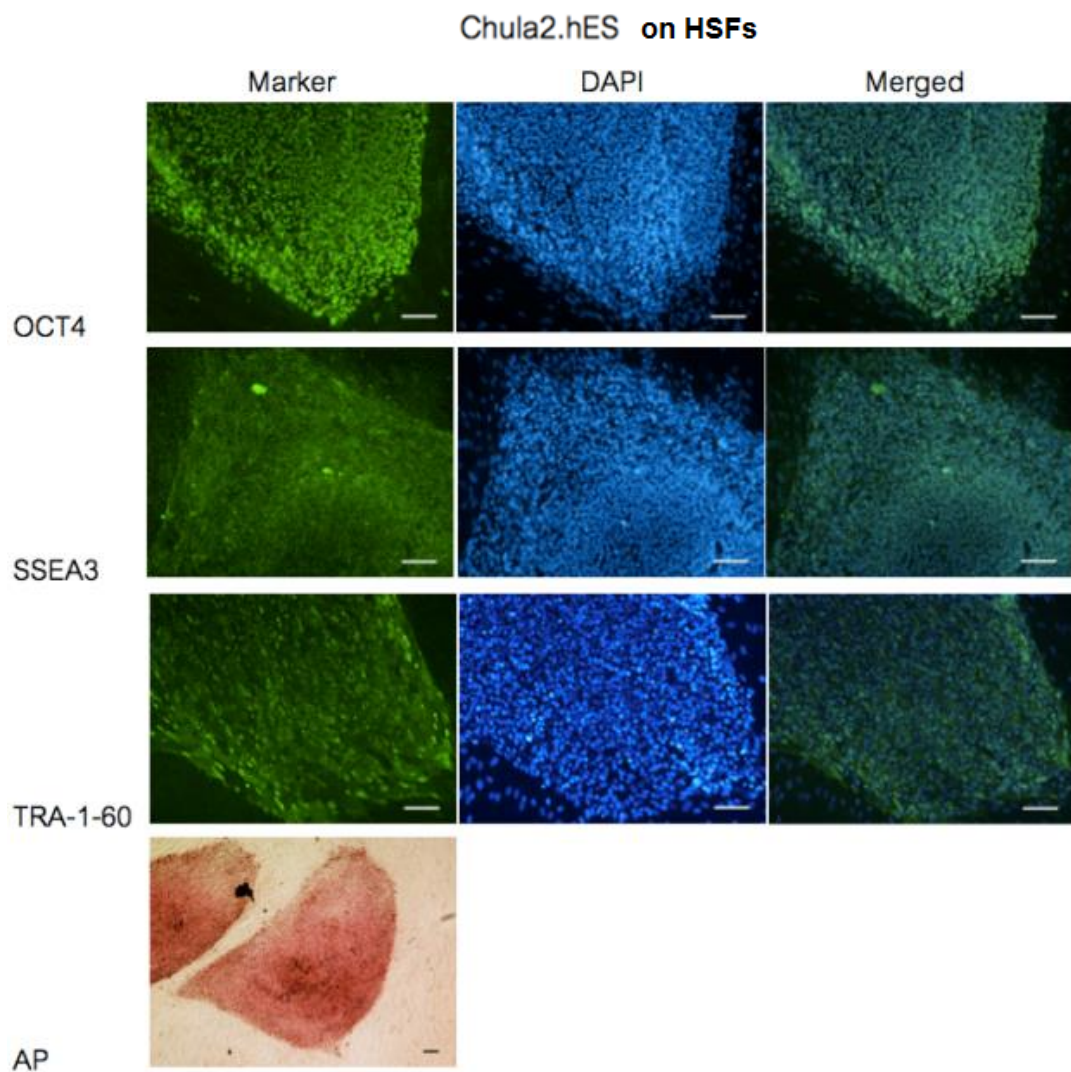




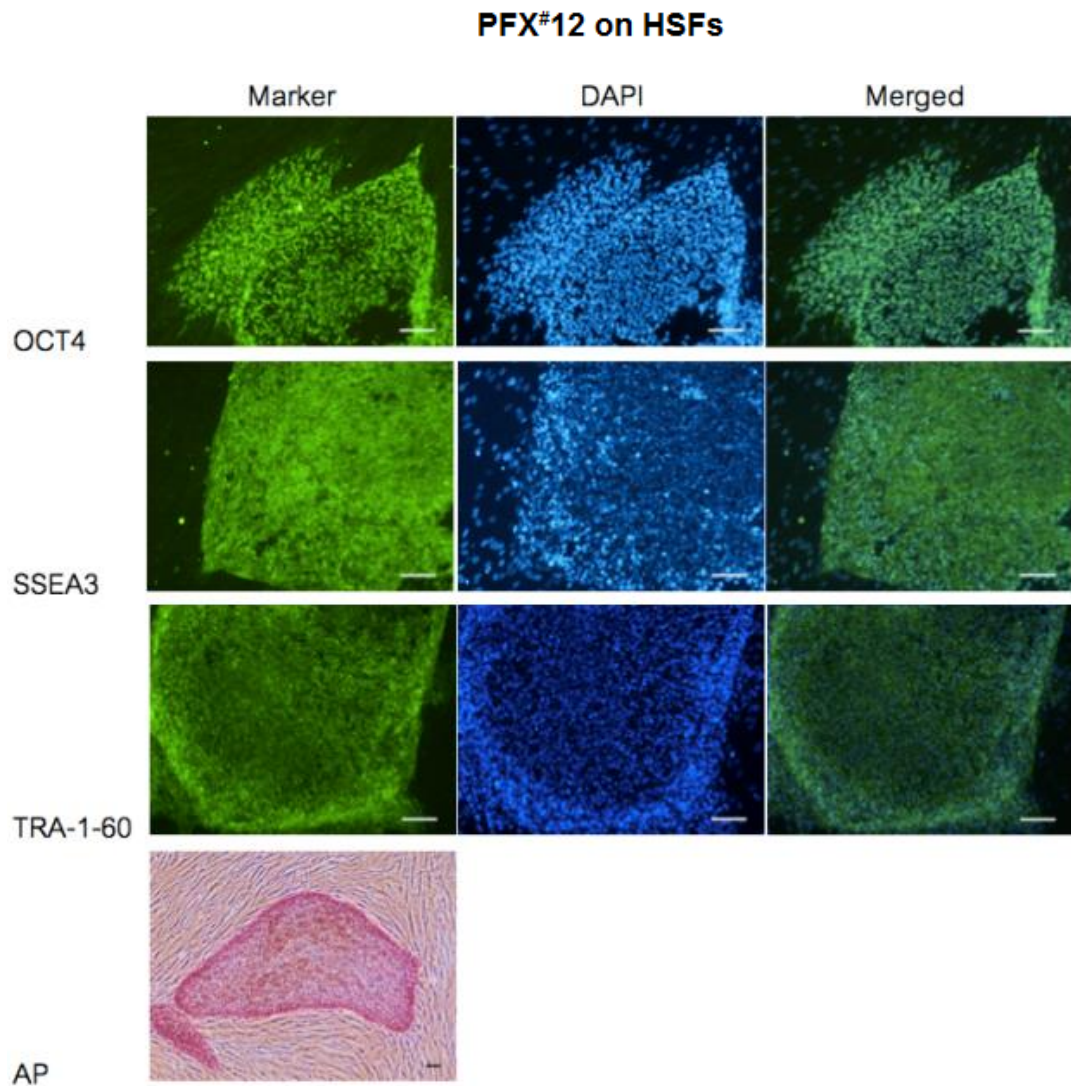
รูปที่ 15 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Oct4, Sox2, UTF, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน **A**: Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ **B**: PFX[#] 12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

4.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน

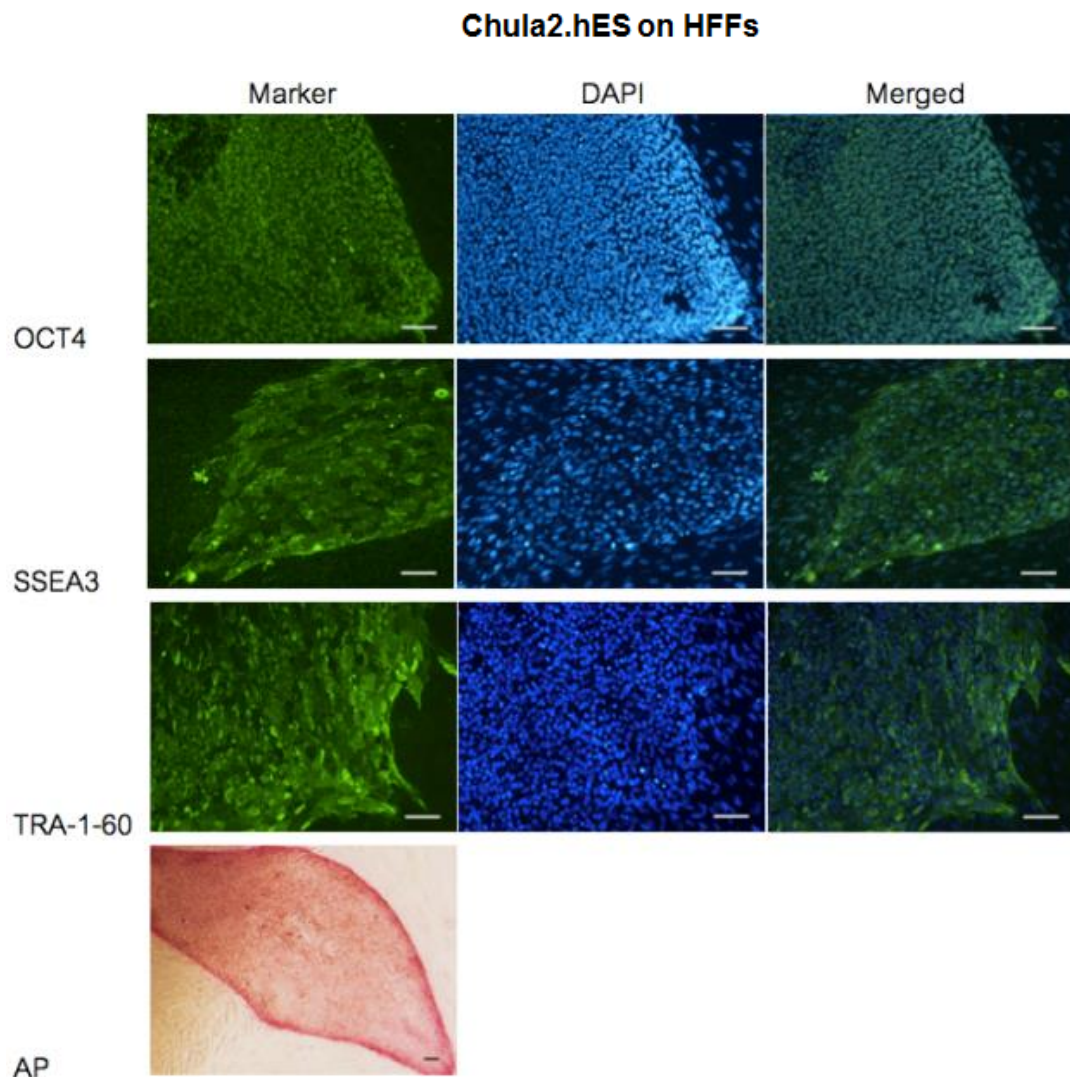
ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES และ PFX[#]12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs ให้ผลบวกต่อ pluripotent markers ทั้งหมด ได้แก่ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) (รูปที่ 16-19)



