การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือรก

นาย ฐากูร ฐิติเศรษฐ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENE EXPRESSION OF OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION IN DEMINERALIZED BONE MATRIX-INDUCED HUMAN UMBILICAL CORD STEM CELLS

Mr. Dhakoon Dhitiseith

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือรก
โดย	นายฐากูร ฐิติเศรษฐ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร)

.... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฐากูร ฐิติเศรษฐ์ : การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือรก. (GENE EXPRESSION OF OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION IN DEMINERALIZED BONE MATRIX-INDUCED HUMAN UMBILICAL CORD STEM CELLS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.นพ.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก 128 หน้า.

Mesenchymal stem cells (MSCs) เป็นเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน เซลล์เอ็น และเซลล์กล้ามเนื้อ สามารถพบได้ในรก น้ำคร่ำ เส้นเลือดและเลือดจากสายสะดือรก รวมถึงเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งเต็มไปด้วยแหล่งของ mesenchymal cells ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง (self-renewal capacity) และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix (DBM) มีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในทางออร์โธปิดิกส์ ทางทันตกรรม รวมถึงการประยุกต์ทางศัลยกรรมใบหน้าและขากรรไกร อีกทั้งยังมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเป็นชีววัสดุเพื่อส่งเสริมการสร้างกระดูกใหม่ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะของ MSCs ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ตรวจสอบ biological activity ของ DBM ในเซลล์ไลน์ชนิดนี้ รวมถึงศึกษาความสามารถของ MSCs จาก Wharton's jelly cells ในการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก โดยใช้วิธี alkaline phosphatase assay ผลการวิจัยพบว่า Wharton's jelly derived cells สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไลน์ของกระดูกได้ หลังจากได้รับ DBM และยังได้ศึกษา in vitro functional differentiation ของ human MSCs จาก Wharton's jelly ข้อมูลแสดงให้เห็นว่า Wharton's jelly derived cells สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไลน์ของไขมัน กระดูกอ่อน และกระดูกได้ การศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วันโดยใช้เทคนิค cDNA array และ RT-PCR analyses พบว่ามี 2 ยีนที่ up-regulation คือยีน Runx2 และยีน SMAD2 ในขณะที่มี 1 ยีนที่ down-regulation คือยีน SMAD7 สรุปได้ว่าเซลล์ MSCs จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรกมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกระดูกเมื่อได้รับ DBM นอกจากนี้ Wharton's jelly จากสายสะดือรกยังเป็นแหล่งใหม่สำหรับเซลล์ MSCs ซึ่งหาได้ง่าย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต ฐากูร ฐิติเศรษฐ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

4874723130 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY
KEY WORD: cDNA array / demineralized bone matrix (DBM) / gene expression / mesenchymal stem cells / osteoblastic differentiation

DHAKOON DHITISEITH : GENE EXPRESSION OF OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION IN DEMINERALIZED BONE MATRIX-INDUCED HUMAN UMBILICAL CORD STEM CELLS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SITTISAK HONSAWEK, M.D., Ph.D, 128 pp.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotential cells capable of differentiating into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, tenocytes, and myoblasts that can be found in the placenta, amniotic fluid, umbilical vein, cord blood and also the Wharton's jelly (umbilical cord matrix). Wharton's jelly contains stem cells that are a rich source of primitive multipotent mesenchymal cells that possess self-renewal capacity and have the ability to differentiate into many cell types. Demineralized bone matrix (DBM) has been extensively utilized in orthopaedic, periodontal, and maxillofacial applications and widely investigated as a biomaterial to promote new bone formation. The objectives of this study were to isolate and characterize MSCs derived from Wharton's jelly and examine the biological activity of DBM in this cell line. We also determine ability of MSCs from Wharton's jelly cells to undergo osteoblastic differentiation using alkaline phosphatase assay. The results showed that Wharton's jelly derived cells could differentiate along an osteogenic lineage after treatment of DBM. We also investigated in vitro functional differentiation of human MSCs from Wharton's jelly. The data revealed that Wharton's jelly derived cells could differentiated into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineage. Gene expression of MSCs treated with DBM for 7 days was analyzed by using cDNA array and RT-PCR analyses. We found that expression of Runx2 and SMAD2 was up-regulated whereas SMAD7 expression was down-regulated as confirmed by RT-PCR. We concluded that MSCs from Wharton's jelly of human umbilical cord can express osteogenesis gene in the treatment of DBM. Furthermore Wharton's jelly from umbilical cord is a new source for MSCs that are readily available and can be applied for bone tissue engineering.

Department of Biochemistry	Student's signature ......ธากูร ฐิติเศรษฐ์......
Field of study Medical Biochemistry	Advisor's signature ....
Academic year 2006	

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2549

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทและฝึกสอนข้าพเจ้าในการทำวิจัย อีกทั้งกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ มากมาย และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พูนลาภ ชีพสุนทร และอาจารย์ ดร. ชาญชัย บุญหล้า กรรมการวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วรพงศ์ ภู่พงศ์ ภาควิชาสูตินารีเวชศาสตร์ ที่ให้ความกรุณาในการเก็บตัวอย่างสายสะดือรก จนทำให้งานวิจัยในครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และประสบการณ์ชีวิตมากมายแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณระพีพร แม้นนนทรัตน์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์วิจัย และขอขอบคุณคุณปรีชา เรืองเวชวรชัย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และขอบคุณเพื่อนๆ ในรุ่นทุกคนในสาขาชีวเคมีทางการแพทย์ที่ร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่างๆ ในการเรียน และเป็นกำลังใจให้กันจนสามารถสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้โอกาสและสนับสนุนข้าพเจ้าในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท อีกทั้งให้ความรักและกำลังใจจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย) ....ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ) ....จ
กิตติกรรมประกาศ..ฉ
สารบัญ...ช
สารบัญตาราง.. ฌ
สารบัญภาพ.. ญ
คำย่อ..ฎ
บทที่ 1 บทนำ..1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา...1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย...5
- ขอบเขตของการวิจัย...6
- ข้อตกลงเบื้องต้น...6
- ข้อจำกัดของการวิจัย...6
- คำสำคัญ...7
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย...7
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..8
- วิธีดำเนินการวิจัย...9
- ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..10
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...11
- กระดูก และองค์ประกอบที่เกี่ยวข้อง..11
- การแสดงออกของยีน...16
- กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก..19
- เซลล์ต้นกำเนิด...26
- DNA Microarray..28
- ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส..31
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..34

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....36

- ประชากร.....36
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....36
- วัสดุอุปกรณ์.....37
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....38
- การเก็บรวบรวมข้อมูล.....39
- วิธีการดำเนินการวิจัย.....40
- การวิเคราะห์ข้อมูล.....60

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....61

- ผลการวิเคราะห์.....61
- ผลการเปรียบเทียบ.....74

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....81

- สรุปผลการวิจัย.....81
- อภิปรายผลการวิจัย.....85
- ข้อเสนอแนะ.....91

รายการอ้างอิง.....92

ภาคผนวก.....97

ภาคผนวก ก.....98

ภาคผนวก ข.....99

ภาคผนวก ค.....102

ภาคผนวก ง.....105

ภาคผนวก จ.....107

ภาคผนวก ฉ.....109

ภาคผนวก ช.....112

ภาคผนวก ซ.....122

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....128

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้าที่

1 แสดงเทคนิควิธีที่ใช้ในการทดสอบ osteoblastic markers ในเซลล์ osteoblasts…..........25

2 แสดงชนิดของ markers และการแสดงออกของยีน specific antigens, cytokine receptors, adhesion molecules, production of cytokines และ matrix molecules ของ bone marrow derived MSCs...27

3 แสดงส่วนประกอบของ differentiated supplement ต่างๆ...44

4 แสดง antibody ที่ใช้ในการตรวจ cell differentiation ชนิดต่างๆ..................................44

5 แสดงการเตรียม basal medium ชนิดต่างๆ……………………………………………44

6 แสดงชื่อยีน ลำดับเบส ขนาดของ product และ Tm ของ primer……………………….59

7 แสดง Thermal cycler condition………………………………………………………...60

8 แสดงการเปรียบเทียบค่า intensity ratio (area intensity/mm^2) ของยีนจากเซลล์ MSCs ที่แยกได้จากสายสะดือรก เมื่อได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธีเทคนิค cDNA array ของ ทำการวัดค่าด้วยโปรแกรม Quantity one แบ่งเป็นกลุ่มที่ up-regulation และกลุ่ม down-regulation (เรียงค่าจากมากไปหาน้อย).......................76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้าที่

1 แสดงลำดับการซ่อมแซมกระดูกหัก (bone healing)......................................12

2 แสดงแสดงแผนผังโครงสร้างของกระดูก...14

3 แสดงส่วนประกอบของกระดูกยาว...15

4 แสดงภาพรวมการแสดงออกของยีน...16

5 แสดงการแสดงออกของยีนเป็นโปรตีนที่จำเพาะ...16

6 แสดงการแสดงออกของยีนใน eukaryotic cell..17

7 แสดงขั้นตอนการแสดงออกของยีนจาก DNA จนกระทั่งได้เป็นโปรตีน.................18

8 แสดงขบวนการเปลี่ยนแปลงของ mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ตามลักษณะการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน (differentiated phenotype)....20

9 แสดงวิถีการเปลี่ยนแปลง osteoprogenitor differentiation จากเซลล์ mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ osteoblast และ เซลล์ osteocyte ตามลำดับ......21

10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ proliferation และ differentiation ใน osteoblast culture model...23

11 แสดงการ hybridization ของกรดนิวคลิอิก (DNA หรือ RNA)..........................29

12 แสดงหลักการเพิ่ม DNA สายคู่อย่างจำเพาะโดยวิธี PCR...............................32

13 แสดงขั้นตอนการทำ Demineralized Bone Matrix......................................42

14 แสดงส่วนประกอบของ Hemocytometer...43

15 แสดงภาพขยายของช่องซึ่งใช้ในการนับเซลล์ของ hemocytometer..................43

16 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบ In vitro functional mesenchymal stem cell identification โดยการชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes เซลล์ osteocytes และเซลล์ chondrocytes...48

17 แสดงวิธีการ extract total RNA จากเซลล์..52

18 แสดงขั้นตอนการ extract total RNA จากเซลล์..53

19 แสดงด้านทั้งสองของ GEArray® Q Series membrane.................................56

20 แสดงขั้นตอนกระบวนการศึกษาการแสดงออกของยีนใน GEArray Q and S Series...58

21 แสดงปริมาณของแคลเซียมในผงกระดูกที่ลดลงตามเวลาเมื่ออยู่ใน 0.5 N HCl กับปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่เมื่อเทียบกับตอนต้น...62

ภาพที่		หน้าที่
22	แสดง DBM ที่อยู่ใน 0.5 N HCl เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	62
23	แสดง Wharton's jelly derived cells ที่ได้จากการทำ primary culture (x 10)	64
24	แสดงผลการทดสอบ in vitro functional mesenchymal stem cell identification จากเซลล์ Wharton's jelly derived cells ในวันที่ 10 (10 X)	66
25	แสดงผลการทดสอบ in vitro functional mesenchymal stem cell identification จากเซลล์ Wharton's jelly derived cells ในวันที่ 20 (10 X)	69
26	แสดงการศึกษา morphology study ของเซลล์ MSCs ที่ได้จาก Wharton's jelly tissue (x 10) หลังทดสอบด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน	70
27	แสดงการศึกษา alkaline phosphatase staining assay ของเซลล์ MSCs ที่ได้จาก Wharton's jelly tissue (x 10) หลังทดสอบด้วย DBM เป็นเวลา 7วัน	70
28	แสดงผลการทดสอบ Trypan blue proliferation assay ของเซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM ณ วันที่ 3, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ	71
29	แสดงการเปรียบเทียบระดับ alkaline phosphatase activity ในหน่วย nmol/min/μg proteinของเซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM ณ วันที่ 3, 5, 7 และ 10	73
30	แสดง total RNA ที่ extract ได้จากเซลล์ MSCs มาทำ formaldehyde gel electrophoresis เพื่อดูปริมาณและคุณภาพ ก่อนนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA probe และทำปฏิกิริยา RT-PCR ในขั้นต่อไป	73
31	แสดงการเปรียบเทียบ array membrane ที่ได้จากการทำ cDNA array	74
32	แสดงการเปรียบเทียบ grid ใน human osteogenesis cDNA array	75
33	แสดงผลการ run agarose gel electrophoresis ของ PCR product จากการทำ RT-PCR ของ total RNA ที่ได้จากเซลล์ MSCs	78
34	แสดงการเปรียบเทียบ intensity ratio ของ agarose gel electrophoresis จากการทำ RT-PCR ของเซลล์ MSCsในกลุ่มยีนเดียวกัน	80
35	สรุปผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย	84
36	แสดง Runx-2 เป็น transcription gene สำหรับยีน osteocalcin	88
37	แสดงวิถี TGF-β signaling pathway	89

คำย่อ (List of Abbreviation)

คำย่อ	ความหมาย
ALP	Alkaline phosphatase
BCA	Bicinchoninic acid
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Base pairs
cm	Centimeter
^{o}C	Degree Celsius
Cbfa1	Core binding factor alpha 1
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DBM	Demineralized bone matrix
ddH2O	Deionized distilled water
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	Et. Alii (latin), and others
EtOH	Ethanol
FGF	fibroblast-derived growth factor
g	Gram (s)
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
HCl	Hydrochloric acid
IGF	Insulin-like growth factor
kb	Kilobase
kg	Kilogram
L	Liter
M	Molar

คำย่อ	ความหมาย
μl	Microliter (10^{-6} liter)
MEM	Modified Essential Medium
mg	Miligram
min	Minute
ml	Mililiter (10^{-3} litre)
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mol	Mole
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymal stem cell
MW	Molecular weight
N	Normal
NaOH	Sodium hydroxide
ng	Nanogram (10^{-9} gram)
nm	Nanometer
OD	Optical density
OPN	Osteopontin
OCN	Osteocalcin
PAS	Periodic acid Schiff method
PBS	Phosphate buffer saline
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
PDGF	platelet-derived growth factor
pNP	Para-nitrophenol
pNPP	Para-nitrophenyl phosphate
pmol	Picomole
PTH	Parathyroid hormone
RER	Rough endoplasmic reticulum
rpm	Revolution per minute

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomal RNA
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
Runx2	Runt-related transcription factor 2
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAD	Sma and MADD (Mother against decapentaplegic)
SSC	Sodium sulfonyl citrate buffer
TAE	Tris sodium acetate EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus (polymerase)
TGF-β	Transforming growth factor beta
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

