พัชรี ปราศจาก : การพัฒนาวิธีการใหม่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคม์มอลจากวาร์ตันเจลลี่และการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ตับ (DEVELOPMENT OF NEW METHODS FOR WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS EXPANSION AND HEPATOCYTE DIFFERENTIATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทนพญ. ดร.วิไลรัตน์ ลี้อนันต์ศักดิ์ศิริ, 168 หน้า.

ปัจจุบันนี้เซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคม์มอลของมนุษย์ที่แยกได้จากวาร์ตันเจลลี่ (WJ-MSCs) จัดว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกเนื่องจากความสามารถอันหลากหลายของเซลล์ ได้แก่ ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ ศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะได้หลายชนิด คุณสมบัติในการปรับระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งง่ายต่อการเก็บเซลล์จากแหล่งที่ไม่ติดปัญหาทางด้านจริยธรรม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวน WJ-MSCs และการพัฒนา WJ-MSCs ให้เป็นเซลล์ตับ การศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 ชนิดดังนี้ ชนิดที่ 1 Dulbecco's modified Eagle's medium with 1.0 g/L glucose (DMEM-LG) + 10% FBS (ออกซิเจน 20% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ชนิดที่ 2 DMEM-LG + 10% FBS (ออกซิเจน 5% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ชนิดที่ 3 Embryonic stem cells conditioned medium (ESCM) และชนิดที่ 4 ESCM + 10 ng/mL EGF โดยชนิดที่ 3 และ 4 เลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน 5% และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 1 เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยมากและแก่เร็ว ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 2 3 และ 4 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีมากอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถเพิ่มได้ 113.77 $\pm$ 7.89 204.66 $\pm$ 10.39 และ 424.88 $\pm$ 14.62 เท่า ในวันที่ 12 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สภาวะปริมาณออกซิเจนต่ำส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าสภาวะที่มีออกซิเจนปกติ และการเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 4 ให้ผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดที่ 3 และ 4 ใช้เวลาในการแบ่งตัวโดยเฉลี่ยเร็วกว่าที่ถูกเลี้ยงด้วยชนิดที่ 2 ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM ทั้งที่มีหรือไม่มี EGF เป็นส่วนประกอบมีศักยภาพในการเพิ่มจำนวน WJ-MSCs ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไป (DMEM-LG + 10% FBS) สำหรับการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์พบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดที่ 2 3 และ 4 สามารถรักษาคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคม์มอลได้เป็นอย่างดีทั้งในด้านของรูปร่างเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ (CD_{29}^{+} CD_{44}^{+} CD_{90}^{+} CD_{34}^{-} CD_{45}^{-}) ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะ (เซลล์กระดูกแข็ง เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน) และการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด อย่างไรก็

ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ 3 และ 4 สามารถรักษาระดับการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดคือ *Oct-4* และ *Nanog* ได้ดีกว่าชนิดที่ 2 นอกจากนี้ WJ-MSCs ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดที่ 2 3 และ 4 มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับหรือ hepatocyte-like cells ได้อีก ซึ่งพบหลักฐานจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ รวมทั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ตับ ความสามารถในการทำหน้าที่ของเซลล์ตับ เช่น การเก็บสะสมไกลโคเจน การนำโลว์เดนซิตี้ไลโปโปรตีนเข้าเซลล์ การหลั่งอัลบูมินและการสร้างยูเรีย เป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์ตับที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดที่ 3 และ 4 มีความสามารถในการทำหน้าที่ของเซลล์ตับได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารชนิดที่ 2 จากผลการทดลองทั้งหมดนี้บ่งชี้ได้ว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ ESCM ทั้งที่มีหรือไม่มี EGF เป็นส่วนประกอบไม่เพียงแต่มีคุณประโยชน์ในการใช้เลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน WJ-MSCs ได้เป็นอย่างดี แต่ยังช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับได้อีกด้วย นอกจากนี้งานนี้ได้ทำการศึกษาผลของการใช้สารสกัดเอทานอลจากใบของ *Gynura procumbens* หรือแป๊ะตำปึงต่อความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับของ WJ-MSCs ผลการทดลองพบว่า สารสกัดนี้ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดนี้ร่วมกับอาหารที่ใช้เหนี่ยวนำในช่วงแรกของการเหนี่ยวนำ โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นแง่มุมใหม่อย่างน้อย 3 ข้อดังนี้ 1) ESCM เป็นแหล่งรวมของสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนของ WJ-MSCs โดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งจำเป็นต่อการนำไปใช้ทางคลินิก 2) WJ-MSCs เหมาะที่จะเป็นทางเลือกใหม่ในการนำมาเลี้ยงให้เป็นเซลล์ตับหรือ hepatocyte-like cells เพื่อนำไปประยุกต์ใช้รักษาโรคตับในอนาคต 3) สารสกัดจากใบของ *G. procumbens* ช่วยส่งเสริมให้ WJ-MSCs มีความสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตับได้ดียิ่งขึ้น