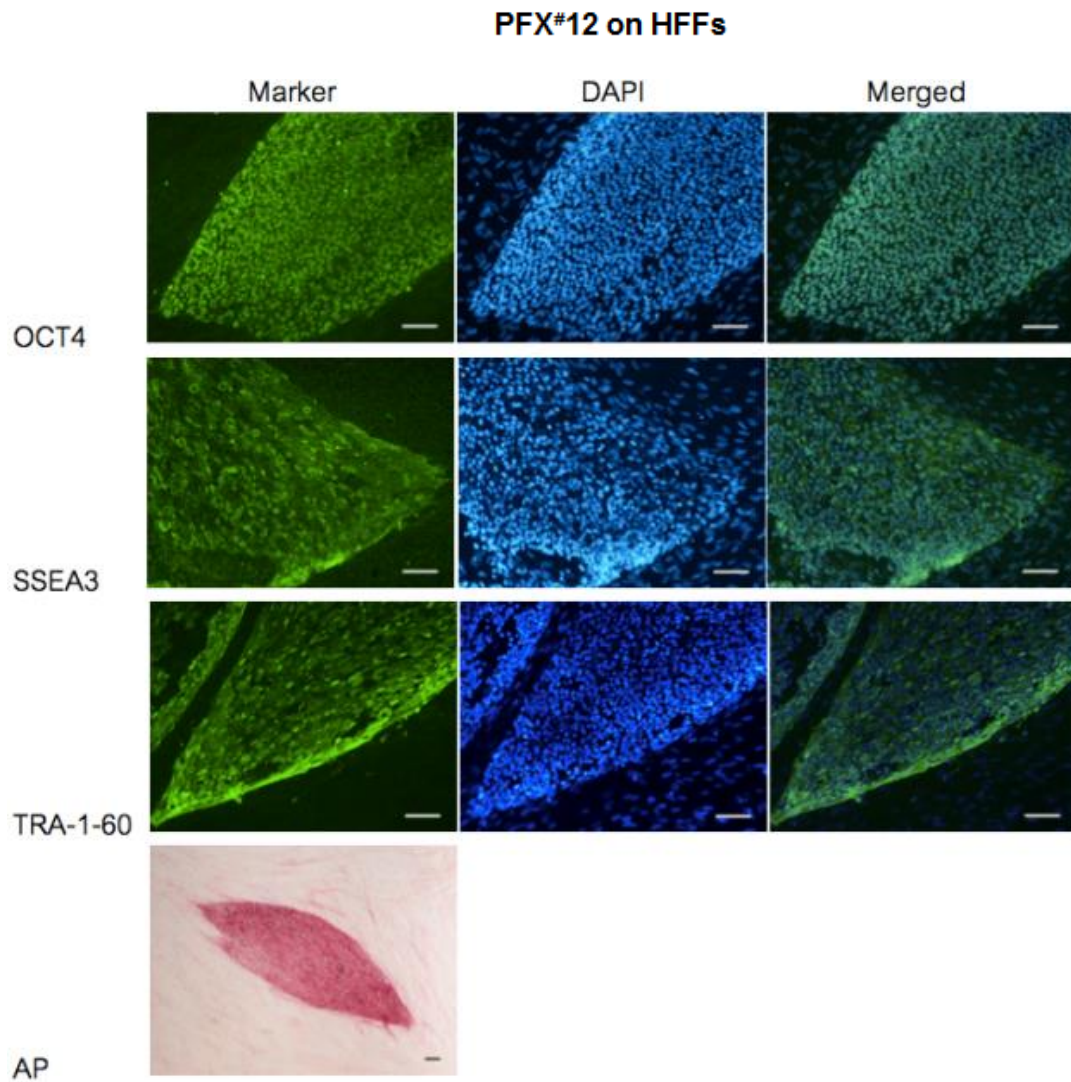
รูปที่ 16 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด (Scale bar=100 μ m)



รูปที่ 17 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) ของ PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด (Scale bar=100 μ m)



รูปที่ 18 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด (Scale bar=100 μ m)

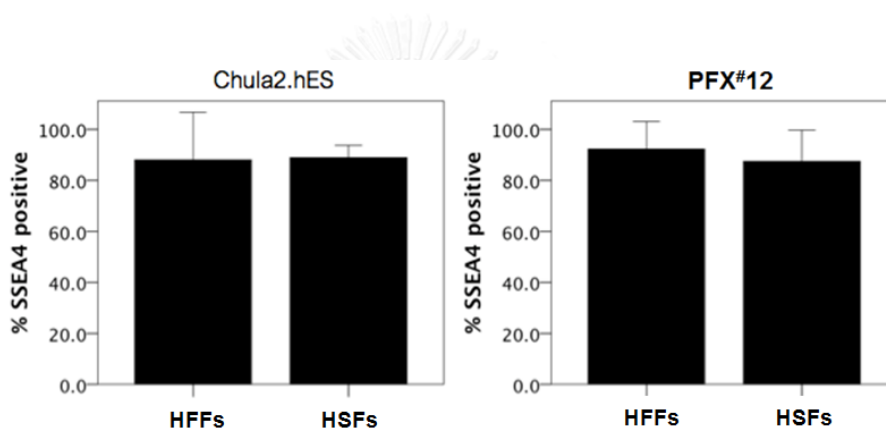


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 19 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) ของ PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด (Scale bar=100 μ m)

4.3.5 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Flow cytometry

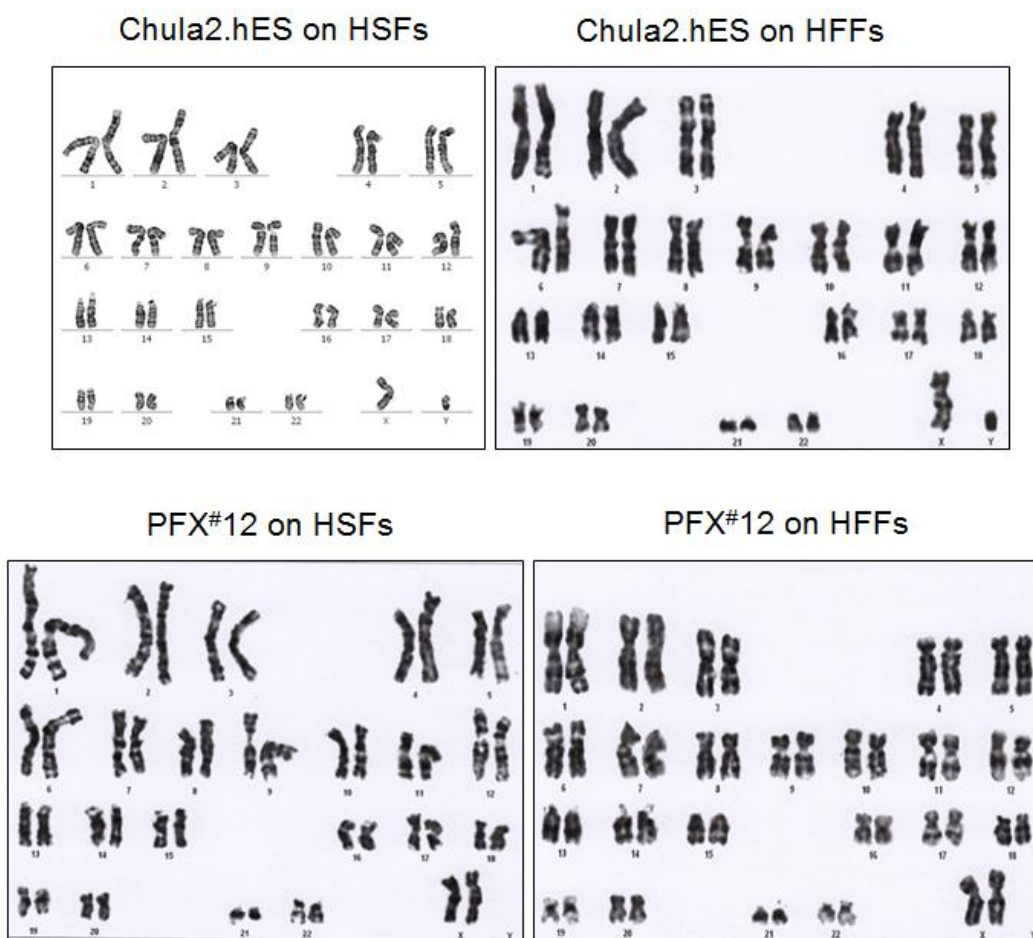
ผลการทดลองพบว่า ใน Chula2.hES ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $88.9 \pm 1.93\%$ และ Chula2.hES ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HFFs มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $88.0 \pm 7.54\%$ ใน PFX#12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $87.4 \pm 4.93\%$ และ PFX#12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HFFs มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $92.3 \pm 4.33\%$ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 ในแต่ละกลุ่มดังกล่าว พบว่า ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) และ PFX#12 (P30+10 – P30+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