องค์การอนามัยโลก (WHO, World Health Organization) ได้ประกาศให้ปี ค.ศ. 2000-2010 เป็นทศวรรษแห่งกระดูกและข้อ (Bone and joint decade) ซึ่งปัจจุบันได้รับการสนับสนุนจากองค์การสหประชาชาติ เนื่องจากโรคข้อ (joint disease) นั้นครึ่งหนึ่งเป็นผลที่เกิดจากอาการเรื้อรังในประชากรที่อายุ 65 ปีขึ้นไป อาการกระดูกหักเนื่องจากกระดูกพรุน (osteoporotic fracture) เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทศวรรษที่ผ่านมา ซึ่งร้อยละ 40 ของสตรีที่อายุ 50 ปีขึ้นไปมักพบอาการดังกล่าว มีการประเมินว่าประเทศที่พัฒนาแล้วมีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสุขภาพสูงถึงร้อยละ 25 ในการดูแลอาการบาดเจ็บเมื่อสิ้นสุดทศวรรษนี้ และมีเด็กจำนวนมากที่มีพัฒนาการผิดปกติจากโรคทุพพลภาพและพิการทางร่างกาย และมีกระดูกผิดรูปร่าง [(1)]

มีโรคกระดูกทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังที่ต้องการการปลูกถ่ายกระดูกทดแทน (bone graft substitute) เพื่อซ่อมแซมกระดูกบริเวณที่มีการบาดเจ็บหรือบางส่วนบกพร่อง ปัจจุบันพบว่ามีการปลูกถ่ายกระดูกประมาณ 500,000 รายต่อปีในสหรัฐอเมริกา เช่น พบว่ามีการรักษาเพื่อเชื่อมกระดูกสันหลัง (spinal fusion) ประมาณ 220,000 ราย ในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1998 ซึ่งต้องการการปลูกถ่ายกระดูกเพื่อรักษากระดูกสันหลังบริเวณที่ผิดรูปร่าง หมอนรองกระดูกเสื่อม อาการกระดูกบาดเจ็บ และมะเร็งในกระดูก มีการคาดคะเนว่าการรักษาผู้ป่วยกระดูกหักในสหรัฐล้มเหลวถึง 170,000 รายในแต่ละปี เนื่องจากไม่สามารถรักษากระดูกที่หักให้เชื่อมติดกันได้ภายในเวลา 9 เดือน จึงมีความจำเป็นที่จะนำวัสดุเพื่อมาสร้างกระดูกทดแทนซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย [(1)]

ส่วนในประเทศไทยนั้น รัฐบาลได้วางนโยบายให้กระทรวงสาธารณสุขกำหนดวิสัยทัศน์การเป็นศูนย์กลางสุขภาพของเอเชีย (Thailand : Center of Excellent Health Care of Asia) ภายใน 5 ปี (พ.ศ. 2547-2551) เพื่อพัฒนาธุรกิจรักษาพยาบาล บริการส่งเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและสมุนไพรไทย โดยได้ตั้งเป้าหมายให้ระยะ 5 ปี จะมีรายได้จากผลผลิตรวม 210,815 ล้านบาท [(2)]

จากรายงานของกรมศุลกากรในปี พ.ศ. 2546 พบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ประเภทเครื่องมือและวัสดุทางศัลยกรรมกระดูกถึงร้อยละ 9.11 ในขณะที่มีการส่งออกเพียงร้อยละ 0.381 แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยยังมีการวิจัยและพัฒนาด้านวัสดุทดแทนกระดูกน้อยมากและสมควรที่จะสนับสนุนอย่างเร่งด่วน เพื่อจะได้ลดอัตราการ

นำเข้า รวมทั้งไม่เกิดการเสียดุลทางการค้ากับต่างประเทศแล้ว ยังอาจได้ประโยชน์ในด้านราคาที่ถูกกว่า และสามารถส่งออกเพื่อทำรายได้เข้าประเทศไทยอีกทางหนึ่ง [2]

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์และแพทย์ให้ความสนใจในการสร้างอวัยวะเทียม และคิดค้นวิธีการที่จะซ่อมแซมหรือสร้างอวัยวะขึ้นมาใหม่ ซึ่งปรากฏเป็นรูปธรรมชัดเจนมากขึ้นเมื่อนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยเคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง embryonic stem cells ของหนูในปี ค.ศ. 1988 ซึ่งนำไปสู่การเพาะเลี้ยง embryonic stem cells ของมนุษย์โดยนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1998 การค้นพบดังกล่าวทำให้มีผู้สนใจทำวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดกันอย่างมากและทำให้เกิดศาสตร์ใหม่ที่เรียกว่า เวชศาสตร์การฟื้นฟูสภาวะเสื่อม (Regenerative medicine) ซึ่งมุ่งหวังที่จะหาวิธีการในการที่จะซ่อมแซมอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งผิดปกติจากความเสื่อม ความสูงอายุ จากโรคภัยไข้เจ็บ และจากภยันตรายต่างๆ

Embryonic stem cells มีศักยภาพที่จะแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดและสามารถเจริญเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดในร่างกายมนุษย์ แต่การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเอมบริโอของมนุษย์มาใช้ในการทำวิจัยและการซ่อมแซมอวัยวะยังมีปัญหาทางด้านจริยธรรม จึงทำให้ adult stem cells ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง เซลล์ต้นกำเนิดที่เป็น adult stem cells มีศักยภาพและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์หลายชนิดที่รู้จักกันดีคือ เซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก ในเลือด และเลือดสายสะดือ เป็นต้น

การศึกษาทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ด้านชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ได้พัฒนาอย่างรวดเร็ว มีการวิจัยและพัฒนาเพื่อหาแนวทางในการรักษาและซ่อมแซมกระดูกในผู้ป่วยซึ่งร่างกายสร้างเซลล์กระดูก (osteoblasts) ได้จำกัด และมีความผิดปกติของกระดูก กระดูกไม่เชื่อมติดกัน กระดูกแหว่งหายไปจากอุบัติเหตุหรือจากการติดเชื้อ แนวทางการรักษาวิธีหนึ่งที่ทำได้โดยการนำแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดของกระดูก (osteogenic stem cells) มารวมกับโครงร่าง scaffold แล้วนำไปเพาะเลี้ยงหรือปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถชักนำเซลล์ต้นกำเนิดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ (osteoblastic differentiation) ซึ่งนำวิธีการนี้มาใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มการสร้างและชักนำกระดูกใหม่ในผู้ป่วยรวมถึงการศึกษาวิจัยทางด้านวัสดุ biomaterial และด้าน tissue engineering ต่อไปในอนาคต

เนื้อเยื่อกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized bone matrix : DBM) เป็นวัสดุโครงร่าง scaffold ที่ช่วยส่งเสริมชักนำให้ osteoprogenitors เกิดกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) ได้ เมื่อทำการปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง [3] ความสามารถของ DBM ร่วมกับ bone marrow stromal stem cells (BMSCs) ในการชักนำการสร้างกระดูกใน

สัตว์ทดลอง เชื่อว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง osteoprogenitors ใน BMSCs กับ growth factors และ cytokines ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายใน DBM ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการชักนำเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts ได้[4] ดังนั้นความสามารถของ DBM ในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดให้เกิดการสร้างกระดูกนั้น ก่อให้เกิดความรู้และประโยชน์ในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยนำมาใช้เป็นวัสดุ biomaterial สำหรับซ่อมแซมกระดูกได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีแหล่งของเซลล์ osteoprogenitors ซึ่งสามารถแยกสกัดได้จากสายสะดือรก (umbilical cord) โดยมีการศึกษาพบว่า human umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMS cells) นั้นประกอบด้วย pluripotent stem cells หรือ multipotent stem cells ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts ได้ [5]

เซลล์ osteoblasts เกิดจากเซลล์ common progenitors เช่นเดียวกับเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) เซลล์กล้ามเนื้อ (myocytes) และเซลล์ไขมัน (adipocytes) โดยอาศัยฮอร์โมนหลายชนิดร่วมกับปัจจัยเฉพาะที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์เหล่านี้ มีการศึกษาพบว่าการควบคุมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts อาศัยปัจจัยเฉพาะที่สำคัญ เช่น bone morphogenetic proteins (BMPs) และ transcription factors ต่างๆ BMPs เป็นโปรตีนที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts โดยเซลล์ osteoblasts สามารถแสดงตัวบ่งชี้จำเพาะ (phenotypic markers) ได้หลายชนิด เช่น alkaline phosphatase (ALP) activity ที่เพิ่มสูงขึ้น การสังเคราะห์โปรตีน collagenous bone matrix proteins และ noncollagenous bone matrix proteins รวมทั้ง osteocalcin เป็นต้น อีกทั้งมีการแสดงออกของหน่วยรับ (receptor) ต่อฮอร์โมนบางชนิด เช่น ฮอร์โมน parathyroid hormone (PTH) ฮอร์โมน estrogen และฮอร์โมน glucocorticoid ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts [6]

ภาวะกระดูกหัก กระดูกแหว่ง เนื้องอกในกระดูก และกระดูกติดเชื้อเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อวัณโรค และเชื้อรา เป็นภาวะที่พบได้บ่อยซึ่งก่อให้เกิดทุพพลภาพต่อผู้ป่วยโรคกระดูก อีกทั้งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรในประเทศไทย โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเนื้องอกในกระดูก และผู้ป่วยโรคติดเชื้อที่จำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดนำเอาส่วนของกระดูกบริเวณที่มีพยาธิสภาพออก และซ่อมแซมเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้กลับคืนสู่สภาพปกติ ในการรักษานั้นจึงจำเป็นต้องได้รับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกระดูกมาใส่ทดแทนบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดซึ่งมีการแหว่งหายของกระดูกส่วนที่มีพยาธิสภาพออกไป เนื่องจากการปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้ชิ้นส่วนของกระดูกจากตัวผู้ป่วยเองที่บริเวณสะโพก (autogenous bone

graft) ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและการติดเชื้อเพิ่ม ดังนั้นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งของการรักษาคือการนำ DBM จากผู้บริจาคอวัยวะมาใช้แทน (demineralized bone matrix allograft) โดย DBM เป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่ผ่านขั้นตอนกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ในกระดูก เช่น แคลเซียมและฟอสฟอรัส แต่ยังคงเหลือองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน collagen และ non-collagen รวมทั้ง BMPs และ growth factors ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการชักนำและเสริมสร้างกระดูกใหม่

สายสะดือรก (human umbilical cord) ประกอบไปด้วยหลอดเลือดซึ่งมี 1 หลอดเลือดดำ และ 2 หลอดเลือดแดงรวมอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า Wharton's jelly ล้อมรอบอยู่ ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้น (gelatinous) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอย่างหลวม (loose mucoid connective tissue) ประกอบด้วยเซลล์ที่กระจายอยู่ในสารชนิด amorphous ground substance ประเภท proteoglycan เช่น hyaluronic acid รวมถึง collagen ชนิดต่างๆ [7] เซลล์ที่กระจายตัวอยู่ในเมตริกซ์ (matrix) พบว่ามีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast-like) ที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย (stellate shape) อยู่ในบริเวณสายสะดือที่ขมวดปม (collapsed cord) และมีรูปร่างยืดยาวออกในบริเวณสายสะดือที่ยืดตัว (distended cord)[8,9]

การศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรกไปเพาะเลี้ยง (explant) พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงได้เซลล์ไลน์ของกระดูกอ่อน (chondrocyte lineage) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (chondrogenic media) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly (Wharton's jelly derived cells) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงสามารถเปลี่ยนแปลงและแสดงลักษณะฟีโนไทป์คล้ายเซลล์กระดูก (osteoblast-like phenotype) ได้ในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro*) เช่นเดียวกับ human umbilical cord mesenchymal (UCMS) cells เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนเจริญเพิ่มจำนวนจนเหมาะสม สามารถที่จะชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต่างๆ ได้หลายชนิด คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า mesenchymal stem cells (MSCs) สามารถแยกเพาะเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับ DBM จะสามารถเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไลน์ของกระดูก (osteoblastic lineage) ได้ ซึ่งสามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นทางเลือกสำหรับวิธีการรักษาด้วยเซลล์ (cell-based therapy) ร่วมกับการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ได้ในอนาคต

ในปัจจุบันมีการศึกษาแพร่หลายเกี่ยวกับการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน (gene expression) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น cDNA array และ RT-PCR analyses

แม้ว่ามีการศึกษาวิจัยเรื่องการศึกษาถึงคุณสมบัติและความสามารถของ DBM เป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาผลของ DBM ต่อกระบวนการ osteoblastic differentiation ในเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งจึงนี้เพื่อศึกษาความสามารถของ DBM ต่อการชักนำ MSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts โดยใช้วิธี cDNA array และวิธี RT-PCR analyses

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาว่า Wharton jelly derived cells มีคุณสมบัติเป็น mesenchymal stem cells
2. เพื่อศึกษาถึงความสามารถของ DBM ต่อการชักนำ mesenchymal stem cells ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรก ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts
3. เพื่อให้ทราบถึงยีนที่มีการแสดงออกและส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts เมื่อได้รับ DBM
4. เพื่อนำ mesenchymal stem cells ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรก มาทดสอบความสามารถในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoinductivity) ของ DBM ในหลอดทดลอง
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ osteoblastic differentiation ใน mesenchymal stem cells
6. เพื่อให้ได้ความรู้เกี่ยวกับกลไกของการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts อันจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคกระดูกต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ DBM, Wharton's jelly cells , osteoblastic differentiation

↓

ทำการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly แล้วพิสูจน์ว่าเป็น mesenchymal stem cells

↓

ศึกษาคุณลักษณะของเซลล์ (cell characteristic) และการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation)

↓

ศึกษา osteoblastic differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase (ALP) staining assay และ ALP activity assay

↓

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนการศึกษา osteoblastic differentiation โดยใช้วิธี cDNA Array analysis

↓

ตรวจยืนยันผลด้วยวิธี RT-PCR

↓

สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1.เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ

2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความเต็มใจและรับทราบคำชี้แจงในทุกเรื่องก่อนเข้าร่วมโครงการ

3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้เข้ารับการคลอดบุตร ที่แผนกสูตินารีเวชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

4. แพทย์ผู้ทำการรักษา จะทำการเก็บชิ้นส่วนสายสะดือรกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร หลังจากทำคลอดเสร็จ

ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ

cDNA array

Demineralized bone matrix (DBM)