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา Patcharm
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

PATCHAREE PRASAJAK : DEVELOPMENT OF NEW METHODS FOR WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS EXPANSION AND HEPATOCYTE DIFFERENTIATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WILAIRAT LEEANANSAKSIRI, Ph.D. 168 PP.

WHARTON'S JELLY-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS /HEPATOCYTE-LIKE CELLS/*GYNURA PROCUMBENS*/LIVER DISEASES/EMBRYONIC STEM CELLS CONDITIONED MEDIUM

At present, WJ-MSCs are considered as promising tool for clinical application based on their several advantages. These include extensive *in vitro* expansion, multi-lineages differentiation potential, immunomodulatory properties including easy accessibility with little or no ethical concern. This study aimed to investigate appropriate culture conditions for *in vitro* expansion of WJ-MSCs including development of hepatic lineage differentiation in WJ-MSCs. Here, we cultured the cells in various conditions as followed, C1 (Dulbecco's modified Eagle's medium with 1.0 g/L glucose (DMEM-LG) + 10% FBS under 20% O_2 and 5% CO_2), C2 (DMEM-LG + 10% FBS under 5% O_2 and 5% CO_2), C3 (Embryonic stem cells conditioned medium (ESCM)), and C4 (ESCM + 10 ng/mL EGF). Cells in C3 and C4 were cultured under 5% O_2 and 5% CO_2. Our results revealed that cells in C1 had low proliferation and fast senescense. On the contrary, cells cultured in C2, C3, and C4 yielded significant proliferations as 113.77 ± 7.89, 204.66 ± 10.39, and 424.88 ± 14.62 folds at day 12, respectively. These findings indicate that C4 is the best culture condition and hypoxic condition is more suitable for *in vitro* WJ-MSC expansion than normoxic condition. Furthermore, we observed that the expanded cells from C3 and C4 had faster mean population doubling time (PDT) than that from C2. These results demonstrate that ESCM with or without additional EGF provided greater potential of WJ-MSCs expansion than conventional medium

(DMEM-LG + 10% FBS). The expanded cells from C2-4 could preserve common characteristics of MSCs including cells morphology, cell surface marker expressions (CD_{29}^{+}, CD_{44}^{+}, CD_{90}^{+}, CD_{34}^{-}, CD_{45}^{-}), differentiation potential (osteoblasts, chondroblasts, adipocytes), and stemness marker expressions. However, it was remarkable that the expanded cells from C3 and C4 could maintain the expression of stemness gene markers, *Oct-4* and *Nanog*, more than that from C2. Moreover, the expanded cells from C2-4 had ability to differentiate into hepatic lineage or hepatocyte-like cells (MSCDHC) which had evidenced by morphological changing including hepatic-specific gene and protein expressions. The MSCDHC cells contain hepatic functions, such as, glycogen storage, LDL uptake, albumin secretion, and urea production. Interestingly, capacity of hepatocyte differentiation of cells from C3 and C4 is higher than that from C2. Taken together, ESCM with or without additional EGF is not only appropriation for *in vitro* WJ-MSCs expansion but also promoting WJ-MSCs differentiation into hepatic lineage. Additionally, this study revealed that ethanolic leaves extract of *Gynura procumbens* or paetumpung could accelerate MSCDHC production. This study, thus, opens a new insight at least three points. Firstly, ESCM serves as a rich source of several factors required for supportive WJ-MSCs expansion, especially in a short period of time which is crucial for clinical use. Secondly, WJ-MSCs can serve as an alternative source of hepatocyte-like cells generation which can be applied for treatment of liver diseases in the future. Thirdly, *G. procumbens* leaves extract provides a benefit in supportive hepatogenic differentiation capacity of WJ-MSCs.

School of Microbiology

Academic Year 2012

Student's Signature Patchara

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature Chavaboon Uthaipibull