4.3.6 การตรวจสอบโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES มีโครโมโซมที่ปกติ 46, XY และ PFX#12 มีโครโมโซมที่ปกติ 46, XX (รูปที่ 21)

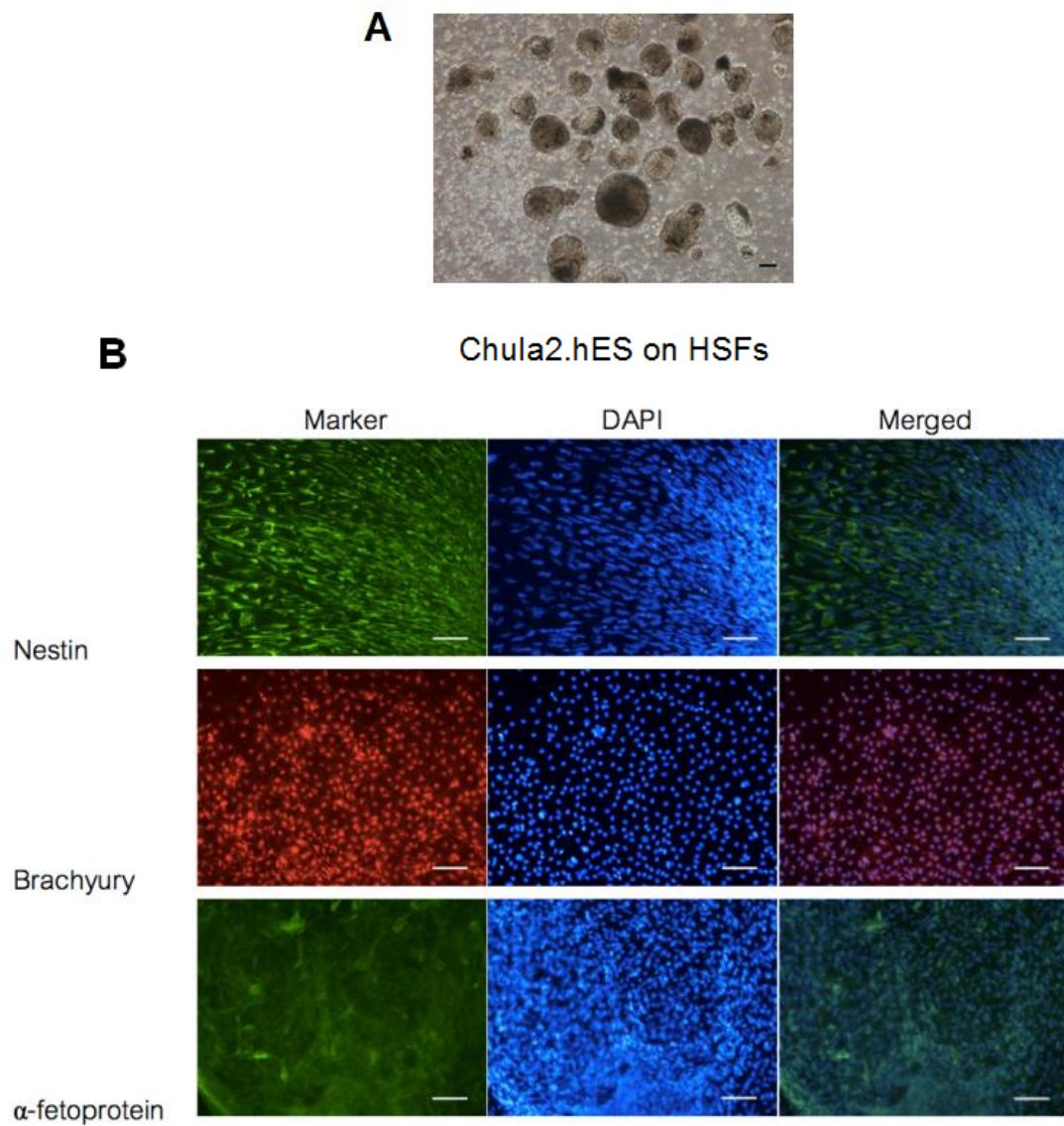


รูปที่ 21 ผลการตรวจคาริโอไทป์ของ Chula2.hES (P15+15) และ PFX# 12 (P30+15) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs และ HFFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

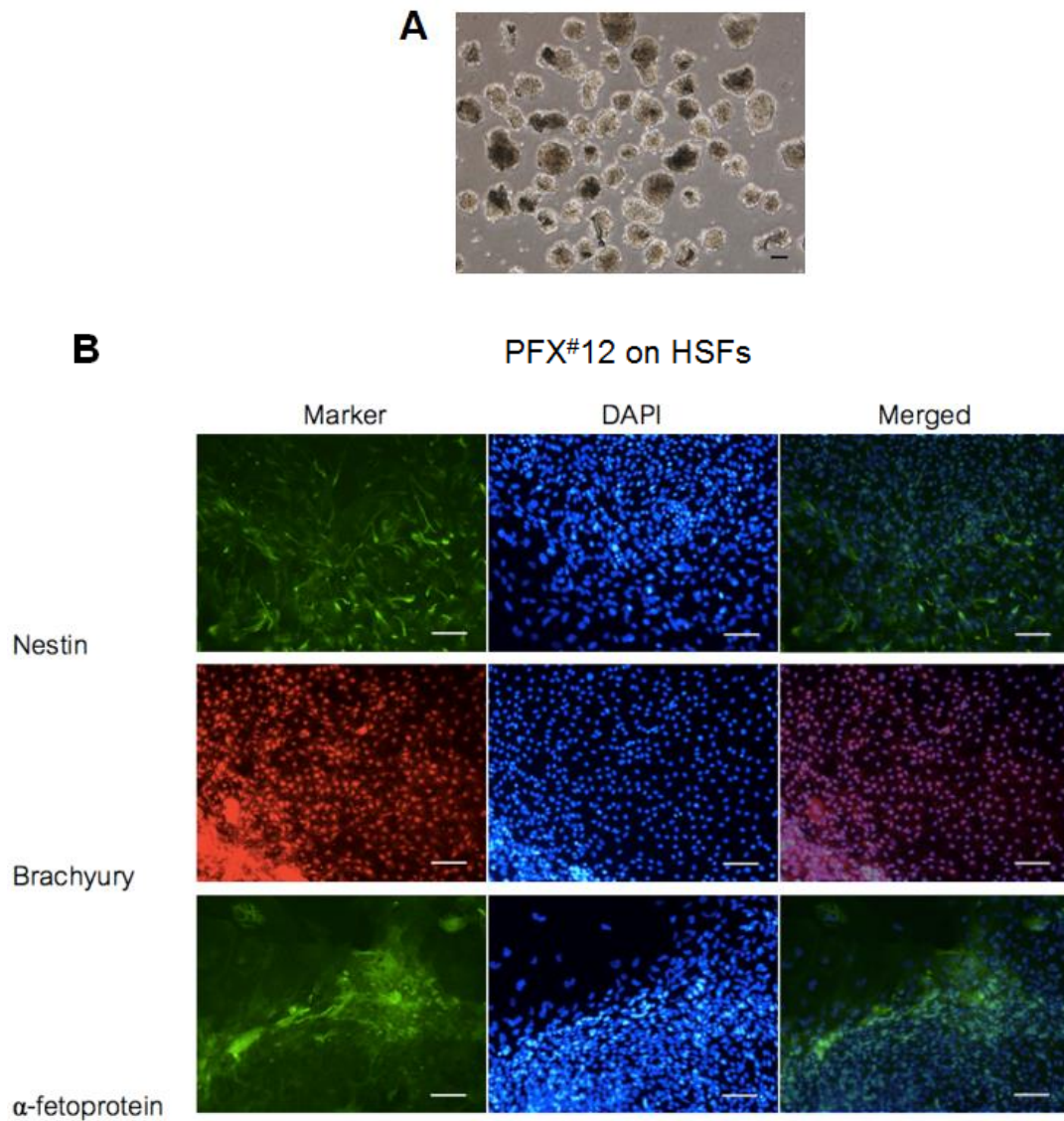
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3.7 การตรวจสอบคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในจานเพาะเลี้ยงเซลล์