Gene expression

mesenchymal stem cells

Osteoblastic differentiation

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. **cDNA (complementary DNA)** หรือ DNA คู่สม คือ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจาก mRNA template โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase
2. **cDNA array** คือเทคนิควิธีซึ่งนำ cDNA ที่ติดฉลาก ไปจับกับชิ้นส่วนของ DNA ซึ่งติดอยู่บนแผ่น array membrane แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนแต่ละยีน โดยการอ่านด้วยเครื่องตรวจความเข้มของสีในแต่ละยีนเพื่อเปรียบเทียบว่ามีการแสดงออกของยีนมากหรือน้อยกว่ากัน
3. **DNA (nucleic acid) hybridization** การจับคู่ DNA หรือ กรดนิวคลิอิก เป็นวิธีการที่ใช้คุณสมบัติในการแยกและจับคู่ ระหว่างสาย DNA กับสาย DNA หรือสาย DNA กับสาย RNA หรือ สาย RNA กับสาย RNA โดย DNA สายคู่จะแยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงหรือสารละลายด่างเข้มข้น จะเสียสภาพ (denature) และสามารถคืนสภาพ (renature) มาจับคู่กันใหม่ได้ในภาวะที่เหมาะสม (เช่น การลดอุณหภูมิลง) การจับคู่ระหว่าง DNA หรือ RNA แต่ละสาย เป็นระบบเดียวกันกับการจับคู่ของเบสคู่สม คือ C กับ G และ A กับ T หรือ U สายหนึ่งมักจะติดสลาก และจะใช้เป็น probe หรือตัวตรวจสอบสายที่สอง
4. **DNA primer** คือ DNA สายเดี่ยวสายสั้นๆ หรือ oligonucleotide ที่เป็นสายตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ในการจำลอง DNA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase
5. **DNA probe** คือ ชิ้น DNA ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ อาจมีการติดสลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioactive substance) หรือสารปลอดกัมมันตรังสี (non radioactive substance)

6. **Electrophoresis** วิธีการแยกโมเลกุลของสารในตัวกลางพวกวุ้น (gel) โดยใช้กระแสไฟฟ้า แล้วดำเนินการตรวจสอบ ซึ่งการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก หรือจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ จะขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุล รูปร่าง และประจุ
7. **Wharton's jelly derived cells** คือ เซลล์ตั้งต้นที่แยกได้จากสายสะดือรกของทารกแรกคลอด (ส่วน Wharton's jelly) ด้วยวิธี primary culture
8. **Osteoblastic differentiation** หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเซลล์ เช่น การแสดงออกของยีนภายในเซลล์ที่ทำให้มีการแสดงฟีโนไทป์เป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic phenotype)
9. **Over expression (of gene)** การแสดงออกเกิน (ของยีน) การแสดงออกของยีน การแสดงออกของยีนที่เพิ่มจากระดับปกติ ซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นของสภาพแวดล้อมหรือปัจจัยอื่น เช่น มี promoter ที่มีประสิทธิภาพดี (strong promoter)
10. **RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)** เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของ DNA ที่ได้จากต้นแบบที่เป็น mRNA ในหลอดทดลอง โดยการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ก่อน แล้วจึงเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถของ DBM ต่อการชักนำ mesenchymal stem cells ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรก ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts
2. ทราบว่ายีนตัวใดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง mesenchymal stem cells ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรก ไปเป็นเซลล์ osteoblasts และยีนใดที่ไม่มีผลเมื่อได้รับ DBM
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts
4. ก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกลไกการชักนำการสร้างกระดูกได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้พัฒนากระบวนการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติหรือบกพร่องของการสร้างกระดูก

วิธีดำเนินการวิจัย

เตรียม demineralized bone matrix (DBM)

↓

วัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมที่คงเหลืออยู่ (Residual calcium content) ใน DBM

↓

แยก Wharton's jelly derived cells จากสายสะดือรก ด้วยวิธี primary culture แล้วเพาะเลี้ยงด้วย α-MEM+10%FBS+ antibiotics incubate จนเซลล์เจริญเติบโตและได้จำนวนที่เหมาะสม

↓

ทดสอบ Wharton's jelly derived cells ว่าเป็น mesenchymal stem cells (MSCs) ด้วยวิธี in vitro functional mesenchymal stem cell identification โดยการชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไลน์ของไขมัน กระดูก และกระดูกอ่อน

↓

เลี้ยงเซลล์ MSCs ใน α-MEM+2%FBS+DBM +antibiotics (กลุ่มทดลอง) เป็นเวลา 7 วัน	เลี้ยงเซลล์ MSCs ใน α-MEM+2%FBS +antibiotics (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 7 วัน

↓

ศึกษา cell proliferation และ differentiation ของเซลล์

↓

ศึกษา osteoblastic differentiation ด้วยวิธี ALP staining assay และ ALP activity assay

↓

collect cells, extract RNA, เปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี cDNA array แล้ว develop สัญญาณที่เกิดขึ้นบนฟิล์ม X-ray นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

↓

เลือกยีนที่สนใจมาทำ RT-PCR เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

↓

วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ยื่นเสนอ proposal ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย

↓

ให้ subject ลงชื่อใน informed consent ก่อนทำการเก็บตัวอย่างสายสะดือรก

↓

ทำการแยกเซลล์จากสายสะดือรก ศึกษาคุณลักษณะของเซลล์
ทดสอบคุณสมบัติการเป็น mesenchymal stem cells

↓

ทดสอบเซลล์ด้วย DBM แล้วศึกษาผลที่เกิดขึ้น รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีน เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ และทำการวิเคราะห์ข้อมูล

↓

สรุปผล เขียนรายงานผลวิจัยที่ได้ และส่งรายงานเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูก และองค์ประกอบที่เกี่ยวข้อง

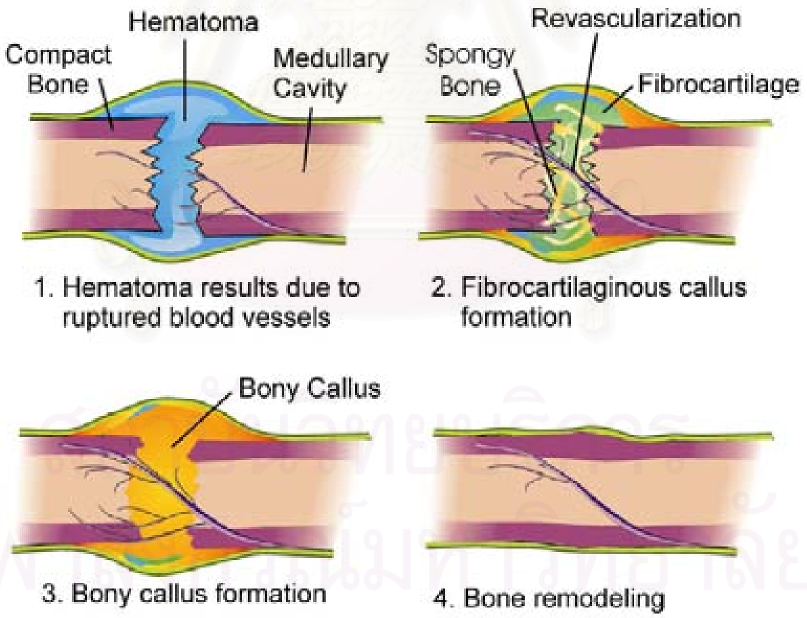
กระดูกเป็นเนื้อเยื่อประสานชนิดพิเศษ มีความแข็งเนื่องจากมี calcified intercellular substance กระดูกเป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบการเคลื่อนไหวของร่างกาย ห่อหุ้มป้องกันอวัยวะภายในและเป็นแหล่งเก็บสะสมเกลือแคลเซียมของร่างกาย กระดูกประกอบด้วย 2 องค์ประกอบหลัก คือเซลล์ และ extracellular matrix (ECM) หรือ bone matrix [10]

เซลล์ของกระดูกมี 4 ชนิด ได้แก่เซลล์ osteoprogenitors เซลล์ osteoblasts เซลล์ osteocytes และเซลล์ osteoclasts องค์ประกอบภายนอกของเซลล์ของกระดูกประกอบด้วยสารอินทรีย์ (organic matter หรือ osteoid) ประมาณร้อยละ 35 และสารอนินทรีย์ (inorganic matter) ประมาณร้อยละ 65 โดยสารอินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเส้นใย collagen ที่ฝังตัวอยู่ใน ground substance ซึ่งประกอบด้วย glycosaminoglycan (GAG) ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ chondroitin sulfate, keratin sulfate และ hyaluronic acid เส้นใย collagen ชนิดที่หนึ่ง (type I) มีประมาณร้อยละ 90 ของสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อกระดูก ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 10 เป็นโปรตีนชนิด non-collagen เช่น osteocalcin, matrix Gla protein, bone sialoprotein, osteopontin, osteonectin, fibronectin, thrombospontin, tenascin และ proteoglycan (ได้แก่ decorin และ biglycan) รวมถึง growth factors ต่างๆ เช่น bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor beta (TGF-β), fibroblast-derived growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF) และ insulin-like growth factor (IGF) เป็นต้น [10, 11]

สารอนินทรีย์ภายในกระดูกมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบหลัก (bone mineral) ของแคลเซียมกับฟอสเฟตรวมตัวกันเป็นผลึกเรียกว่า calcium hydroxyapatite crystal ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ผลึกเหล่านี้จะเกาะอยู่บนเส้นใย collagen และแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยอย่างสม่ำเสมอ ถ้าแยกสารอนินทรีย์ออกจากเนื้อของกระดูก กระดูกจะเหนียวและโค้งงอได้แต่ไม่มีความแข็ง ในทางกลับกันถ้าแยกส่วนของสารอินทรีย์ออก กระดูกนั้นจะเปราะหักได้ง่าย นอกจากนี้กระดูกยังมีส่วนที่เป็นของเหลว เช่นเลือดและน้ำเหลืองไปหล่อเลี้ยงตลอดเวลา กระดูกจึงเป็นอวัยวะที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์กระดูก (bone formation) และการสลาย

กระดูก (bone resorption) อย่างสมดุลกัน เพื่อนำแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่างๆ ของร่างกาย [10, 12]

เซลล์ osteoprogenitors นั้นมีต้นกำเนิดมาจาก embryonic mesenchymal cells และมีศักยภาพในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) และเจริญและพัฒนาเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์ osteoblasts เซลล์เหล่านี้พบอยู่ทั่วไปบริเวณผิวของกระดูกโดยแทรกอยู่ใน endosteum ชั้นในของ periosteum และบน trabeculae ของ calcified cartilage ตรงส่วน metaphysis ของกระดูกที่กำลังเจริญเติบโต ลักษณะของเซลล์ มีนิวเคลียสรูปรียาว (spindle shape) สีซีด ไซโตพลาสมมีน้อย ภายในบรรจุ rough endoplasmic reticulum (RER), free ribosome และ golgi apparatus ขนาดเล็ก ในกระบวนการเจริญเติบโตของกระดูก เซลล์ osteoprogenitors ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts เพื่อทำหน้าที่สร้างเนื้อกระดูก นอกจากนี้เมื่อกระดูกเกิดการแตกหัก เซลล์ osteoblasts มีการแบ่งตัวเพื่อซ่อมแซมเนื้อกระดูกที่ถูกทำลาย และมีการสร้างกระดูกแข็งที่เรียกว่า callus ออกมาเชื่อมบริเวณส่วนที่หักของกระดูกแข็งนั้น [10]



รูปที่ 1 แสดงลำดับการซ่อมแซมกระดูกหัก (bone healing) [1]

เซลล์ osteoblasts เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างเนื้อกระดูก เซลล์มีลักษณะเป็นรูปลูกบาศก์หรือทรงกระบอก เรียงตัวเป็นแถวชิดกันคล้ายเนื้อบุผิว พบที่บริเวณผิวของกระดูกที่กำลังสร้างเนื้อกระดูกขึ้นใหม่ นิวเคลียสมักอยู่ด้านตรงข้ามกับผิวของกระดูก

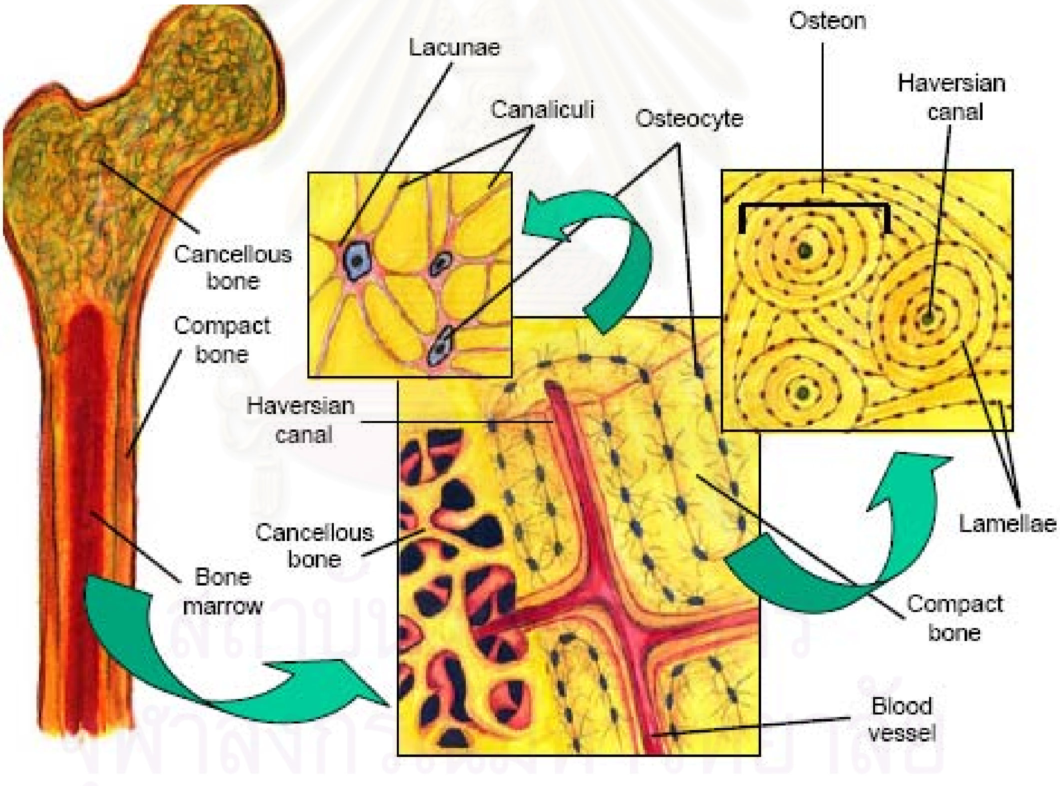
ไซโตพลาสมติดสีน้ำเงินเข้ม มี golgi complex ขนาดใหญ่อยู่ระหว่างนิวเคลียส และฐานของเซลล์ ทำให้เห็นบริเวณนั้นติดสีจางกว่าบริเวณอื่น ภายในเซลล์อาจพบแวคิวโอลติดสีชมพูเมื่อย้อมด้วยวิธี Periodic acid Schiff (PAS) ซึ่งเชื่อว่าบรรจุสารที่นำไปสร้างเนื้อกระดูก ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบ RER ขนาดใหญ่ มี free ribosome จำนวนมากในไซโตพลาสม เนื้อกระดูกที่สร้างออกมาในระยะแรกยังไม่มีการสะสมของแคลเซียม เรียกว่า osteoid ต่อมาเมื่อเกิดการสะสมของผลึกแคลเซียม (calcification) ล้อมรอบเซลล์ เรียกว่าเซลล์ osteocyte [10, 12]

