อธิป หลิมเจริญ : ผลของ 8 Bromo-cyclic GMP ต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์เป็นเซลล์ระบบประสาท (EFFECT OF 8 BROMO-CYCLIC GMP ON NEURAL TRANSDIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE STEM CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 121 หน้า.

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเป็นหนึ่งในวิธีการที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท แต่เนื่องจากข้อจำกัดของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทมาใช้ในการรักษา เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อไขมันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพ การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันเป็นวิธีการที่ง่าย มีเป็นจำนวนมากในร่างกาย และยังสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้เป็นระยะเวลาหลายเดือนอีกด้วย นอกจากนี้แล้วเซลล์เหล่านี้ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบประสาทได้เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม ดังนั้นการหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำเซลล์เหล่านี้ให้กลายไปเป็นเซลล์ระบบประสาทจึงเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางการแพทย์และอาจนำไปสู่การนำไปใช้ในทางคลินิกในอนาคต

วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือ เพื่อหาผลของ 8 Bromo-cyclic GMP (8Br-cGMP) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ระบบประสาท ผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ เซลล์เหล่านั้นถูกนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน และนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ด้วยวิธีการย้อมโปรตีนที่จับบนผิวเซลล์และการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ที่คัดแยกได้มีการแสดงออกโปรตีน CD73 CD90 CD105 และ vimentin แต่ไม่แสดงออกโปรตีน CD34 และ CD45 นอกจากนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกมาในการวิจัยครั้งนี้มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ หลังจากนั้น จึงทำการตรวจสอบฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 8Br-cGMP ที่ความเข้มข้น 0μM 10μM และ100μM เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ผลการศึกษาพบว่าหนึ่งสัปดาห์หลังทำการเหนี่ยวนำ ประชากรเซลล์ส่วนใหญ่ที่เติม 8Br-cGMP ความเข้มข้น 10μM มีรูปร่างเรียว ยาว มีขนาดเล็กลง และพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทที่มี bipolar และ multipolar ซึ่งมีแขนงคล้ายแอกซอนยื่นออกมาจากตัวเซลล์อีกด้วย จำนวนสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออก Nestin Sox2 TUJ1 และ NF-L หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10μM 8Br-cGMP สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์

ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10μM 8Br-cGMP มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน (*MASH1 GAP43 TUJ1 NF-L* และ *MAP2*) สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ในการศึกษา neurite outgrowth พบว่าเซลล์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10μM 8Br-cGMP มีสัดส่วนประชากรเซลล์ที่แสดงออกของโปรตีน TUJ1 ร่วมกับมี neutire สูงที่สุดอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (73.10%±7.40%, $p<0.001$) และ มีการแสดงออกของยีน *GAP43* ที่สูงขึ้นภายในเซลล์เหล่านั้น ซึ่งมีบทบาทในการพัฒนาของ neurite และการสร้าง synapse ของเซลล์ประสาท ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์จากการเหนี่ยวนำด้วย 10μM 8Br-cGMP ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและค้ำจุนเต็มวัย พบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถกลายไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและค้ำจุนเต็มวัยได้ ซึ่งยืนยันด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-qPCR และการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunocytochemistry จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 10μM 8Br-cGMP สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ประสาทนิวรอน และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยภายใต้ภาวะที่เหมาะสมได้อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ATHIP LIMCHAROEN : EFFECT OF 8 BROMO-CYCLIC GMP ON NEURAL TRANSDIFFERENTIATION OF HUMAN ADIPOSE STEM CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 121 PP.

ADIPOSE STEM CELLS/NEURAL STEM CELLS/NEURAL DIFFERENTIATION/8 BROMO-CYCLIC GMP/NO-CGMP SINGLAING PATHWAY

Stem cell transplantation is a promising tool in neurodegenerative diseases treatment. Due to limitations to utilize human embryonic stem cells (ESCs) and neural stem cells (NSCs), the mesenchymal stem cells (MSCs), especially from adipose tissue can serve as a potential alternative. They are easily accessible, abundantly available throughout the body and can be cultured for several months *in vitro*. Furthermore, they are also able to differentiate toward cells in neuroectodermal lineage under appropriate conditions. Therefore, finding the most efficient way to differentiate these cells would be beneficial for medical research and will be used in clinical applications.

The aim of this study was to find the effect of 8 Bromo-cyclic GMP (8Br-cGMP) on neural differentiation of human adipose stem cells (hASCs). The results found that after hASCs were isolated from the adipose tissue, they were expanded and characterized by immunophenotypical and multipotency to be several cell types. The isolated hASCs were positive for CD73, CD90, CD105 and Vimentin and were negative for CD34 and CD45. Additionally, hASCs could differentiate toward

osteocytes, chondrocytes and adipocytes implying that hASCs isolated from adipose tissue displayed the mesenchymal stem cell properties. To optimize 8Br-cGMP concentration, hASCs under different 8Br-cGMP concentration (0μM, 10μM, 100μM) were investigated using phenotypical and gene expression analyses. The results showed that after one-week induction, the majority of neural induced hASCs (NI-hASCs) under 10μM 8Br-cGMP condition appears as smaller, elongated bi- or multipolar cells with primary and secondary processes similar to axon. The proportion of positive cells for Nestin, Sox2, TUJ1 and NF-L was significantly ($p<0.001$) higher than other conditions. Gene expression analysis revealed that NI-hASCs under 10μM 8Br-cGMP condition had significant higher level of genes which is specific to cells differentiated to be neuron cells (*MASH1*, *GAP43*, *TUJ1*, *NF-L*, *MAP2*). NI-hASCs under 10μM 8Br-cGMP condition displayed significant highest of TUJ1 protein population with neurite (73.10%±7.40%, $p<0.001$) and significant higher expression level of *GAP43* gene, which is involved in neurite outgrowth and synaptic formation. Upon further differentiation into mature neuron and glial cells, NI-hASCs from 10μM 8Br-cGMP condition could differentiate toward neuronal and glia cells as confirmed by RT-qPCR and immunocytochemistry results. This study concluded that hASCs after induction with 10μM 8Br-cGMP could be differentiated to be neuronal progenitor cells and also differentiated to be neuronal and glial cells under suitable conditions.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2014

Student's Signature Athip Lin

Advisor's Signature