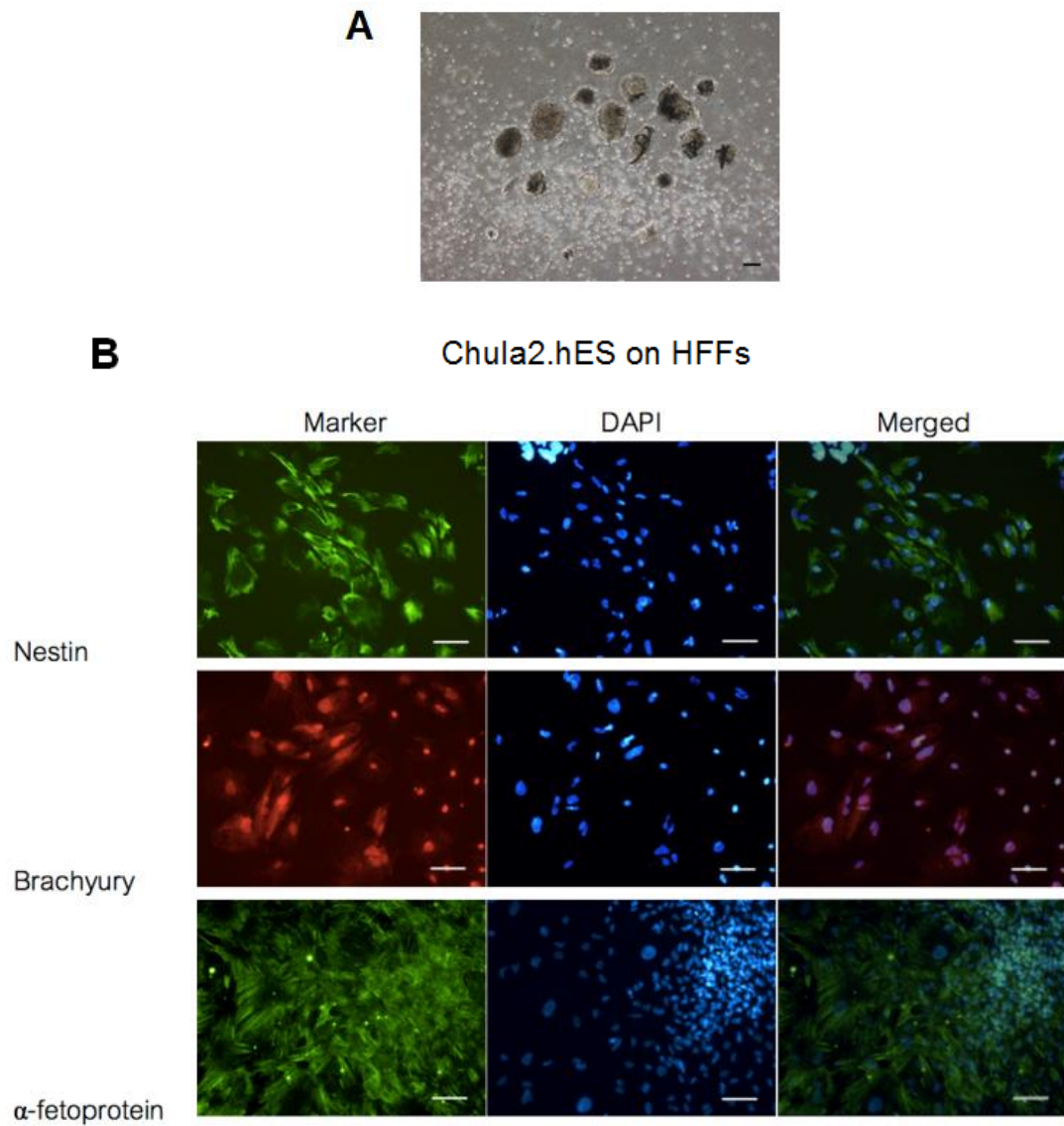
ภายหลังการเปลี่ยนการเลี้ยงเซลล์ให้เหมาะสมต่อการสร้าง embryoid body ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์และทำให้เกิด spontaneous differentiation ไปเป็น embryonic three germ layers ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES และ PFX# 12 ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับ HSFs สามารถสร้างโครงสร้างของ embryoid body ได้ และให้ผลบวกต่อ embryonic three germ layer markers ได้แก่ Nestin (ectoderm), Brachyury (mesoderm) และ α -fetoprotein (endoderm) (รูปที่ 22-23) เช่นเดียวกับ Chula2.hES และ PFX# 12 ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับ HFFs (รูปที่ 24-25)



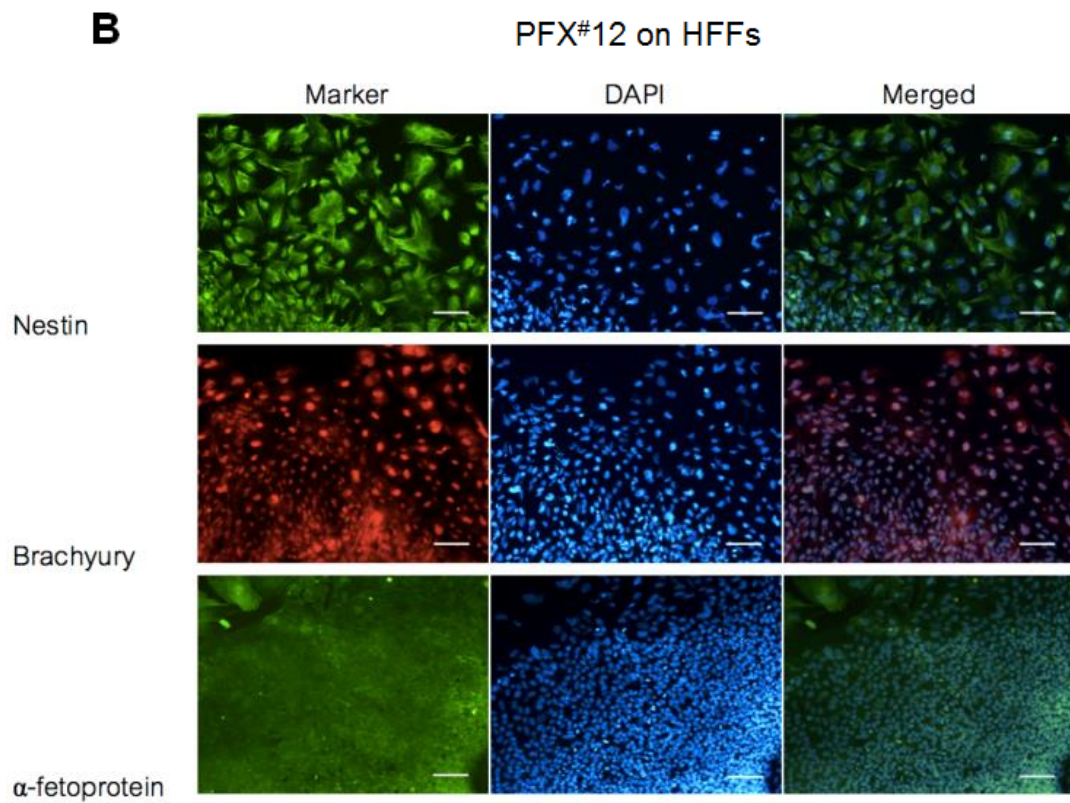
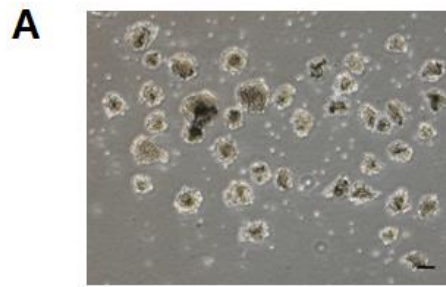
รูปที่ 22 A: embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมสำหรับ spontaneous differentiation (Scale bar=100 μ m)



รูปที่ 23 A: embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมสำหรับ spontaneous differentiation (Scale bar=100 μ m)



รูปที่ 24 A: embryoid body **B:** ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมสำหรับ spontaneous differentiation (Scale bar=100 μ m)



รูปที่ 25 A: embryoid body B: ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน PFX[#]12 (P30+10 – P30+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HFFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมสำหรับ spontaneous differentiation (Scale bar=100 μ m)

4.4 ผลการทดลองที่ 4: ผลของ basic fibroblast growth factor ต่อคุณสมบัติ pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกจากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด

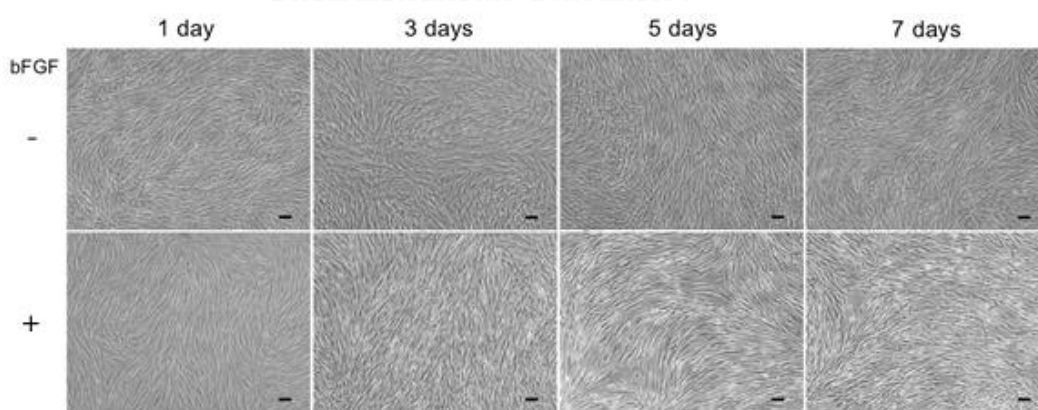
4.4.1 ปริมาณการหลั่ง basic fibroblast growth factor ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

ผลการทดลองพบว่า HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ที่ไม่มี bFGF สามารถหลั่ง bFGF ได้ปริมาณ 0.033 ng/ml

4.4.2 ผลของ basic fibroblast growth factor ต่อเซลล์ที่เลี้ยงจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