เซลล์ osteocytes เป็นเซลล์หลักที่พบในกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว บรรจุอยู่ในช่องที่เรียกว่า lacuna ซึ่งล้อมรอบด้วย calcified matrix เซลล์ประเภทนี้จะไม่มีการแบ่งตัวอีก รูปร่างของเซลล์สามารถบ่งชี้ได้จากรูปร่างของ lacuna เซลล์ชนิดนี้มีแขนงเล็กๆ ยื่นเป็นรัศมีออกไปรอบๆ เซลล์ แทรกเข้าไปในเนื้อกระดูกตามช่องเล็กๆ เรียกว่า canaliculi แขนงของเซลล์หนึ่งติดต่อกับแขนงของเซลล์ข้างเคียงในลักษณะของ gap junction ทำให้สารอาหาร ฮอร์โมนและของเสียสามารถส่งผ่านเข้าออกระหว่างหลอดเลือดกับเซลล์ที่อยู่ในส่วนลึกของกระดูกได้ เซลล์ osteocytes มีลักษณะของเซลล์โดยทั่วไปคล้ายกับเซลล์ osteoblasts แต่ golgi complex ไม่เด่นชัด ออร์แกเนลล์อื่นๆ มีขนาดเล็ก ไซโตพลาสมติดสีจางกว่า เพราะไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้เหมือนเซลล์ osteoblasts หน้าที่ของเซลล์ osteocytes เชื่อว่าเกี่ยวกับการบำรุงรักษาซ่อมแซมเนื้อกระดูกบริเวณนั้น [10, 12]

เซลล์ osteoclasts ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก (bone resorption) เพื่อตบแต่งรูปร่างของกระดูก โดยจะหลั่งเอ็นไซม์หลายชนิด ซึ่งทำให้มีการย่อย collagen และมีการละลายของผลึกแคลเซียมออกจาก bone matrix จึงพบเซลล์เหล่านี้ในบริเวณผิวกระดูกแข็งที่กำลังมีการกัดกร่อนโดยบรรจุอยู่ในแอ่งที่เรียกว่า Howship's lacuna ลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีหลายนิวเคลียส จึงอาจเรียกว่าเป็น multinucleated giant cell นิวเคลียสส่วนใหญ่เรียงตัวอยู่ใกล้ขอบเซลล์ด้านที่เป็นพื้นผิวอิสระ (free surface) ซึ่งผิวเซลล์ด้านนี้ค่อนข้างเรียบ ส่วนผิวเซลล์ด้านที่ติดกับเนื้อกระดูก มีขนเล็กๆ ยื่นออกมามีลักษณะคล้าย brush border แต่ไม่เป็นระเบียบ และมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไม่คงที่เกิดจากการม้วนพับของ plasma membrane เป็นหยักคั่นด้วยร่องตื้นๆ เรียกผิวของเซลล์บริเวณนี้ว่า ruffled border ซึ่งไซโตพลาสมที่อยู่บริเวณนี้ประกอบด้วยไมโตคอนเดรียเป็นส่วนใหญ่ ปนกับ vesicle ที่บรรจุน้ำย่อยพวก acid phosphatase นอกจากนี้บนผนังของ plasma membrane ด้านที่ติดกับไซโตพลาสมตรงบริเวณ ruffled border พบว่าผนังเซลล์อยู่ชิดกับเนื้อกระดูกแข็ง และไซโตพลาสมตรงส่วนนี้บรรจุ actin filament จำนวนมาก เชื่อว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงเป็นพิเศษของผนังเซลล์เพื่อทำ

หน้าที่จำกัดขอบเขตของการกัดกร่อนเนื้อกระดูกแข็ง เรียกบริเวณนี้ว่า sealing zone ปัจจุบันเชื่อว่าเซลล์ osteoclasts มีต้นกำเนิดมาจาก granulocyte-macrophage progenitor cell ที่อยู่ในไขกระดูก (10, 12)

การศึกษากระดูกด้วยตาเปล่า สามารถแบ่งกระดูกออกเป็น 2 ชนิด คือ cancellous (spongy) bone และ compact (cortical or dense) bone โดย cancellous bone เป็นกระดูกที่มีลักษณะพรุนคล้ายฟองน้ำประกอบด้วยกระดูกชิ้นเล็กๆ เรียกว่า trabeculae (spicule) เชื่อมติดกันเป็นร่างแห มีช่องว่างเล็กๆ ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าและเป็นที่บรรจุไขกระดูก (bone marrow) ขณะที่ compact bone เป็นกระดูกที่มีลักษณะเนื้อแน่นแข็งคล้ายงาช้าง ประกอบด้วยเนื้อกระดูกที่อัดกันแน่น มีช่องว่างเล็กๆ อยู่ภายในมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นและเป็นที่บรรจุหลอดเลือดฝอยและหลอดน้ำเหลือง (10)

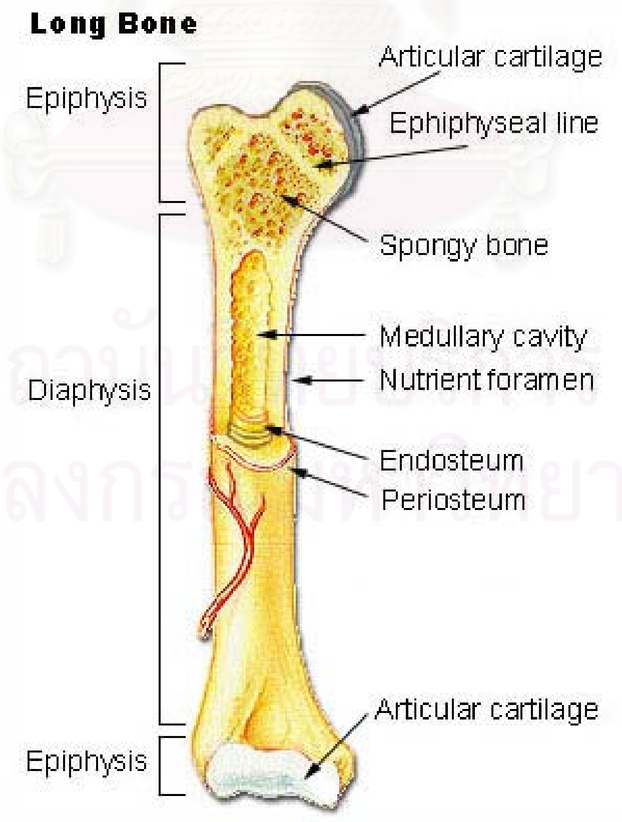


รูปที่ 2 แสดงแผนผังโครงสร้างของกระดูก (1)

กระดูกแบ่งตามลักษณะรูปร่างได้เป็น 4 ชนิดคือ long bone, short bone, flat bone และ irregular bone โดย long bone เป็นกระดูกแข็งที่มีรูปร่างยาว (shaft) มีความยาวมากกว่าความกว้าง เช่น กระดูก humerous, femur เป็นต้น กระดูกยาวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ คือ diaphysis เป็นส่วนที่เป็นแท่งยาว ส่วนใหญ่ประกอบด้วย compact bone ตรง

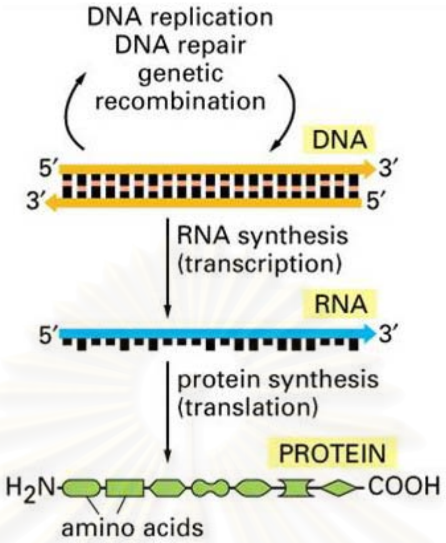
กลางมีช่องกลวง เรียกว่า medullary (marrow) cavity เป็นที่อยู่ของไขกระดูก epiphysis เป็นส่วนปลายทั้งสองข้างของกระดูกยาว ประกอบด้วย spongy bone อยู่ด้านในมี compact bone คลุมบางๆ ด้านนอกช่องพรุนของ spongy bone ต่อเนื่องกับโพรงไขกระดูกในส่วนของ diaphysis และ metaphysis คือ ส่วนปลายของแท่งกระดูกยาวที่เริ่มขยายกว้างออก ส่วนสุดท้ายคือ epiphyseal plate เป็นส่วนต่อระหว่าง epiphysis กับ metaphysis ซึ่งเป็นกระดูกอ่อนที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโต ส่วนนี้ประกอบด้วย hyaline cartilage และมีการแบ่งตัวสร้างเนื้อกระดูกเพื่อเพิ่มความยาวให้กับแท่งกระดูก กระดูกยาวมีหน้าที่สำคัญคือ ทำหน้าที่ค้ำจุนโครงร่างของร่างกาย (supporting) เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว (movement) และเป็นแหล่งยึดเกาะของกล้ามเนื้อลาย [10, 12]

กระดูกแต่ละชิ้นมีเนื้อประสานหุ้มอยู่ที่ผิวด้านนอก เรียกว่า periosteum ซึ่งเป็นเนื้อประสานชนิดที่มีเส้นใยหนาแน่น และการเรียงตัวของเส้นใยไม่เป็นระเบียบ โดยประกอบด้วยเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างเนื้อกระดูกขึ้นใหม่เมื่อมีการหักของกระดูกบริเวณนั้น ส่วนเนื้อประสานที่ดาดอยู่ภายในโพรงไขกระดูก เรียกว่า endosteum มีความสามารถในการสร้างเนื้อกระดูกเช่นเดียวกัน [10]



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของกระดูกยาว

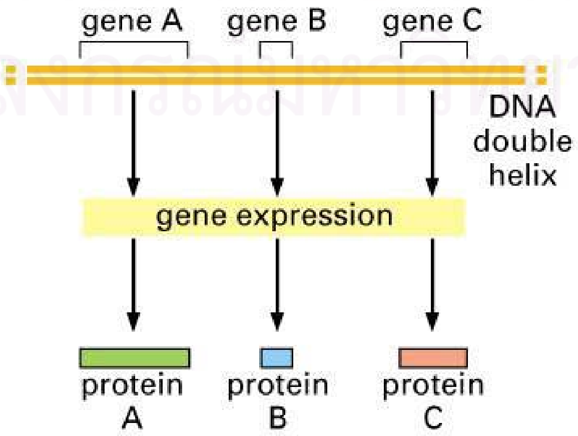
การแสดงออกของยีน (Gene expression)



รูปที่ 4 แสดงภาพรวมการแสดงออกของยีน

การแสดงออกหรือทำหน้าที่ของยีนต่างๆ ในเซลล์ทุกเซลล์ เป็นกระบวนการที่ถูกกำหนดไว้อย่างชัดเจนและมีการควบคุมอย่างเคร่งครัด ในภาวะปกติ เซลล์แต่ละเซลล์ในร่างกายมนุษย์มียีนในจีโนมอยู่ครบถ้วนทุกยีนเหมือนๆ กัน แต่มียีนเพียงประมาณร้อยละ 20 เท่านั้นที่มีการแสดงออกเกิดขึ้นในเวลาที่เหมาะสมของแต่ละยีน โดยในเซลล์ต่างชนิดกันจะมีการแสดงออกเป็นโปรตีนได้ต่างกันขึ้นอยู่กับการทำหน้าที่ของเซลล์นั้นๆ เช่น เซลล์สมอง เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ผิวหนังมียีนทุกยีนครบทุกชุดเหมือนๆ กัน แต่เซลล์ผิวหนังและเซลล์กล้ามเนื้อไม่มีการสร้างโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ได้ในเซลล์สมอง ส่วนเซลล์สมองก็ไม่มีโปรตีนที่จำเพาะซึ่งทำหน้าที่ได้ในเซลล์กล้ามเนื้อ และไม่มีโปรตีนที่จำเพาะซึ่งทำหน้าที่ได้ในเซลล์ผิวหนัง เป็นต้น [(13)]

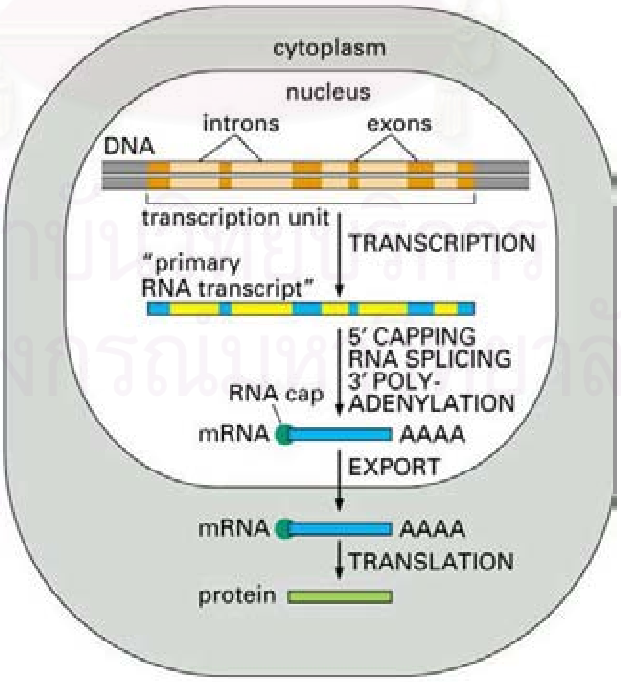
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงการแสดงออกของยีนเป็นโปรตีนที่จำเพาะ

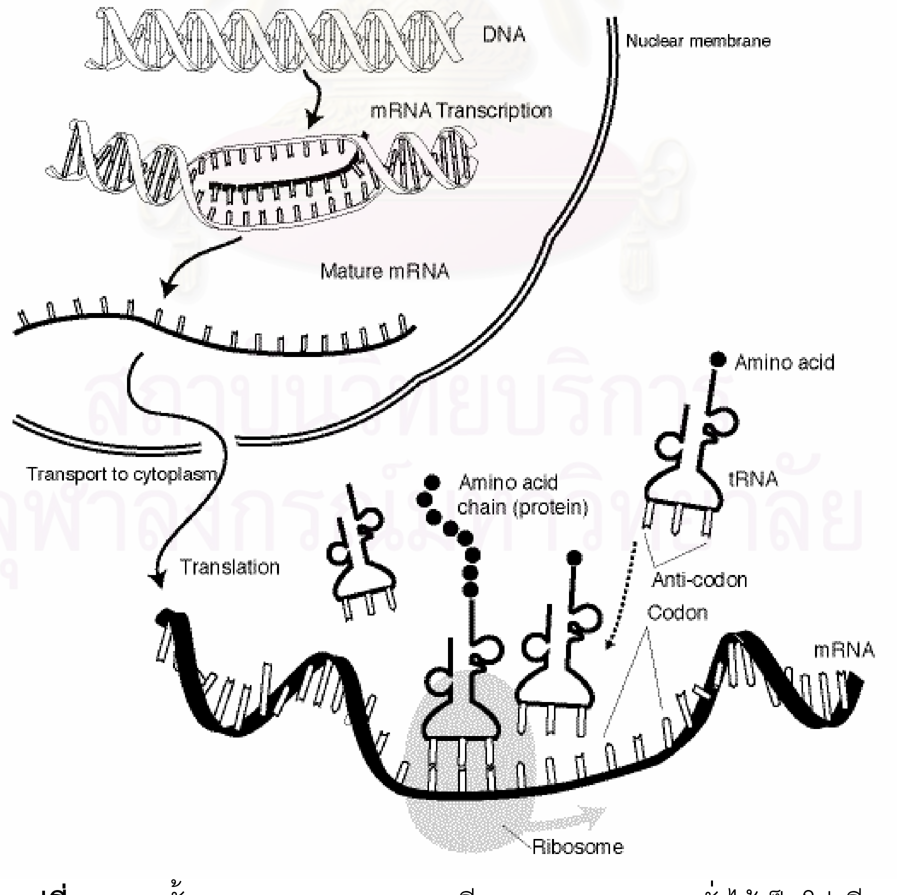
ยีนมีการแสดงออกที่ระดับโมเลกุลออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสร้าง RNA จาก DNA เรียกว่า กระบวนการถอดรหัส (transcription) และการสร้างโปรตีนจาก mRNA เรียกว่า กระบวนการแปลรหัสโปรตีน (translation)