4.4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น

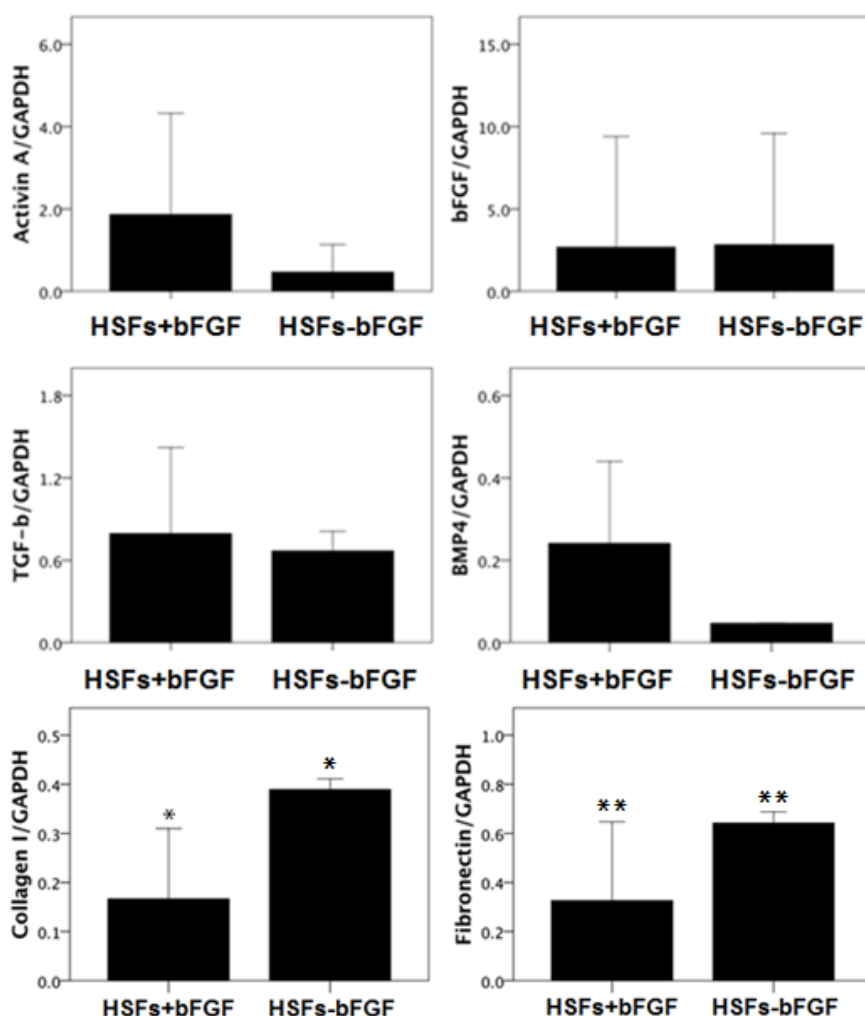
ภายหลังการเลี้ยง HSFs ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่มี และ ไม่มี bFGF เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในวันแรก ทั้ง HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี และ ไม่มี bFGF มีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกับที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ คือ เซลล์มีลักษณะเรียวยาว เป็นรูปกระสวย ในวันที่ 3-7 HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF มีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปจากวันแรก คือ เซลล์มีลักษณะเหี่ยว เล็ก และ มีช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี bFGF ไม่พบลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของ HSFs (P8) เมื่อเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ที่มีและไม่มี bFGF โดยติดตามผลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน (Scale bar=100 μ m)

4.4.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของ supportive feeder markers ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นหลังการผ่าตัดคลอด ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction

ผลการทดลองพบว่า HSFs กับ HFFs มีการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP4 ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มี bFGF มีการแสดงออกของยีน Collagen I และ Fibronectin ในระดับที่สูงกว่า ใน HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยา ที่มี bFGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.003$ และ 0.014 ตามลำดับ) (รูปที่ 27)

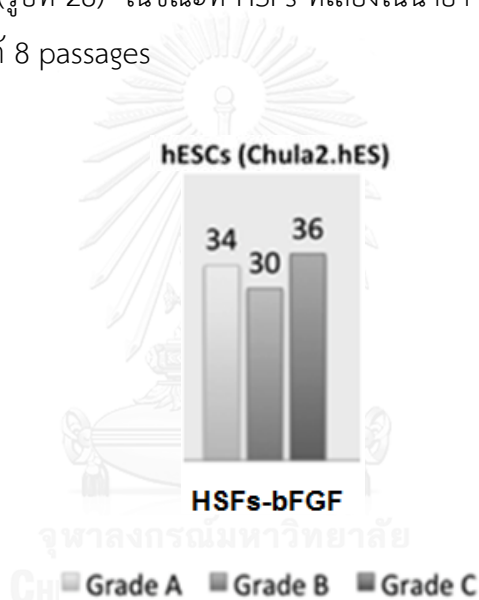


รูปที่ 27 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF, TGF- β 1, BMP4, Collagen I และ Fibronectin ระหว่างใน HSFs (P8-10) ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีและไม่มี bFGF (* $P=0.003$, ** $P=0.014$)

4.4.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็นที่ใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงโดยเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ที่ไม่เติม bFGF

4.4.3.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

หลังจากที่ทดลองใช้ HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มี bFGF เป็นเซลล์ที่เลี้ยงของ hESCs (Chula2.hES) และ hiPSCs (PFX[#]12) พบว่า HSFs สามารถสนับสนุนการเจริญของ Chula2.hES ได้ มากกว่า 10 passages และ จำแนกเกรดของโคโลนี ได้ตั้งรูป (รูปที่ 28) ในขณะที่ HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยา ที่มี bFGF สามารถสนับสนุนการเจริญของ PFX[#]12 ได้ 8 passages

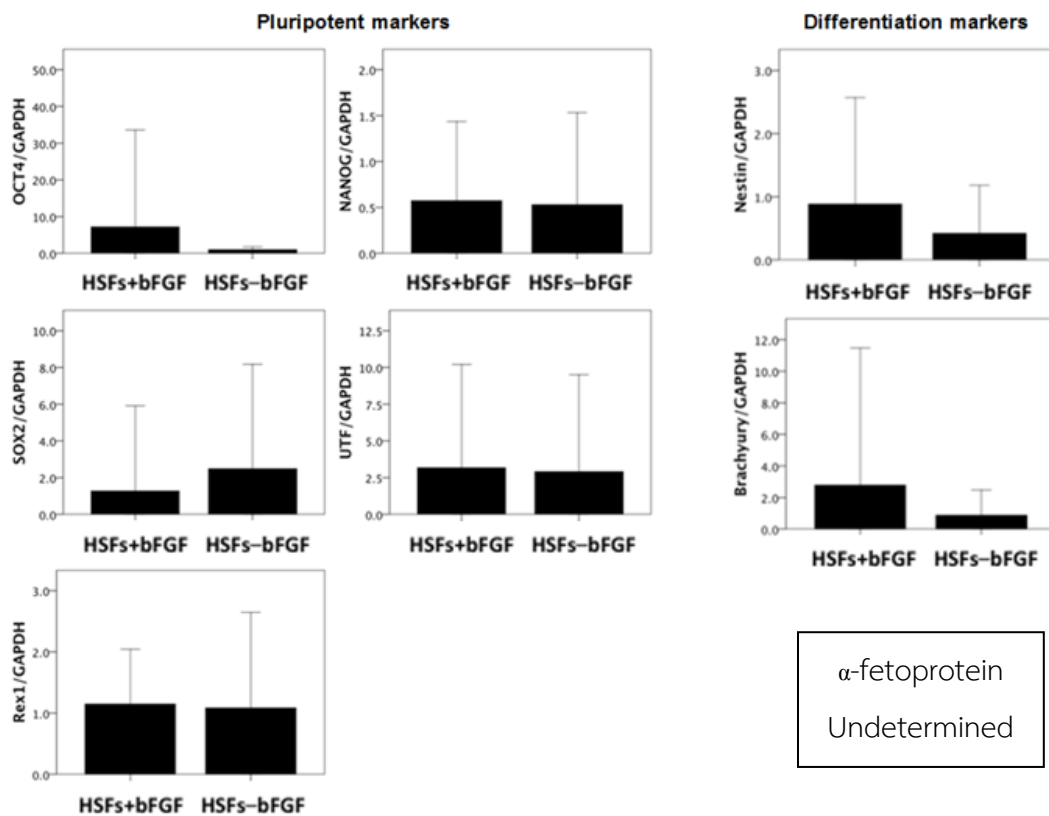


รูปที่ 28 กราฟแสดงร้อยละของโคโลนีเกรด A, B และ C ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF

4.4.3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent และ differentiation markers ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Real-time polymerase chain reaction

ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES และ PFX[#]12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่มี และ ไม่มี bFGF มีการแสดงออกของ pluripotent marker ได้แก่ ยีน Oct4, Nanog, Sox2, UTF และ Rex1 ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน และมีการแสดงออกของ differentiation marker ได้แก่ ยีน Nestin, Brachyury

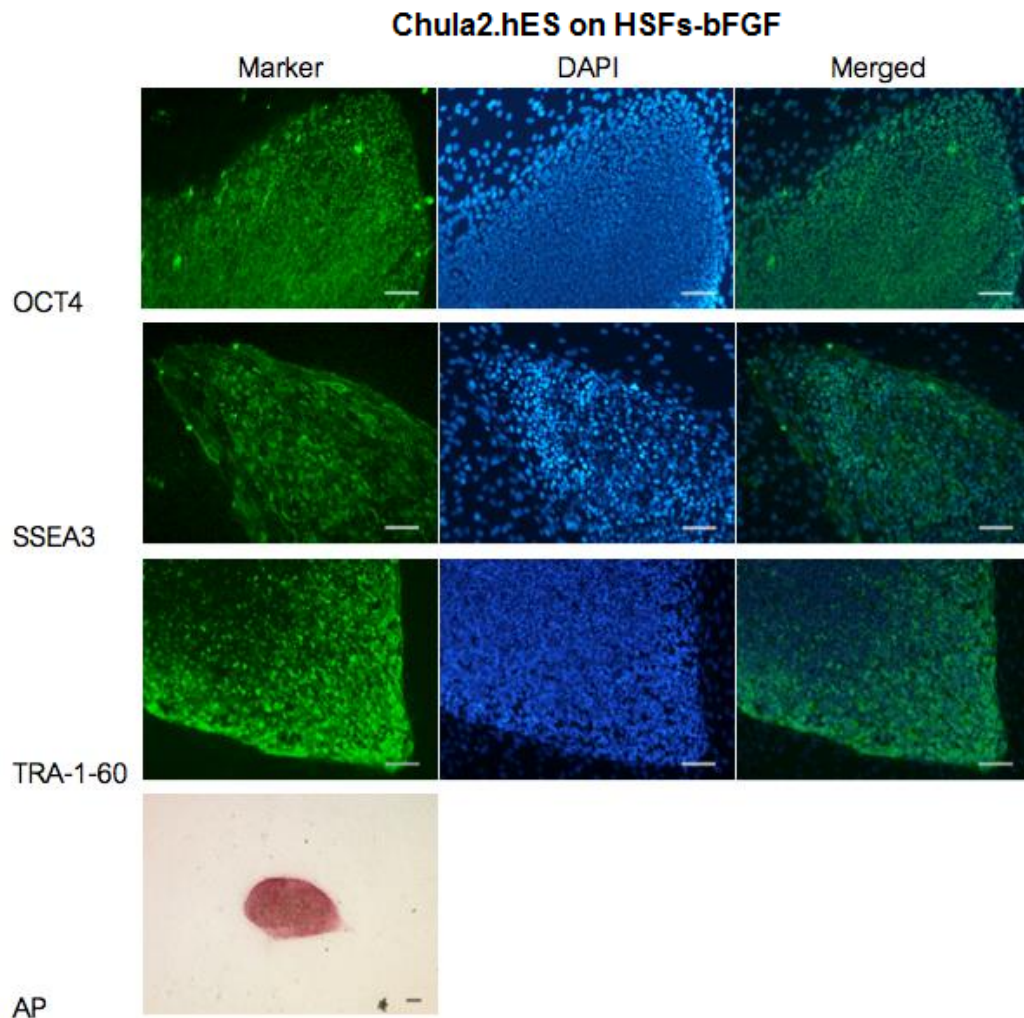
ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน และ ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน α -fetoprotein ทั้งใน Chula2.hES และ PFX[#]12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยา ที่มี และ ไม่มี bFGF (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Oct4, Sox2, UTF, Rex1, Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีและไม่มี bFGF

4.4.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน

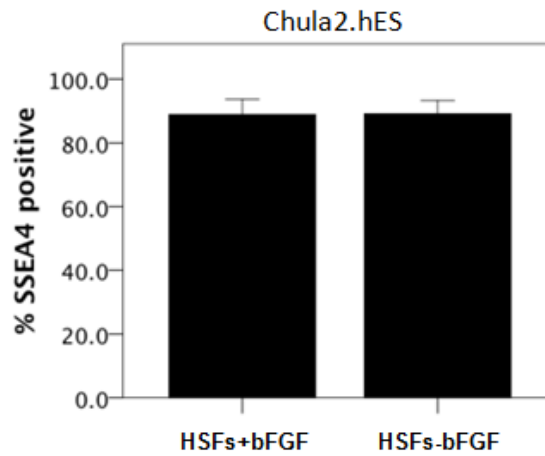
ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES และ PFX[#]12 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่มี และ ไม่มี bFGF ให้ผลบวกต่อ pluripotent markers ทั้งหมด ได้แก่ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Oct4, SSEA-3, TRA-1-60 และ alkaline phosphatase (AP) ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF (Scale bar=100 μ m)

4.4.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent marker ในเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ด้วยวิธี Flow cytometry

ผลการทดลองพบว่า ใน Chula2.hES ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มี bFGF มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $89.1 \pm 1.68\%$ ในขณะที่ Chula2.hES ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงจาก HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยา ที่มี bFGF มีเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 $88.9 \pm 1.93\%$ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 31)

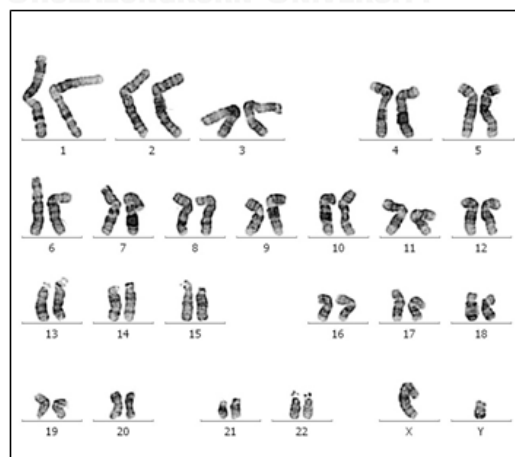


รูปที่ 31 เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ SSEA-4 ของ Chula2.hES (P15+10 – P15+20) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีและไม่มี bFGF

4.4.3.5 การตรวจสอบคาริโอไทป์ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์

ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES มีโครโมโซมที่ปกติ 46, XY (รูปที่ 32)

Chula2.hES on HSFs-bFGF
CHULALONGKORN UNIVERSITY

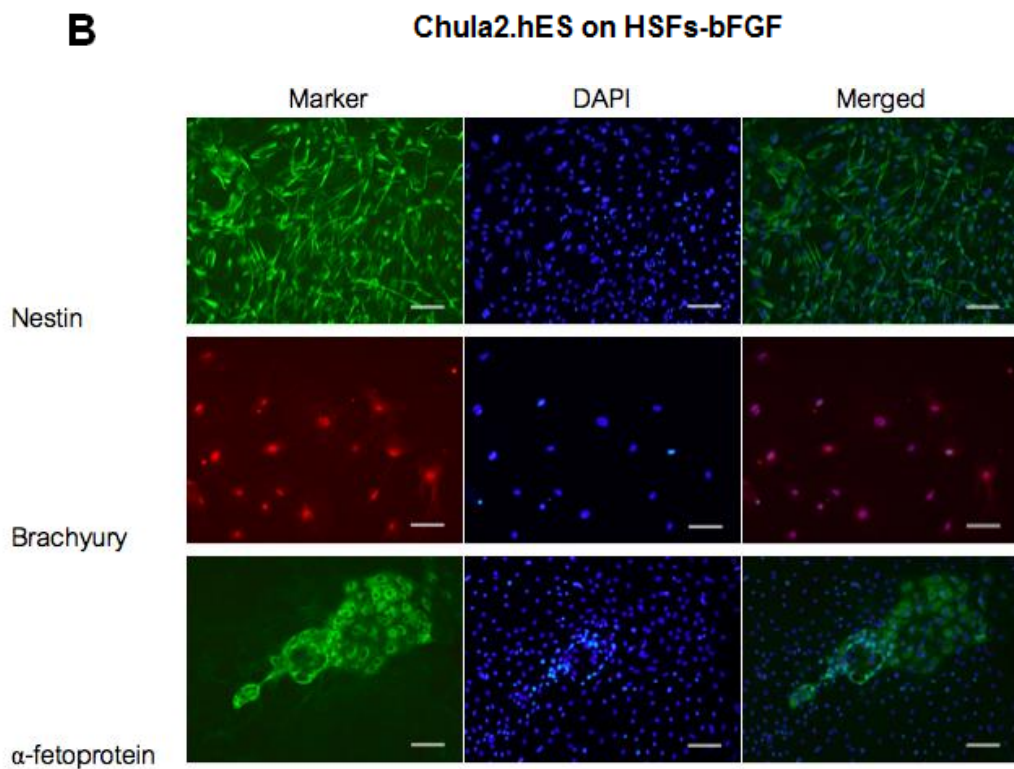
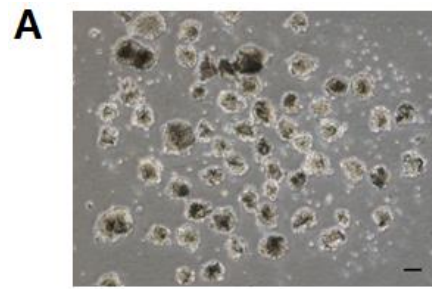


รูปที่ 32 ผลการตรวจคาริโอไทป์ของ Chula2.hES (P15+15) หลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

4.4.3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์

ภายหลังการเปลี่ยนการเลี้ยงเซลล์ให้เหมาะสมต่อการสร้าง embryoid body ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์และทำให้เกิด spontaneous differentiation ไปเป็น embryonic three germ layers ผลการทดลองพบว่า Chula2.hES ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับ HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ที่ไม่มี bFGF สามารถสร้างโครงสร้างของ embryoid body ได้ และ ให้ผลบวกต่อ embryonic three germ layer markers ได้แก่ Nestin (ectoderm), Brachyury (mesoderm) และ α -fetoprotein (endoderm) (รูปที่ 33)





รูปที่ 33 A: embryoid body B: ผลการย้อมสีทางอิมมูโนของ Nestin, Brachyury และ α -fetoprotein ใน Chula2.hES (P15+10 – P15+20) ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยงจาก HSFs (P6-14) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มี bFGF และเลี้ยงในสภาพแวดล้อมสำหรับ spontaneous differentiation (Scale bar=100 μ m)

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

การหาเซลล์ที่เลี้ยงชนิดใหม่เพื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ยังมีความจำเป็นเนื่องจากเซลล์ที่เลี้ยงชนิดเดิมที่นิยมใช้ คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็มบริโอของหนู (mouse embryonic fibroblasts) (14, 41) เป็นเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์ ทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของส่วนประกอบจากสัตว์ต่อเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ จึงไม่เหมาะสมต่อการนำเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ไปใช้ในทางคลินิก (3) นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากตัวอ่อนของหนู แล้วเซลล์ที่เลี้ยงที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของมนุษย์ หรือ มีแหล่งที่มาจากมนุษย์ เช่น mesenchymal stem cells จากน้ำคร่ำ, สายสะดือ (umbilical cord), รก (placenta) หรือเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) ก็เคยมีรายงานการนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ที่แยกได้จากแหล่งดังกล่าว มักจะมีปริมาณน้อยและมีขั้นตอนการแยกค่อนข้างซับซ้อน (10, 23, 24, 31, 42) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายองคชาต (foreskin) ของทารก ได้รับความนิยมในการใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงเนื่องจากเป็นเซลล์ที่สามารถแยกและเลี้ยงได้อย่างไม่ยุ่งยาก (9) แต่ข้อจำกัดสำคัญของการใช้เซลล์ชนิดนี้ คือ การขลิบหนังหุ้มปลายองคชาตของทารก ไม่เป็นที่ยอมรับในหลายประเทศ และไม่อนุญาตให้กระทำการดังกล่าว โดยถือเป็นความผิดทางด้านกฎหมายและทางด้านจริยธรรม หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง (43, 44) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้นักวิจัยในประเทศนั้นเข้าถึงการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดนี้ไม่ได้และอาจเสียค่าใช้จ่ายที่สูงในการจัดซื้อ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ใช้เซลล์ที่เลี้ยงที่แยกจากเนื้อเยื่อหนังหุ้มองชาตของทารก (human foreskin fibroblasts; HFFs) ซึ่งซื้อจากบริษัทผู้ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเซลล์ HFFs Catalog number 2429 ที่ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถใช้สร้างและเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ได้ (9, 45) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อและขนส่ง HFFs จากประเทศสหรัฐอเมริกา มีค่าใช้จ่ายสูง การนำไปใช้สามารถใช้ได้ถึง passage number ที่จำกัด โดยความสามารถของ HFFs ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง จะใช้ได้เพียงแค่ passage ที่ 15 แล้วความสามารถของการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง HFFs จะลดลง จึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยเห็นถึงความจำเป็นของการหาเซลล์ที่เลี้ยงชนิดใหม่ที่ไม่มีข้อจำกัดข้างต้น โดยคำนึงถึงแหล่งของเนื้อเยื่อที่หาได้ง่าย ขั้นตอนการแยกเซลล์ไม่ซับซ้อนและมีประสิทธิภาพการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่ไม่แตกต่าง หรือ ดีกว่า HFFs