กระบวนการถอดรหัส เป็นการคัดลอกรหัสพันธุกรรมจาก DNA ไปยัง mRNA ที่เกิดใน nucleus ของเซลล์ การถอดรหัสจะเริ่มเมื่อเอนไซม์ RNA polymerase มาจับที่จุดเริ่มต้นของยีนที่ด้าน 5' ที่ตำแหน่ง promoter และเริ่มถอดรหัสที่ codon เริ่มต้นและดำเนินต่อไปจนถึงส่วนปลายของยีนที่ด้าน 3' ลำดับเบสของ mRNA จะเป็นเบสคู่สม (complementary base) กับ DNA แม่แบบที่ถูกใช้คัดลอกรหัส โดยการอ่านสาย DNA เริ่มจากด้าน 3' ไปยัง 5' เพื่อสร้าง RNA ในทิศ 5' ไป 3' แต่ใน RNA จะมีการทดแทนเบส T (thymine) ใน DNA ด้วยเบส U (uracil) โมเลกุล RNA ที่สร้างขึ้นมาใหม่จากการถอดรหัส ซึ่งเรียกว่า heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) คือ มีลำดับเบสถอดแบบมาจาก DNA จะต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงหรือ RNA processing ดังต่อไปนี้ก่อนจะได้เป็น mRNA คือการตัดและเชื่อม (excision and splicing) ซึ่งเป็นขั้นตอนของการกำจัดเอา intron ออกไป และนำ exon มาต่อกัน จากนั้นทำการ capping โดยการเติมสารเคมี methyl guanine ที่ด้านปลาย 5' และกระบวนการ polyadenylation เป็นการเติมเบส A (adenine) หลายตัวที่ด้านปลาย 3' จากนั้น mRNA ที่ผ่านกระบวนการแล้ว จะถูกส่งออกจากนิวเคลียสของเซลล์ไปยัง cytoplasm เรียกว่า การขนส่ง (transport)



รูปที่ 6 แสดงการแสดงออกของยีนใน eukaryotic cell

กระบวนการแปลรหัสโปรตีน เป็นกระบวนการแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีน ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นใน cytoplasm ของเซลล์ที่ ribosome โดยมี ribosomal RNA (rRNA) เป็นตัวนำ transfer RNA (tRNA) มาอ่านเบสของ mRNA จากจุดที่เป็นรหัสเริ่มต้น (initiation codon) หรือ AUG แล้วอ่านไปทีละ 3 เบส โดยทุกๆ 3 เบสจะมีรหัสตรงกับ tRNA 1 ชนิด และ tRNA แต่ละชนิดก็จะนำกรดอะมิโนจำเพาะมาต่อเป็นสายโปรตีน โดยลำดับเบส 3 เบสบนสาย mRNA ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน เรียกว่า mRNA codon ในขณะที่เบส 3 เบสบน tRNA ที่จับกับโคดอน เรียกว่า anticodon tRNA 1 ตัวจะมีกรดอะมิโนจำเพาะจับอยู่ เช่น AUG จะมีกรดอะมิโน methionine มาจับ เป็นต้น ยกเว้น 3 codon คือ UAA, UAG, และ UGA ซึ่งเป็นรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งจะไม่มีกรดอะมิโนจับอยู่ ดังนั้นเมื่อ tRNA ถูกอ่านมาถึง codon 3 รหัสนี้ กระบวนการแปลรหัสก็จะหยุด การสร้างสาย polypeptide ก็จะเสร็จสิ้น สาย polypeptide ที่สร้างเสร็จจะออกมาอยู่ในไซโตพลาสม และจะถูกดัดแปลงปรับแต่งเพิ่มเติมเพื่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการทำงาน เช่น การเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต (glycosylation) การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) เป็นต้น ในที่สุดโปรตีนที่ได้ถูกขนส่งไปยัง organelle ต่างๆ ภายในเซลล์หรือขนส่งออกนอกเซลล์ต่อไป



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการแสดงออกของยีนจาก DNA จนกระทั่งได้เป็นโปรตีน

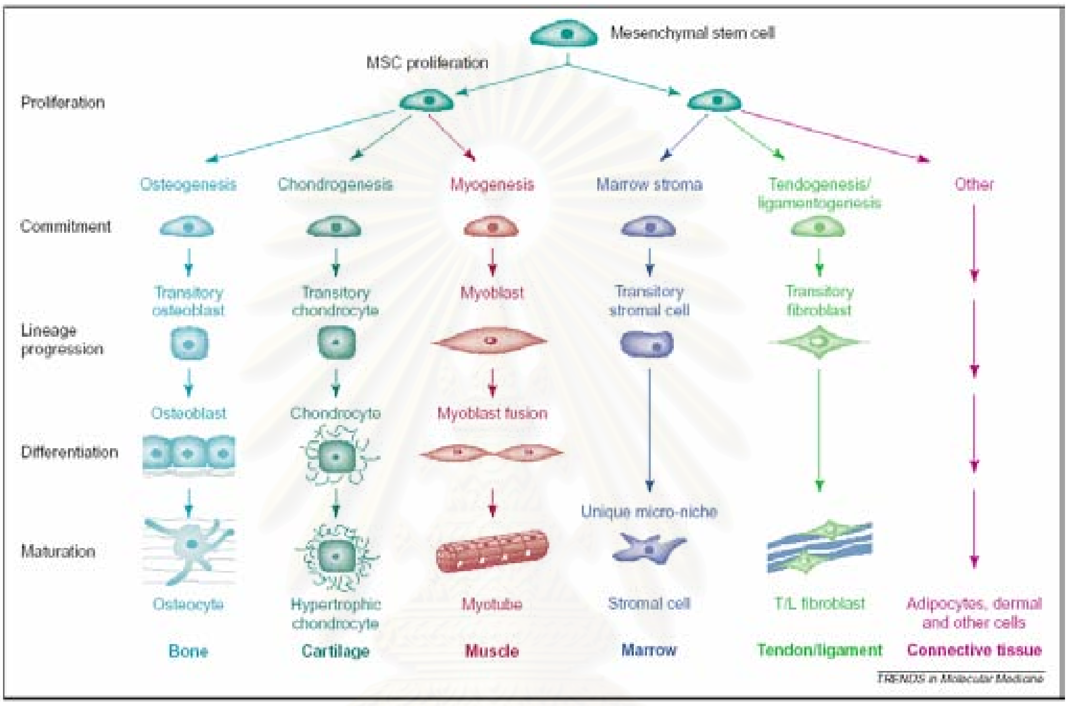
กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation)

osteoinduction คือความสามารถของ mesenchymal stem cells (MSCs) เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นสามารถที่จะเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น chondroblastic lineage และ osteoblastic lineage และนำไปสู่การชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ [14, 15] จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำ nondemineralized bone matrix มาใช้ในการชักนำเพื่อสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ พบว่าใช้เวลานานหลายเดือนและไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร [16] ในปี ค.ศ. 1965 Urist และคณะได้ทำการศึกษาและพบว่ากระดูกที่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณแคลเซียม (decalcification) ด้วยกรด HCl มีความสามารถที่จะชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีกว่ากระดูกที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณแคลเซียม [17] จากการศึกษาของ Reddi และคณะ (1987) รายงานว่ากระดูกซึ่งได้ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralization) จะสามารถชักนำการสร้างกระดูกใหม่ได้ดีในสัตว์ทดลอง [18] ในระยะแรกของกระบวนการ osteogenesis MSCs จะถูกชักนำให้มารวมตัวกันแล้วเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ chondroblasts และเซลล์ osteoblasts [19] ต่อจากนั้นเกิดการสะสมของสารเกลือแร่แคลเซียมและแร่ธาตุต่างๆ (calcification) แล้วเกิดการสร้างกระดูกใหม่รวมทั้งไขกระดูกด้วย

เซลล์ osteoblasts หรือ bone-forming cells เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อการสร้าง bone matrix ซึ่งเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีรูปร่างลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยม (cuboid) และติดสีน้ำตาลแดงเข้มเมื่อย้อมเพื่อตรวจหา alkaline phosphatase ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สามารถสังเคราะห์ alkaline phosphatase ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง collagen type I และ โปรตีนชนิด non-collagen เช่น osteocalcin, bone sialoprotein [20] โดยเซลล์ osteoblast นี้มีต้นกำเนิดมาจาก pluripotent mesenchymal stem cells ซึ่งพบบริเวณ endosteum (เรียกเซลล์บริเวณนี้ว่า bone marrow stromal stem cells : BMSC) และบริเวณ periosteum ของกระดูก (เรียกเซลล์บริเวณนี้ว่า connective tissue mesenchymal stem cells) ซึ่งเมื่อเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้ได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตและเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ preosteoblasts ซึ่งมักพบที่บริเวณผิวกระดูกมีรูปร่างเป็นทรงรี (ellipse) และมีนิวเคลียสยาว สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ osteoblasts ที่เจริญเต็มที่ในที่สุด [21] ดังแสดงในรูป

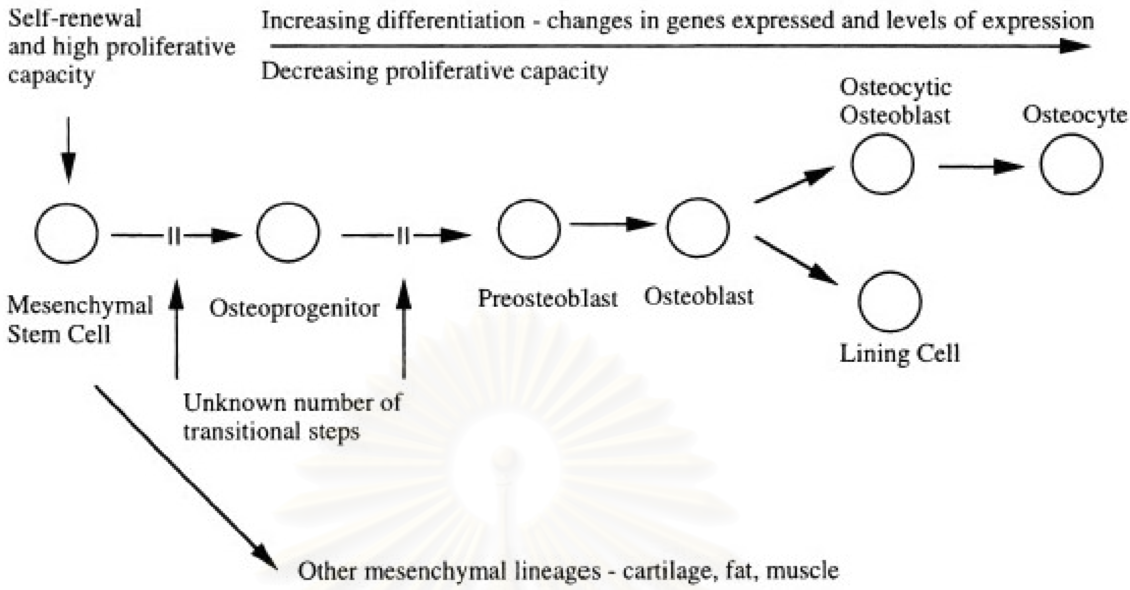
กล่าวโดยสรุป เซลล์ MSCs สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิดเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นซึ่งมีความจำเพาะสำหรับเซลล์ชนิดนั้นๆ โดยผ่านกระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเจริญพัฒนา (differentiation) และกระบวนการเจริญเติบโตเป็น

เซลล์ที่เจริญเต็มที่ (maturation) เช่น เซลล์ osteocytes ในกระดูก เซลล์ chondrocytes ในกระดูกอ่อน เซลล์ myoblasts ในกล้ามเนื้อ เซลล์ stromal cells ในไขกระดูก เซลล์ tendon/ligament (T/L) fibroblasts ในเส้นเอ็น รวมถึงเซลล์ชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นต้น



รูปที่ 8 แสดงขบวนการเปลี่ยนแปลงของ mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ตามลักษณะการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน (differentiated phenotype) [21]

เมื่อทำการศึกษาเฉพาะการเปลี่ยนแปลงจาก MSCs ไปเป็นเซลล์ osteoblasts จนเปลี่ยนเป็นกระดูก โดยเซลล์ต้นกำเนิดจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ MSCs → เซลล์ osteoprogenitors → เซลล์ preosteoblasts → เซลล์ osteoblasts และเซลล์ osteocytes ตามลำดับ ด้วยกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เกี่ยวข้อง เช่น growth factors ชนิดต่างๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง MSCs เป็นเซลล์ osteoprogenitors เป็นเซลล์ preosteoblasts และเป็นเซลล์ osteoblasts ก่อนที่จะกลายเป็นกระดูกในที่สุด

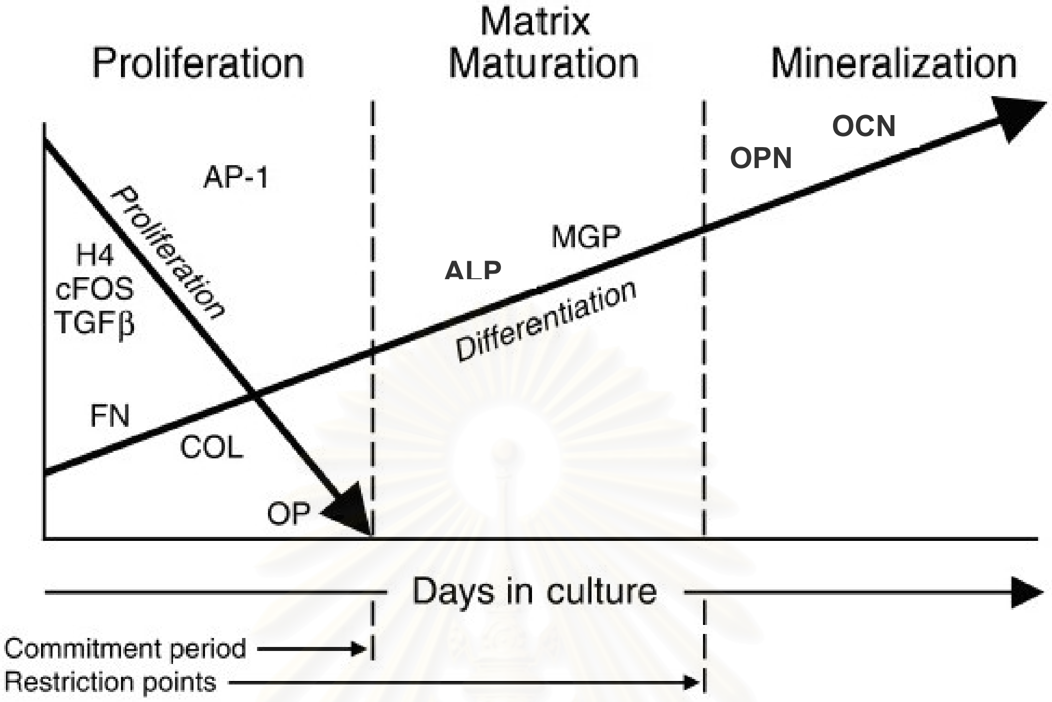


รูปที่ 9 แสดงวิถีการเปลี่ยนแปลง osteoprogenitor differentiation จากเซลล์ mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ osteoblast และ เซลล์ osteocyte ตามลำดับ [43]