จากการศึกษาพบว่า HSFs มีรูปร่าง ลักษณะทางกายภาพเป็นรูปกระสวย คล้ายคลึงกับ HFFs HSFs มีความสามารถในการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่า HFFs เมื่อเปรียบที่ passage ที่ 15 นอกจากนั้นยังพบว่า HSFs สามารถแบ่งตัวได้ต่อเนื่องไปถึง passage ที่ 20 ซึ่งความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ส่งผลต่อการนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง เนื่องจากในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำไปใช้ในทางคลินิก อาจมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดให้มีปริมาณมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์สำหรับใช้เตรียมเป็นเซลล์ที่เลี้ยง ในปริมาณที่มากตามไปด้วย อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ไม่ได้มีจุดประสงค์หลัก เพื่อเพิ่มความสามารถในการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของ HSFs ดังนั้นการศึกษาในอนาคต ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของเซลล์โดยใช้ growth factors เช่น epidermal growth factor (EGF) หรือ fibroblast growth factor (FGF) ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ น่าจะเป็นวิธีที่น่าสนใจและสามารถช่วยให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้ (46-51)

HFFs ในขณะที่ HSFs มีการแสดงออกของยีน BMP4 ในระดับที่ต่ำกว่า HFFs ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับจากการศึกษานี้ พบว่า HSFs มีการแสดงออกของยีน Activin A, bFGF และ TGF- β 1 ในระดับที่ไม่แตกต่างกับ การทดลองของ Richards และคณะ ในปี 2003 ที่พบว่า เซลล์ที่เหมาะสมต่อการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์จะมีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่สำคัญคือ Activin A, bFGF และ TGF- β 1 โดยยีนเหล่านี้จะมีการแสดงออกในระดับที่สูง และ BMP4 จะมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำ โดย BMP4 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ เกิด differentiation ระดับการแสดงออกที่สมดุลของยีนดังกล่าว จะมีส่วนสำคัญต่อการคงสภาพเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ (10, 30) โดยทั่วไปเซลล์ที่เลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ จะช่วยสร้างสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม โดยการควบคุมผ่าน TGF- β /Activin/Nodal signaling pathway เป็นสำคัญ (52) และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มี extracellular matrices ที่เหมาะสม โดยจากการศึกษา พบว่า extracellular matrices ที่มีความจำเป็นต่อการรักษาสภาพ pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดมีหลายชนิด เช่น collagen I, collagen III, collagen V, fibronectin, Hyaluronan and proteoglycans link protein I, sulfatase I เป็นต้น (53) ในการทดลองนี้ พบว่า HSFs มีการแสดงออกของยีน collagen I และ fibronectin ในระดับที่ต่ำกว่า HFFs อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง growth factors และ extracellular matrices มีความซับซ้อนมาก อาจจำเป็นต้องทำการศึกษาในเชิงลึก เช่น การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ (proteomic analysis) (54)

เมื่อทำการทดสอบความสามารถเบื้องต้น ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของ HSFs ด้วยวิธี colony-forming unit พบว่า อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยวและเจริญเป็นโคลอนีเมื่อ

เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงที่มาจาก HSFs ต่ำกว่า HFFs ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า HSFs อาจจะเป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่ไม่ดีเท่ากับ HFFs โดยเฉพาะเมื่อเลือกใช้วิธีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ด้วยวิธี enzymatic dissociation และ single cell propagation การเพิ่มความสามารถในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยวและเจริญเป็นโคโลนีนั้น สามารถเพิ่มได้โดยเติม ROCK inhibitor ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ มีแนวโน้มที่จะเกิดการตายได้ง่ายมาก เมื่อถูกแยกและเลี้ยงในสภาพเซลล์เดี่ยว ROCK inhibitor จะลดการตายของเซลล์โดยไปยับยั้ง Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase I, II ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ของเซลล์ (55) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ ไม่ได้ใช้ ROCK inhibitor ทั้งนี้เพื่อต้องการตรวจสอบคุณสมบัติของการสนับสนุนการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยวของ HSFs โดยที่ไม่มีปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้อง

ดังนั้นในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง HSFs นั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการตัดด้วยเข็ม หรือ ไปเปิดแก้ว และพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ทั้ง Chula2.hES และ PFX[#]12 ค่อยๆเริ่มปรับตัวและรักษาสภาพของ undifferentiated status เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง HSFs ได้ เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ พบว่า Chula2.hES และ PFX[#]12 มีการแสดงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ โดยพิสูจน์ได้จาก undifferentiated colonies มีการแสดงออกของ pluripotent genes, pluripotent markers และ ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะในจานเลี้ยงเซลล์ได้ ไม่แตกต่างจาก เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง HFFs และที่สำคัญคือ เมื่อเลี้ยง Chula2.hES และ PFX[#]12 ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง HSFs อย่างต่อเนื่อง ทั้ง Chula2.hES และ PFX[#]12 ยังคงมีลักษณะโครโมโซมที่ปกติ จากผลการทดลองนี้ จึงสามารถพิสูจน์ให้เห็นว่า HSFs เป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่สนับสนุนการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ สายพันธุ์ Chula2.hES และ PFX[#]12

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมติฐานว่า เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ สายพันธุ์ Chula2.hES และ PFX[#]12 สามารถเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง HSFs โดยไม่ต้องมีการเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก มีข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ji Hoon Yang และคณะในปี 2010 ที่พิสูจน์ว่าเซลล์ที่แยกจากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด มีคุณสมบัติเป็น mesenchymal stem cells โดยได้ทำการแยก HSFs และเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เติม BMP4 พบว่า เซลล์มีการแบ่งตัว มีการแสดงออกของ SSEA-4, Nestin, TuJ1 และ CD 90 ซึ่งเป็น mesenchymal marker และเปลี่ยนแปลงไปเป็น Neurogenic progenitor cells ได้ (56) นอกจากนี้ ยังมีหลายงานวิจัยที่ใช้ mesenchymal stem cells เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์ ได้โดย

ที่ไม่เติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (31-33, 57) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการใช้ HSFs เป็นเซลล์ที่เลี้ยง จะสามารถเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ได้โดยไม่ต้องเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์หรือไม่

จากผลการศึกษา ผู้วิจัยพบปัจจัยที่ส่งเสริมว่า HSFs น่าจะเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ได้โดยไม่ต้องเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เนื่องจาก **1)** HSFs มีการแสดงออกของ HCAM, Stro1 และ Thy1 ซึ่งบ่งชี้ว่า HSFs น่าจะแสดงคุณสมบัติของ mesenchymal stem cells **2)** HSFs หลัง exogenous bFGF ได้ ซึ่ง bFGF มีความสำคัญต่อระบบการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ โดย ปริมาณของ bFGF สัมพันธ์ต่อการเจริญของโคโลนี และลดการเกิด differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ (29) อีกทั้ง bFGF เป็นปัจจัยหลักต่อการควบคุมการแสดงออกของทั้ง Activin A, TGF- β และเป็น BMP4 antagonist (58, 59) และ **3)** HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม bFGF มีการสร้าง extracellular matrices ที่สำคัญต่อการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ได้แก่ Collagen I และ Fibronectin (53) ได้สูงกว่า HSFs ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เติม bFGF อีกด้วย

จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ HSFs เป็นเซลล์ที่เลี้ยงของ เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ มีความสามารถเจริญและรักษาคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์เซลล์ โดย Chula2.hES สามารถรักษาคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ ได้เป็นอย่างดี โดยไม่ต้องมี bFGF น้ำยาเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่ PFX[#]12 มีแนวโน้มการเกิด differentiation และสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ได้ง่ายกว่า ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับสภาพการสร้างและเลี้ยงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดทั้งสอง ก่อนที่จะนำเซลล์มาทำการศึกษานี้ มีความแตกต่างกัน โดย Chula2.hES เป็นเซลล์ที่ได้มาจากการสร้างและเลี้ยงโดยใช้เซลล์ที่เลี้ยง HFFs มาก่อน ดังนั้น สภาพการเลี้ยงร่วมกับ HSFs และไม่เติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ อาจจะไม่ส่งผลต่อ microenvironment ของ Chula2.hES มากเกินไป จึงทำให้เซลล์สามารถรักษาสภาพ undifferentiated stage ได้ค่อนข้างดี ในขณะที่ PFX[#]12 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากการสร้างและเลี้ยงด้วยระบบการเลี้ยงแบบไม่ใช้เซลล์ที่เลี้ยง และใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิด enriched culture medium ที่มีสัดส่วนของ growth factors และ cytokines ที่ค่อนข้างสูง ดังนั้น การเลี้ยง PFX[#]12 ร่วมกับ HSFs และไม่เติม bFGF ในน้ำยา จึงเป็นการลดระดับความเข้มข้นของ growth factor ที่มากเกินไป จนทำให้ microenvironment ในสภาพการเลี้ยงแบบนี้ไม่เหมาะสมที่ PFX[#]12 จะคงคุณสมบัติพลูริโพเทนต์ไว้ได้