การวิเคราะห์ clonal analysis ของเซลล์เพาะเลี้ยงจาก rat calvaria หรือ marrow stroma แสดงให้เห็นว่าเซลล์ ซึ่งมีศักยภาพในการสร้าง mesenchymal phenotype 4 ชนิด คือ กล้ามเนื้อ ไขมัน กระดูกอ่อน และกระดูก multipotentiality ที่คล้ายคลึงกันนี้สังเกตได้ในเซลล์ไลน์จาก mesenchyme เช่น เซลล์ C3HIOTI/2 cells ซึ่งได้รับ agent ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการ DNA methylation ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนรูปแบบของ mesenchymal lineages ทั้งหมด ซึ่งได้มาจาก multipotential stem cell ซึ่งสามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด สำหรับ self-renewal (รูปที่ 9) โดยลำดับเหตุการณ์ดังรูปนั้น จะเห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดในรุ่นถัดมา (progeny) จะกลายเป็นเซลล์ committed progenitors ซึ่งแต่ละเซลล์สามารถเปลี่ยนเป็น mesenchymal lineages ได้ 4 ชนิด เซลล์ osteoprogenitors นั้นเป็นเซลล์ที่เจริญแบ่งตัวได้มากแต่มีช่วงชีวิตจำกัด ขณะที่เซลล์ osteoprogenitors ซึ่งเจริญเต็มที่ จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างจำกัด ตามความสามารถในการเจริญแบ่งตัวของเซลล์เอง เพราะเซลล์ osteoprogenitors ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับเซลล์ osteoblasts ตามปกติ และไม่มีคุณลักษณะของรูปร่างเซลล์ (morphological characteristic) เพื่อจำแนกตัวเองออกจาก mesenchymal cells อื่น จึงจำเป็นต้องมี antigenic markers ที่พิเศษเฉพาะเพื่อจำแนก intermediates ในระยะต้นซึ่งหลากหลายในวิถีดังกล่าวนี้ ซึ่งชี้ขาดสำหรับการจำแนก hematopoietic intermediates ความก้าวหน้าในการจำแนกตัวบ่งชี้ในระยะต้นของ osteoblast lineage ยกตัวอย่างเช่น STRO-1 monoclonal antibody ซึ่งจำแนกโดย Simmons และคณะกล่าวว่ากลุ่ม stromal cell ที่มีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงจะมีศักยภาพใน

การสร้างเซลล์ fibroblasts เซลล์ adipocytes และเซลล์ osteoblasts เมื่อเซลล์ซึ่งมี $STRO\text{-}1^+$ เจริญเติบโตภายใต้สภาวะซึ่งชักนำให้มีการสร้างเซลล์ osteoblasts formation (เช่น ascorbic acid, dexamethasone, และ inorganic phosphate) เมื่อเพาะเลี้ยงจนพัฒนาถึงขั้นสะสมแร่ธาตุจะมีการแดงออกของโปรตีน osteoblast marker การจำแนกตัวบ่งชี้ในระยะต้นอื่นๆ สำหรับเซลล์ไลน์ชนิดนี้มีความสำคัญในอนาคตเพื่อกำหนด osteoprogenitors phenotype [44]

ในปัจจุบัน โปรตีน BMPs เป็นปัจจัยที่แสดงถึงการชักนำกระบวนการ osteoblastic differentiation ในเซลล์ pluripotent mesenchymal stem cells ที่ชัดเจน โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ชนิด BMP-2 ถูกชักนำโดย Shh ในระยะต้นของกระบวนการ limb formation นอกจากนี้โปรตีน BMPs หลายชนิด (เช่น BMP-2, 4, 6, และ 7) กระตุ้นการสร้างเซลล์ osteoblasts ใน cell population ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ pluripotent mesenchymal cells (เช่นเซลล์ marrow stromal cells, mixed primary calvarial cultures, และ mesenchymal cell lines) osteogenic activity ของ BMP นั้นย้อนกลับไปเป็นเซลล์ตั้งต้นไม่ได้ (irreversible) เช่นเซลล์ยังคงมี osteoblastic properties แม้ว่าจะนำเอา BMP ออกไปแล้วก็ตาม ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ pluripotent mesenchymal cells นั้นเปลี่ยนเป็น osteoblast lineage โปรตีนชนิด BMP-2 สามารถเปลี่ยนวิถี differentiation pathway ของเซลล์ C2C12 myoblast จากกล้ามเนื้อไปเป็น osteoblast lineage เมื่อไม่นานนี้มีหลักฐานซึ่งสนับสนุนว่า glucocorticoids เป็น second class ของ compounds ซึ่งทราบว่าเพิ่มเซลล์ osteoprogenitors ในการเพาะเลี้ยง marrow stromal โดยอาจทำหน้าที่เพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนชนิด BMP-6 จึงแสดงว่าโปรตีน BMPs เป็นเพียงหนึ่งในส่วนประกอบมากมายซึ่งจำเป็นต่อการเปลี่ยนเซลล์ pluripotent stem cells เป็นเซลล์ osteoprogenitors ยกตัวอย่างเช่น แม้ว่าโปรตีนชนิด BMP-2 จะกระตุ้นกระบวนการ osteoblastic differentiation ในเซลล์ C3HIOTI/2 mesenchymal cells ซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ adipocytes และเซลล์ chondrocytes โดยเซลล์ adipocytes มักชักนำที่ความเข้มข้นของโปรตีน BMP ในระดับต่ำ ส่วนเซลล์ chondrocytes และเซลล์มักใช้ระดับความเข้มข้นสูง ที่น่าสนใจคือ activity ของโปรตีนชนิด BMP-2 ในการกระตุ้นการสร้าง osteoblastic กับ adipogenic colony นั้นถูกก่อกวนโดยจำนวนของ humoral factors อาทิเช่น insulin, TGF-β, epidermal growth factor (EGF), leukocyte inhibitory factor (LIF), fibroblast growth factor-4 (FGF-4), และ platelet-derived growth factor (PDGF) ปัจจัยอื่นๆ เช่น calcitropic hormone หรือ 1,25-dihydroxyvitamin D3 กระตุ้นการชักนำของ osteoblast characteristics โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ซึ่งอาจควบคุมการสร้างเซลล์ [44]



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ proliferation และ differentiation ใน osteoblast culture model ในระยะต้นของการเพาะเลี้ยง พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ proliferation เช่น ยีน histone H4, c-fos, TGF-β และ AP-1 มีการแสดงออกในระยะแรก ขณะที่ยีนสร้าง matrix เช่น ยีน fibronectin (FN) และ type I collagen (COL) เริ่มมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ต่อเนื่องมายังกระบวนการ matrix maturation เมื่อกระบวนการ proliferation หยุดลง จึงเริ่มมีการแสดงออกของยีน alkaline phosphatase (ALP) และ matrix glutamic acid containing protein (MGP) ในระยะสุดท้ายของกระบวนการ differentiation เข้าสู่กระบวนการ matrix mineralization จึงมีการแสดงออกของยีน osteopontin (OPN) และ osteocalcin (OCN) [45]

ขณะที่เซลล์ osteoprogenitors ถูกจำกัด lineage potential เพื่อที่จะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ และเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts เท่านั้น โดยผ่านขั้นยับยั้งการเจริญ (growth arrest) และสร้าง collagenous extracellular matrix (ECM) โดยการเพาะเลี้ยงทั้งในเซลล์ primary osteoblasts และในเซลล์ nontransformed osteoblast cell lines นั้นมีการแสดงออกของ differentiation markers ที่ชัดเจนตามลำดับเวลาดังรูปที่ 10 ยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น ยีน H4 histone, c-fos และ TGF-β นั้นมีการแสดงออกมากในระยะต้น ระหว่างที่เริ่มมีการ encode propeptide ของ type I collagen ในระยะต้นของการสะสม collagen matrix ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีนตามลำดับ (sequential expression) ในโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ

differentiation เช่น alkaline phosphatase, PTH/PTHrP receptor, bone sialoprotein, และ osteocalcin รูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งคล้ายคลึงกันนี้พบได้ทั้งในแบบ in vivo และในแบบ organ culture ของเซลล์ osteoprogenitors เพื่อเปลี่ยนเป็นกระดูกนั้นมีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงมาก และมีการแสดงออกของ bone-specific protein ในระดับต่ำ ขณะที่เซลล์ osteoblasts บนพื้นผิวกระดูกนั้นหยุดการแบ่งตัวและผลิต bone-specific ECM เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นแบบจำลองที่สมบูรณ์สำหรับอธิบายการควบคุมกระบวนการ transcription ในเซลล์ osteoblasts โดยการเปลี่ยนแปลงของ mesenchymal stem cells ไปเป็น osteoprogenitors รวมทั้งมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้าง ECM อีกด้วย [44]

ในระยะของการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ MSCs ไปเป็นเซลล์ osteoblasts สามารถตรวจสอบได้โดยตรวจวัดโปรตีนบ่งชี้จำเพาะ (marker) เช่น alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, osteopontin เป็นต้น ALP เป็น metalloenzyme บนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ phosphomonoesters ที่ pH เป็นด่าง ซึ่ง ALP สร้างโดยเซลล์ osteoblasts และเซลล์ neutrophilic granulocytes โดยมีความสำคัญต่อกระบวนการ bone formation และกระบวนการ mineralization เนื่องจาก ALP เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการศึกษาการเจริญพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก การซ่อมแซมกระดูกหัก และเมแทบอลิซึมของกระดูก ปัจจุบันสามารถตรวจสอบ ALP ได้หลายวิธี เช่น immunohistochemistry ใน decalcified frozen bone (หรือ cartilage) section และใน ethylmethacrylate-embedded undecalcified bone section [22]

Alkaline phosphatase เป็นตัวที่ใช้บ่งชี้ osteoblastic phenotype ที่แพร่หลายและสามารถตรวจวัดได้ง่าย สามารถพบ ALP ระดับสูงในเซลล์ preosteoblasts และเซลล์ osteoblasts ในเซลล์เพาะเลี้ยง (in vitro) ALP อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ osteoblasts และเกาะกับ phosphatidyl inositol (PI) phospholipid complex ด้วยพันธะโควาเลนต์ จึงสามารถปล่อยออกจากเซลล์โดยใช้เอนไซม์ PI-specific phospholipase C เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น osteoblasts มีรูปร่างลักษณะเป็น cuboid และติดสีน้ำตาลแดงจากการย้อมดู ALP แสดงว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีน ALP และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts ตามลำดับ [11]

เทคนิควิธีที่ใช้ในการตรวจสอบตัวบ่งชี้ของเซลล์ osteoblasts (osteoblastic markers) สรุปได้ดังนี้

Markers	Methods
1.Alkaline phosphatase (ALP)	Histochemistry (azo-dye coupling) Total enzyme activity Immunohistochemistry Northern blot analysis/ RT-PCR/ In situ hybridization (ISH)
2. PTH receptor / Responsiveness	Radioimmunoassay (RIA)/ EIA for cAMP Northern blot analysis/ RT-PCR/ ISH for PTH / PTHrP receptor mRNA
3. Osteocalcin	RIA Immunohistochemistry Northern blot analysis/ RT-PCR/ ISH
4. Other matrix protein	Immunohistochemistry Western blot analysis Northern blot analysis/ RT-PCR/ ISH

ตารางที่ 1 แสดงเทคนิควิธีที่ใช้ในการทดสอบ osteoblastic markers ในเซลล์ osteoblasts [11]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ต้นกำเนิด

เซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติหลายอย่างคือสามารถเจริญเติบโต (proliferate) และกลับเป็นเซลล์ของตนเองได้ (self-renewal) ในขณะเดียวกันก็พัฒนาปรับเปลี่ยนแบ่งตัวเป็นเซลล์ลูกหลาน (daughter cells) ได้ แบ่งเป็นสองชนิดใหญ่ๆ คือ embryonic stem cells และ adult stem cells ลักษณะการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดมีหลายชนิดเช่น (1) totipotent stem cells คือสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ได้ทั้งหมด ได้แก่ zygote (2) pluripotent stem cells คือสามารถพัฒนาเป็นพหุเซลล์หลายชนิดได้ เช่น embryonic stem cells (3) multipotent stem cells สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น mesenchymal stem cells และ hemopoietic stem cells (4) unipotent stem cells จะพัฒนา (commit) ตัวเองไปเป็นเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น epidermal stem cells และ adult liver stem cells เป็นต้น

Mesenchymal stem cells (MSCs)

ในปี ค.ศ. 1867 Cohnheim พยาธิแพทย์ชาวเยอรมัน เป็นคนแรกที่ได้สังเกตการซ่อมแซมบาดแผล พบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างเลือด ซึ่งเป็นเซลล์จากไขกระดูก มีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมบาดแผล ต่อมาในปี ค.ศ. 1976 Frieden Stein พบหลักฐานว่าไขกระดูกมีเซลล์ MSCs อยู่ และต่อมามีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มได้ศึกษาเซลล์ MSCs และพัฒนาให้มีบทบาทสำคัญในการสร้างเลือด (hematopoiesis) และพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นๆ ได้อีกด้วย [23]

bone marrow stroma เป็นแหล่งใหญ่ของเซลล์ MSCs ในมนุษย์ การเจาะไขกระดูกบริเวณ Iliac crest จะเหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์ MSCs ด้วยการนำมาปั่นด้วย Percoll หรือ Ficoll density gradient เซลล์ MSCs เมื่อนำมาเพาะเลี้ยง จะให้ผลบวกต่อ SH-2, SH-3, transferring receptor (CD71), hyarulonic receptor (CD44), integrinα1 (CD29) และให้ผลลบต่อ lipopolysaccharide receptor (CD141), Leukocyte common antigen (CD45) และ hematopoietic stem cell marker (CD34) ยืนที่แสดงออกถึงลักษณะเฉพาะของ Bone marrow derived MSCs มีดังนี้ [23]