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่า HSFs มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่ดี สามารถใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ สายพันธุ์ Chula2.hES และ PFX[#]12 ได้ ยิ่งไปกว่านั้นผลการทดลองยังทำให้ทราบว่า Chula2.hES สามารถเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยง HSFs ได้โดยไม่ต้องเติม

bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่ PFX#12 สามารถเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยง HSFs ได้เมื่อมีการเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ผลงานวิจัยนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยครั้งแรกที่ค้นพบว่า HSFs สามารถใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์มนุษย์ได้ การศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาความสามารถของ HSFs ในการเป็นเซลล์ที่เลี้ยง สำหรับการเลี้ยง เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ สายพันธุ์อื่นๆ หรือ ใช้สำหรับการสร้าง เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ สายพันธุ์ใหม่ๆ HSFs ยังมีความสำคัญ เพื่อรองรับการพัฒนางานวิจัย ที่เกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์มนุษย์ได้



รายการอ้างอิง

1. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2004;79(2):214-23.
2. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2007;82(3):252-64.
3. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature medicine*. 2005;11(2):228-32.
4. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2004;229(2):259-74.
5. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of reproduction*. 2004;70(3):837-45.
6. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2001;19(10):971-4.
7. Catalina P, Montes R, Ligerio G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Molecular cancer*. 2008;7:76.
8. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2004;22(1):53-4.
9. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Human reproduction*. 2003;18(7):1404-9.

10. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem cells*. 2003;21(5):546-56.
11. Pruksananonda K, Rungsiwiwut R, Numchaisrika P, Ahnonkitpanich V, Virutamasen P. Development of human embryonic stem cell derivation. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2009;92(4):443-50.
12. Verfaillie C. Pluripotent stem cells. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2009;16(2):65-9.
13. Forte G PS, Pagliari F, Nardo PD, Aoyagi T. Cardiac muscle engineering: strategies to deliver stem cells to the damaged site: InTechOpen; 2011.
14. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
15. Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Winger D, Schulz T, Noggle S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem cells*. 2003;21(5):521-6.
16. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *The New England journal of medicine*. 2004;350(13):1353-6.
17. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006;444(7118):481-5.
18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
19. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
20. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
21. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*. 2011;3(10):920-33.

22. Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Nagasaka T, et al. Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Cell transplantation*. 2008;17(1-2):27-33.
23. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Liu HW, Chiou SH, Chu TY. Human umbilical cord mesenchymal stem cells support nontumorigenic expansion of human embryonic stem cells. *Cell transplantation*. 2012;21(7):1515-27.
24. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem cells*. 2003;21(2):131-42.
25. Meng G, Liu S, Krawetz R, Chan M, Chernos J, Rancourt DE. A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture. *Stem cells and development*. 2008;17(3):413-22.
26. Yue F SS, Ichikawa H, Yoshie S, Mogi A, Masuda S, Nagai M, Yokohama T, Daihachiro T and Sasaki K. Induce differentiation of embryonic stem cells by co-culture system: InTech; 2013.
27. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem cells*. 2006;24(3):568-74.
28. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature methods*. 2005;2(3):185-90.
29. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology*. 2000;227(2):271-8.
30. Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature biotechnology*. 2002;20(12):1261-4.
31. Ma X, Li H, Xin S, Ma Y, Ouyang T. Human amniotic fluid stem cells support undifferentiated propagation and pluripotency of human embryonic stem cell

without b-FGF in a density dependent manner. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(8):4661-73.

32. Park Y, Kim JH, Lee SJ, Choi IY, Park SJ, Lee SR, et al. Human feeder cells can support the undifferentiated growth of human and mouse embryonic stem cells using their own basic fibroblast growth factors. *Stem cells and development*. 2011;20(11):1901-10.

33. Lee EJ, Kang HJ, Lee HN, Kang SK, Kim KH, Lee SW, et al. New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation; research in biological diversity*. 2012;83(1):92-100.

34. Kischer CW, Hendrix MJ. Fibronectin (FN) in hypertrophic scars and keloids. *Cell and tissue research*. 1983;231(1):29-37.

35. Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2012;26(2):141-52.

36. Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, Slaninova I, Hampl A, Dvorak P. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *The International journal of developmental biology*. 2008;52(4):353-63.

37. Ashcroft KJ, Syed F, Bayat A. Site-specific keloid fibroblasts alter the behaviour of normal skin and normal scar fibroblasts through paracrine signalling. *PloS one*. 2013;8(12):e75600.

38. Pruksananonda K, Rungsiwiwut R, Numchaisrika P, Ahnonkitpanit V, Isarasena N, Virutamasen P. Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. *BioResearch open access*. 2012;1(4):166-73.

39. Wattanapanitch M, Klincumhom N, Potirat P, Amornpisutt R, Lorthongpanich C, Y Up, et al. Dual small-molecule targeting of SMAD signaling stimulates human induced pluripotent stem cells toward neural lineages. *PloS one*. 2014;9(9):e106952.

40. Heng BC, Vinoth KJ, Liu H, Hande MP, Cao T. Low temperature tolerance of human embryonic stem cells. *International journal of medical sciences*. 2006;3(4):124-9.

41. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biology of reproduction*. 2003;69(6):2007-14.
42. Mamidi MK, Pal R, Mori NA, Arumugam G, Thrichelvam ST, Noor PJ, et al. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(5):1353-63.
43. Benatar M, Benatar D. Between prophylaxis and child abuse: the ethics of neonatal male circumcision. *The American journal of bioethics : AJOB*. 2003;3(2):35-48.
44. Morris BJ, Tobian AA. Legal threat to infant male circumcision. *JAMA pediatrics*. 2013;167(10):890-1.
45. Ellerstrom C, Strehl R, Noaksson K, Hyllner J, Semb H. Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. *Stem cells*. 2007;25(7):1690-6.
46. Hu F, Wang X, Liang G, Lv L, Zhu Y, Sun B, et al. Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells. *Cellular reprogramming*. 2013;15(3):224-32.
47. Baer PC, Schubert R, Bereiter-Hahn J, Plosser M, Geiger H. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *European journal of cell biology*. 2009;88(5):273-83.
48. Hauner H, Rohrig K, Petruschke T. Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *European journal of clinical investigation*. 1995;25(2):90-6.
49. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;359(1):108-14.

50. Wang Y, Xu C, Wang H, Liu J, Hui S, Li N, et al. Efficient derivation of human embryonic stem cell lines from discarded embryos through increases in the concentration of basic fibroblast growth factor. *Human cell*. 2012;25(1):16-23.
51. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;288(2):413-9.
52. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. 2005;132(6):1273-82.
53. Kueh J, Richards M, Ng SW, Chan WK, Bongso A. The search for factors in human feeders that support the derivation and propagation of human embryonic stem cells: preliminary studies using transcriptome profiling by serial analysis of gene expression. *Fertility and sterility*. 2006;85(6):1843-6.
54. Soteriou D, Iskender B, Byron A, Humphries JD, Borg-Bartolo S, Haddock MC, et al. Comparative proteomic analysis of supportive and unresponsive extracellular matrix substrates for human embryonic stem cell maintenance. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(26):18716-31.
55. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2007;25(6):681-6.
56. Yang JH, Shim SW, Lee BY, Lee HT. Skin-derived stem cells in human scar tissues: a novel isolation and proliferation technique and their differentiation potential to neurogenic progenitor cells. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2010;16(4):619-29.
57. Park Y, Choi IY, Lee SJ, Lee SR, Sung HJ, Kim JH, et al. Undifferentiated propagation of the human embryonic stem cell lines, H1 and HSF6, on human placenta-derived feeder cells without basic fibroblast growth factor supplementation. *Stem cells and development*. 2010;19(11):1713-22.

58. Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem cells*. 2007;25(2):455-64.
59. Yu P, Pan G, Yu J, Thomson JA. FGF2 sustains NANOG and switches the outcome of BMP4-induced human embryonic stem cell differentiation. *Cell stem cell*. 2011;8(3):326-34.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาววิภาวี ปวรอาจารย์

วัน-เดือน-ปีเกิด 19 ธันวาคม 2533 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาเซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552-2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

29-31 ตุลาคม 2558 ตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องการประชุมและนำเสนอ งานวิจัยรูปแบบ poster-presentation ในหัวข้อ “คุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากแผลเป็น หลังการผ่าตัดคลอดต่อการใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ของมนุษย์” โดย วิภาวี ปวรอาจารย์, รัฐจักร รังสิวิวัฒน์ และ กำธร พฤษานานนท์ ณ งานประชุมวิชาการ เสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 36 จังหวัดเชียงใหม่

5-7 พฤศจิกายน 2557 นำเสนองานวิจัยรูปแบบ poster-presentation ในหัวข้อ “Study of human cesarean scar fibroblasts as a feeder cells for culturing the human pluripotent stem cells: effect of basic fibroblast growth factor supplementation” โดย วิภาวี ปวรอาจารย์, รัฐจักร รังสิวิวัฒน์, ปราณี นำชัยศรีคำ, ประมวล วีรุตมเสน และ กำธร พฤษานานนท์ ณ Global Controls in Stem Cells Symposium ประเทศสิงคโปร์

21-23 ธันวาคม 2556 นำเสนองานวิจัยรูปแบบ poster-presentation ในหัวข้อ “สัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี” โดย วิภาวี ปวรอาจารย์, กรภัทร แก้วเนิน และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล ณ งานประชุมวิชาการชมรม คณะปฏิบัติการวิทยาการอพ.สธ. ครั้งที่ 6 “ทรัพยากรไทย: นำสิ่งดีงามสู่ทั่วโลก” จังหวัดกาญจนบุรี