ชนิดของ Marker	คุณลักษณะ
specific antigens	SH2, SH3, SH4, STRO-1, α-smooth muscle actin, MAB1740
extracellular matrix	collagen type I, III, IV, V, VI, proteoglycans, fibronectin, hyarulonan, laminin
growth factor & cytokines	Interleukins: α1, 6, 7, 8, 11, 12, 14, and 15 LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
growth factor & cytokine Receptors	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, PDGFR, TNF-IR, TNF-IIR, TGFβ- IR, TGFβ- IIR, IFN-γR, 6FGFR, EGFR, LIFR, G-CSFR, S-CFR, Transferrin
adhesion molecules	Integrins: αvβ3, αvβ5 Integrin chains: α1, α2, α3, α4, α5, αv, β1, β3, β4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selectin, endoglin, CD44

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของ marker และการแสดงออกของยีน specific antigens, cytokine receptors, adhesion molecules, production of cytokines และ matrix molecules ของ bone marrow derived MSCs [24]

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือสารกระตุ้นเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์ (functional proteins) ได้แก่ growth factors, cytokines, signaling molecules, transcription factors และตัว effector อื่นๆ เป็นต้น ได้มีผู้พบว่า growth factor ของ TGF-β superfamily มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของ endochondral bone formation และกระบวนการ healing ของ callus ที่หัก BMPs เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (signalling molecules) ที่สำคัญอันหนึ่ง ในการพัฒนาของ limb bud ในระหว่างการเจริญเติบโตของ embryo การสร้างกระดูก ectopic bone และกระบวนการ differentiation ของ MSCs ไปเป็นเซลล์ osteoblasts และเซลล์ chondrocytes [23]

BMPs เป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของ TGF-β เดิมเรียกชื่อว่า osteogenic protein (OP1) BMPs เป็น pleotropic protein ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น mediator ที่ละลายน้ำ ของการเกิด morphogenesis ของเนื้อเยื่อ มีความสำคัญต่อการควบคุมกระบวนการ differentiation ของกระดูกอ่อนและกระดูก ทั้งในระยะตัวอ่อนและหลังคลอด เนื้อเยื่อที่แสดง mRNA ของการสังเคราะห์โปรตีน BMPs พบได้ในไต หัวใจ ปอด ลำไส้เล็ก และในฟัน [23]

DNA microarray

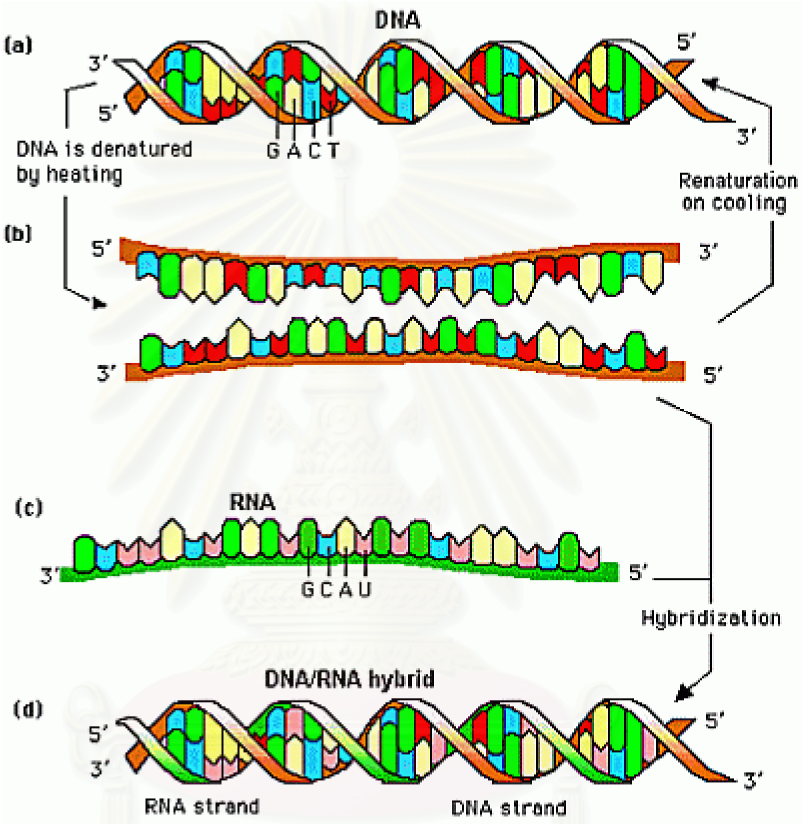
DNA microarray เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งสามารถใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้งจีโนมก็ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

ในปัจจุบัน DNA microarray เป็นเทคนิควิธีที่มีบทบาทอย่างมากในการศึกษาทางอณูชีววิทยา เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและสามารถบอกถึงการแสดงออกของยีนที่จำเพาะได้ ไม่เพียงแต่ประโยชน์ทางด้านการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ยังรวมถึงงานทางด้านการศึกษาวิจัยซึ่งทำให้ทราบหน้าที่ของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเพื่อนำไปสู่การพยากรณ์โรค การรักษา และวางแผนการป้องกันโรค เป็นต้น

หลักการของ DNA microarray

เป็นการตรวจหา mRNA ทั้งหมดในเซลล์ โดยการสกัด mRNA ออกจากเซลล์แล้วเปลี่ยนให้เป็น cDNA สายเดี่ยวโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ซึ่งขั้นตอนนี้เราสามารถติดฉลาก cDNA ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ให้สีต่างกันจากเซลล์ต่างชนิดกัน แล้วนำ cDNA สายเดี่ยวที่ต้องการศึกษาไปจับกับ probe ที่ทราบลำดับเบสซึ่งติดอยู่บนสไลด์แก้ว ลักษณะของ probe มีอยู่ 2 แบบคือ แบบที่หนึ่งคือ DNA ที่เป็น oligonucleotide สายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้น และแบบที่สองคือ cDNA สายเดี่ยว หรือ PCR product ซึ่งหลังจากการสังเคราะห์ขึ้นมาแล้วนำ cDNA ไปจับอยู่บนฐานที่เป็นแก้ว (ไสลด์แก้ว) ซึ่งวิธีนี้สามารถนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนได้ นอกจากนี้ยังมีการติดฉลากใน cDNA ที่ต้องการศึกษา ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ต่างสีกัน เช่น สีแดงกับสีเขียว แล้วนำ cDNA ทั้งสองชนิดมารวมกันแล้วทำการ hybridization และตรวจสอบการจับกันของ DNA ที่เป็นเบสคู่สมกันแต่ละจุดว่าจุดใดเกิดสีบ้างโดยการอ่านด้วยเครื่อง ซึ่งจะอ่านแผ่น microarray สองครั้ง ครั้งแรกอ่านสีแดงและต่อมาอ่านสีเขียวแล้วเอาผลการอ่านสองครั้งมารวมกัน ซึ่งสีที่ได้จะบ่งบอกถึงเซลล์ว่ามีการแสดงออกของยีนนั้นๆ ถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของยีนนั้นเท่าๆ กัน อาจสันนิษฐานได้ว่ายีนที่เป็นสีเหลืองนั้นเป็นยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับยีนที่เราสนใจ จากการศึกษาดังกล่าวทำให้สามารถบอกได้ว่าเซลล์ใดมีการทำงานของยีนใดมากหรือน้อยกว่าเซลล์อีกชนิดที่ศึกษา

เนื่องจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะมีการสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงใช้เทคนิค DNA microarray เพื่อศึกษาถึงยีนที่จำเพาะต่อการแสดงออกของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดในแต่ละระยะของการสร้างเนื้อเยื่อได้ อีกทั้งยังสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) หรือเปรียบเทียบการแสดงออกของเซลล์ระหว่างภาวะก่อนการติดเชื้อและภายหลังการติดเชื้อได้



รูปที่ 11 แสดงการ hybridization ของกรดนิวคลิอิก (DNA หรือ RNA)

การสร้าง cDNA library โดยเทคนิค PCR

การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA เป็นกระบวนการที่ต้องการความละเอียดรอบคอบและต้องระมัดระวังมาก เนื่องจาก mRNA จะถูกย่อยสลายไปได้ถ้ามีการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNAse RNA ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกว่าร้อยละ 90 เป็นชนิด rRNA และชนิด tRNA ซึ่งส่วนที่เป็น mRNA จะมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นเมื่อนำมาใช้สังเคราะห์ cDNA ผลผลิตของ cDNA ที่ได้ก็ยิ่งต่ำลงไปอีก และอาจจะได้ cDNA ไม่ครบตามชนิดของ mRNA โดยเฉพาะ mRNA ชนิดที่มีปริมาณน้อย ในเนื้อเยื่อนั้นจึงมีการนำเอาเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการสร้าง cDNA library ซึ่งจะทำให้ผลผลิตของ cDNA สูงขึ้นและสามารถเตรียม cDNA library ที่สมบูรณ์ได้ง่ายขึ้น ดังนี้

การสร้าง cDNA library โดยใช้เทคนิค PCR นั้น ทำโดยการแยก RNA ทั้งหมดจากเนื้อเยื่อและใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยไม่จำเป็นต้องแยก mRNA จาก RNA ทั้งหมดก่อน เนื่องจาก mRNA ของเซลล์ยูคาริโอตจะมีปลาย 3' เป็นเบส A จำนวนมาก ดังนั้นการสังเคราะห์ cDNA จึงใช้เบส T (oligo dT) เป็น primer โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้วจึงใช้เอนไซม์ terminal transferase เติมเบส G เข้าที่ปลาย 3' ทั้งสองด้าน แล้วย่อย RNA ออกโดยใช้ด่างหรือใช้เอนไซม์ RNAse H เหลือเฉพาะ cDNA สายเดียว แล้วจึงใส่ primer สำหรับทำ PCR 2 ชนิดคือ ลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ทางด้าน 5' ต่ออยู่กับเบส Cสายสั้นๆ ทางด้าน 3' และลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ NotI ทางด้าน 5' ต่ออยู่กับเบส C สายสั้นๆ ในรอบที่ 1 จะมีการสังเคราะห์ cDNA สายที่ 2 โดย primer ชนิดแรก ได้ DNA ที่เป็นเกลียวคู่ และในรอบต่อไปจะมีการเพิ่มปริมาณ DNA เกลียวคู่นี้โดยเอนไซม์ EcoRI และ NotI บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มเข้าไปที่ปลายของ cDNA จะช่วยให้การสอดใส่ DNA เข้าไปในเวคเตอร์เพื่อสร้าง library สะดวกขึ้น cDNA ที่สร้างขึ้นโดยวิธีนี้จะมาจาก mRNA ทุกชนิดที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเป็น library ที่สมบูรณ์

สารที่นำมาใช้ติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสีมีหลายชนิด เช่น สารพวก biotin อนุพันธุ์ของ biotin หรือ fluorescein เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะใช้ติดฉลากโดยทำให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ก่อน เช่น biotin-16-dUTP แล้วเติมเข้าไปในสาย DNA หรือ RNA โดยใช้เอนไซม์ต่างๆ ตามวิธีเดียวกับการใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่นวิธี random primer หรือใช้เอนไซม์ RNA polymerase การติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีนั้นอาจจะใช้สารประกอบที่โมเลกุลคล้ายกับ biotin แต่สามารถเชื่อมกับโมเลกุลของ DNA หรือ RNA ได้โดยตรงเมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยแสงสว่างที่เหมาะสม เช่น photobiotin การติดฉลากจึงไม่ต้องใช้เอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวมา

เมื่อติดฉลากด้วยสารเหล่านี้แล้ว เวลาที่ต้องการตรวจสอบ สำหรับ biotin จะตรวจสอบโดยทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ avidin หรือ streptavidin ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ สำหรับ fluorescein จะตรวจสอบโดยนำมาทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดีที่จำเพาะที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ แล้วจึงทดสอบโดยดูจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อีกทีหนึ่ง เอนไซม์ที่ใช้กันมากคือ alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งทดสอบได้โดยทำปฏิกิริยากับสาร 5' bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) และ nitro blue tetrazolium (NBT) ทำให้เกิดสารสีฟ้า หรือเอนไซม์ horseraddish peroxidase (HRP) ซึ่งทดสอบได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ 4-chloro-1-napthol ได้สารสีม่วง

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยา PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง จากปริมาณ DNA template เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล ปฏิกิริยา PCR คิดค้นพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 และได้รับรางวัลโนเบล สาขาเคมีในปี ค.ศ. 1993

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญ ดังนี้

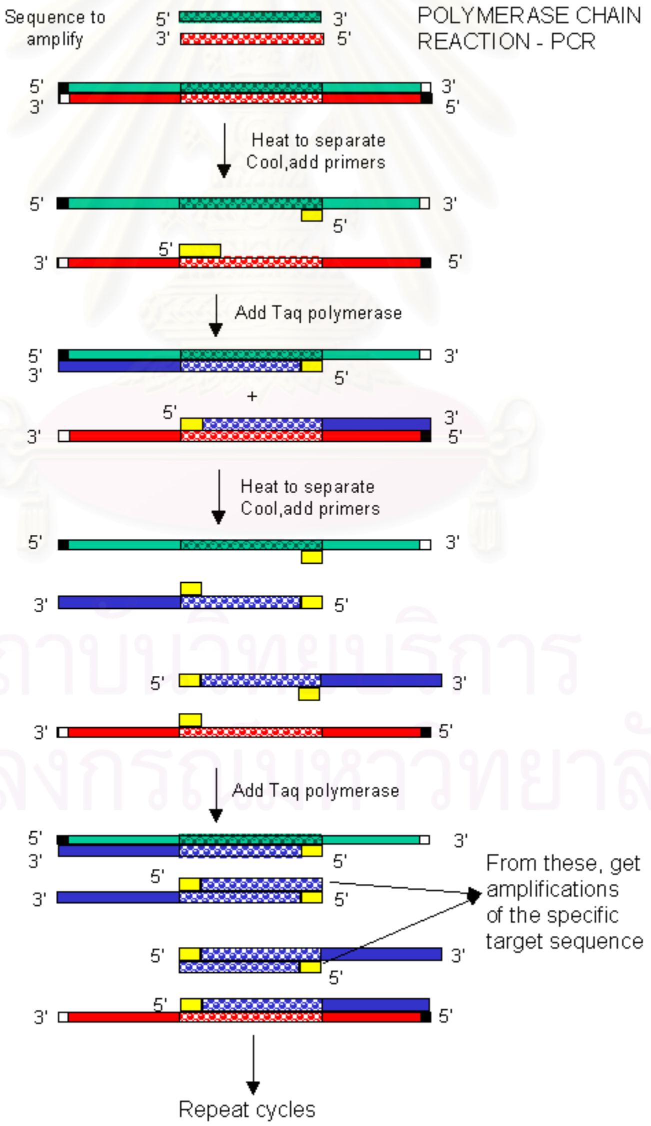
1) DNA template เป็น DNA ที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือ สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และเป็น DNA ที่ทราบลำดับเบสแล้ว
2) Primer เป็น DNA สายเริ่มต้นขนาดสั้น มีความยาวประมาณ 18 – 25 เบส จำนวน 2 สาย สายหนึ่งเรียกว่า forward primer อีกสายหนึ่งเรียกว่า reverse primer แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3’ ของสาย DNA template แต่ละสาย โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้าง (flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน primer ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ DNA (DNA synthesizer)
3) Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) คือ เบสที่จะถูกนำเข้าไปต่อจากสาย primer ระหว่างการสังเคราะห์ DNA ทำให้ได้ DNA สายใหม่ มี 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น 20-200 µM
4) เอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* DNA polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 $^{\circ}C$ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือประมาณ 72 $^{\circ}C$
5) $MgCl_2$ เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase โดยที่ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะมีผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก เนื่องจากความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เปลี่ยนไปจะทำให้ได้ PCR product ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะใช้ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.5 - 2.0 mM
6) Buffer เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย Tris HCl, KCl แลพ $MgCl_2$
7) น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1) การแยกสาย DNA ต้นแบบ (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อให้ DNA คลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ DNA

2) การจับของสาย primer (primer annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-65 °C เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อให้ primer เข้าจับกับ DNA template ในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

3) การสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยการต่อสาย primer (primer extension) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 70-75 °C เป็นเวลา 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C และ G) ที่เข้าคู่กับ DNA template มาต่อเข้าที่ปลายของสาย primer ทั้งสองเพื่อให้ได้ DNA สายใหม่



รูปที่12 แสดงหลักการเพิ่ม DNA สายคู่อย่างจำเพาะด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction [46]

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนหลักรวมเรียกว่า 1 รอบ PCR (PCR cycle) เกิดขึ้นโดยนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ (thermal cycler) ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ

ปฏิกิริยา PCR จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ในรอบต่อๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นผลผลิต DNA ที่ได้จึงเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า “exponential amplification” ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) ตัวอย่างเช่น ถ้าทำปฏิกิริยา 35 รอบ จะมีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้นเป็น 2^{35} หรือประมาณ 34 พันล้านเท่าของปริมาณ DNA เริ่มต้น ปฏิกิริยาทั้งหมดใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง

ผลผลิต DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ตรวจสอบได้โดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ใน agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นวุ้นนี้ไปย้อมด้วยสีย้อม DNA เช่น ethidium bromide (EtBr) ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถสอดแทรก (intercalation) เข้าไปในช่องว่างระหว่างเกลียวคู่ของ DNA และมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง UV ดังนั้นเมื่อนำแผ่นวุ้นนี้ผ่านการย้อมสีแล้วไปส่องบนเครื่องกำเนิดแสง UV (UV transilluminator) จะปรากฏเป็นแถบ DNA สีส้มขึ้นมา ซึ่งทำให้ทราบขนาด (product size) ของ DNA ที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบขนาดกับ DNA marker จากนั้นบันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์ หรือด้วยเครื่องบันทึกภาพถ่ายอัตโนมัติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานของ Hosny M และคณะ (1985) ได้ทดสอบการชักนำการสร้างกระดูก (osteoinductivity) ของ DBM ที่ปลูกถ่ายลงในลิงจำนวน 4 ตัว แล้วทำการตัดชิ้นเนื้อมาศึกษาเมื่อเวลาผ่านไป 20, 40 และ 72 วัน และนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในวันที่ 20 พบว่ามี mesenchymal cells และ fibroblast-like cells จำนวนมากล้อมรอบ และภายใน DBM particle ที่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างในวันที่ 40 พบว่ามีการสร้างกระดูกอ่อนได้ โดยเมื่อสังเกตว่าเริ่มมี chondroid bone ปรากฏขึ้น และในวันที่ 72 พบลักษณะของ mature bone กับ immature bone จึงได้ข้อสรุปในเบื้องต้นว่า DBM สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (bone formation) ในสัตว์ทดลองได้ [25] นอกจากนี้การศึกษาของ Andrases และคณะ (2001) รายงานว่าเมื่อนำเซลล์จากไขกระดูก bone marrow stromal stem cells (BMSC) มาผสมรวมกับ DBM สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ทั้งในเซลล์ทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) ซึ่งไขกระดูกประกอบไปด้วยเซลล์ตั้งต้น (pluripotent cells) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประเภทต่างๆ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เอ็น ไขมัน และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเป็นต้น [26]

Shuan Zhou และคณะ (2004) ได้รายงานการศึกษาผลของ DBM และ BMP-2 ในการชักนำ human dermal fibroblast (hDF) ที่เพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (chondrogenic differentiation) โดยทำการทดสอบผลของ DBM ต่อการแสดงออกของ signaling gene ใน TGF-β/BMP pathway โดยทำการแยกสกัด RNA จาก hDF ที่ได้รับ DBM และไม่ได้รับ DBM หลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปได้ 3 วัน และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิควิธี microarray และ RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) พบว่า DBM และ BMP-2 มีผลต่อการควบคุม multiple signaling pathway ของ hDF ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน เช่น TGFBI/βig-h3, Col3A1, TIMP1 เป็นต้น [27]

การศึกษาของ George R. Beck, Jr. และคณะ (2001) [28] เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลง gene expression ของ osteoblasts ใน MC3T3-E1 cell line ที่ได้จากกระดูกส่วน calvaria ของหนู เปรียบเทียบกับ NIH3T3 cell line โดยนำ MC3T3-E1 cell line มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-minimum essential medium (α-MEM) ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum (FBS) ร่วมกับ ascorbic acid และ β-glycerol phosphate จากนั้นทำการแยก RNA จากเซลล์ทั้งสองชนิด ในวันที่ 0, 3, 7, 14, และ 21 จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลง gene expression ด้วยวิธี

gene array analysis ระหว่าง MC3T3-E1 cell line ที่ได้รับ differentiation medium และ NIH3T3 cells พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ควบคุมการสร้างกระดูก นอกจากนี้จากการศึกษาของ Hwai-Shi Wang และคณะ (2004) พบว่า mesenchymal stem cells ซึ่งได้จาก Wharton's jelly สามารถแสดงลักษณะเป็นเซลล์ osteoblasts ได้เช่นกัน [29]

จากงานวิจัยของ Shuanhu Zhou และคณะ (2005) ได้รายงานการใช้ DBM ชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกอ่อน (chondrogenesis) ของ human dermal fibroblasts (hDFs) ซึ่งเพาะเลี้ยงใน DBM ซึ่งผสมอยู่ใน collagen sponge system โดย DBM ที่ได้จาก human marrow stromal cells (hMSCs) จาก 3-D collagen sponge culture ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ chondrogenesis หรือ osteogenesis ภายใต้สภาวะของเซลล์เพาะเลี้ยง โดยประเมินผลของ DBM จาก hMSC ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกอ่อน กับการแสดงออกของ chondrocyte specific genes เช่น AGGRECAN, COL II และ COL X การวิเคราะห์ด้วยวิธี macroarray analysis แสดงให้เห็นว่า DBM กระตุ้นการแสดงออกของยีนในกลุ่มซึ่งควบคุมวิถี TGF-β/BMP signaling pathway ในเซลล์ hDFs โดย DBM ชักนำ hMSC ให้มีการแสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast phenotype) เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งมี osteogenic supplement โดยงานวิจัยนี้สนับสนุนว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ hMSC ร่วมกับ DBM ที่ผสมอยู่ในโครงร่าง collagen scaffold สามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อน หรือกระดูกได้ในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) [30]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากร (target population) มารดาที่ตั้งครรภ์และได้คลอดบุตร

ประชากรกลุ่มตัวอย่าง (sample population) มารดาที่ตั้งครรภ์และมารับการทำคลอดที่แผนกสูตินารีเวชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria) มารดาที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่พบว่าเป็นโรค มีอายุครรภ์ครบตามกำหนดคลอด

เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) มารดาที่สุขภาพไม่แข็งแรง มีโรคประจำตัว คลอดก่อนกำหนด

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

1.1 Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)

1.2 Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)

1.3 Balance (Sartorius)

1.4 Beaker : 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.5 Centrifuge, refrigerated centrifuge (Beckman, USA)

1.6 Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)

1.7 Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)

1.8 CO_2 cell culture incubator (Forma Scientific, England)

1.9 Cuvette 80-100 μl

1.10 Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.11 Digital Timer

1.12 DNA Thermal cycler (Thermo Hybaid, USA)

1.13 Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)

1.14 Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

1.15 Forceps, operation blade

1.16 Freezer -80°C (Forma Scientific, USA)

1.17 Fume Hood (Newlab, USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.18 Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)

1.19 Hemocytometer, cell counter (Boeco, Germany)

1.20 Hybridization oven (HYBAID)

1.21 Laminar flow hood (Gelman Science)

1.22 Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)

1.23 pH meter (Eutech Cybernataics)

1.24 Phase contrast light microscope (Olympus, Japan)

1.25 Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)

1.26 Pipette rack (Autopack, USA)

1.27 Plate Reader (Multiascent, USA)

1.28 Power supply model

1.29 Reagent bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)

1.30 Refrigerator (Sanyo, Japan)

1.31 Sonicator

1.32 Spectrophotometer (BIO-RAD, USA)

1.33 Stirring-magnetic bar

1.34 Test tube racks

1.35 Thermometer (Precision, Germany)

1.36 UV Transilluminator (Fotodyne, USA)

1.37 Vortex mixer (Scientific Industry, USA)

1.38 Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

1.39 Water bath, Thermostat shaking (Memmert, Germany)

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 Cell Scraper (Corning, USA)

2.2 Clorox

2.3 Cryovial tube (Corning, USA)

2.4 Cell culture flask : T25, T75 (Falcon, USA)

2.5 Disposable gloves

2.6 Glass pipette : 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BIO-RAD, USA)

2.8 Microscope glass cover slips (Chance, England)

2.9 Needle, sterile (Nipro)

2.10 Parafilm (American National Can, USA)

2.11 Pipette tip : 10 μl, 200 μl, 1,000 μl (AxyGen, USA)

2.12 Plastic wrap

2.13 Polypropylene conical tube,sterile : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)

2.14 PCR marker (Bio-Rad, USA)

2.15 Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)

2.16 Syringe disposable (Nipro, Japan)

2.17 6-well plate, 24-well plate, 96-well plate (corning, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 สารเคมีทั่วไป

3.1.1 Absolute ethanol (Merck, USA)

3.1.2 Acetic acid glacial (Merck, USA)

3.1.3 Agarose molecular biology grade (Sigma, USA)

3.1.4 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma, USA)

3.1.5 Bovine Serum Albumin (Sigma, USA)

3.1.6 Bromophenol blue (Sigma, USA)

3.1.7 3,3'- diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride (BIO BASIC, Inc., Canada)

3.1.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.1.9 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, USA)

3.1.10 EDTA (M & B laboratory chemicals)

3.1.11 Ethidium bromide (Sigma, USA)

3.1.12 Fetal Bovine Serum (Hyclone, USA)

3.1.13 Formaldehyde (Sigma, USA)

3.1.14 Formamide (Sigma, USA)

3.1.15 Glycerol (Pharmacia Amersham)

3.1.16 Hydrochloric acid (Merck, USA)

3.1.17 Hydrogen peroxide (Siribuncha, Thailand)

3.1.18 β-Mercaptomethanol (2- Mercaptomethanol) (Sigma, USA)

3.1.19 α-MEM with L-Glutamine (Hyclone, USA)

3.1.20 MPOS (Sigma, USA)

3.1.21 Para-nitrophenol (pNP) (Sigma, USA)

3.1.22 Para-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma, USA)

3.1.23 Pennicillin/Streptomycin (Sigma, USA)

3.1.24 Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse antibody (DAKO)

3.1.25 Phosphate buffer saline (PBS)

3.1.26 SDS (Sigma, USA)

3.1.27 Sodium chloride (Sigma, USA)

3.1.28 Sodium citrate (Mallinckrodt)

3.1.29 Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethane) (USB corporation, USA)

3.1.30 Triton X 100 (Sigma, USA)

3.1.31 Trypan blue (Sigma, USA)

3.1.32 Trypsin (Sigma, USA)

3.2 สารเคมีสำหรับทำ RT-PCR

3.2.1 PCR buffer

3.2.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.2.3 Oligonucleotide primers (BSU, Thailand)

การเก็บรวบรวมข้อมูล

<u>วิธีการเก็บตัวอย่าง</u>

ทำการเก็บชิ้นส่วนของสายสะดือรกขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ภายหลังจากที่ทำการคลอดบุตรแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุดเพื่อทำการแยกเซลล์ Wharton's jelly derived cells จากเนื้อเยื่อสายสะดือรกด้วยวิธี primary culture

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

การแยกเซลล์และเลี้ยงเซลล์ไลน์จากสายสะดือรก

นำสายสะดือรกที่ได้จากการผ่าตัดทำคลอดทารกจากมารดาที่ให้ความยินยอมในการวิจัย (informed consent) จากนั้นทำการเลาะหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงที่พันอยู่ในสายสะดือออกด้วย sterile blade จนได้เนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly นำมาล้างเลือดที่ติดอยู่กับ tissue ด้วย cell culture medium ชนิด α-MEM (Gibco BRL) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ penicillin 200 units/ml และ streptomycin 100 μg/ml แล้วนำมาตัดให้ได้ชิ้นส่วนขนาดเล็กประมาณชิ้นละ 1 mm x 1 mm แล้วนำมาวางบนพื้นผิวของ tissue culture flask ขนาด T-25 และเลี้ยงเซลล์ใน α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum (FBS) กับ penicillin (100 unit/ml)/streptomycin (50 μg/ml) แล้วทำการเพาะเลี้ยง (incubate) ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C

เมื่อเซลล์แยกออกจากส่วนของเนื้อเยื่อและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนจนเหมาะสม (outgrowing cells) ทำการเก็บรวบรวมเซลล์ โดยการทำให้เซลล์หลุดลอกออกจากจานทดลองด้วยสารละลาย 0.025% trypsin และนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม เมื่อเซลล์ Wharton's jelly derived cells เจริญและเพิ่มจำนวนจนใกล้เต็มจานทดลอง (confluence) ก็ทำการแบ่งจำนวนเซลล์เพื่อย้ายลง T-75 flask โดยใช้อัตราส่วนการแบ่งเซลล์ (split ratio) ที่ 1:4 จากนั้นเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง (continually passaged) จนกระทั่งได้จำนวนที่พอเพียงจึงนำมารวมเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งด้วยความเย็น (cryopreserve) และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทำการศึกษาในภายหลัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การเตรียมกระดูกซึ่งผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (DBM preparation)</u>

นำชิ้นส่วนกระดูกที่ได้รับบริจาค มาแยกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ที่ติดโดยรอบออกให้ได้มากที่สุด จากนั้นขจัดไขมันที่ติดอยู่ในกระดูกออก โดยแช่ไว้ในสารละลาย 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) ล้างออกให้หมดด้วย dH_2O จำนวนมากหลายรอบ แล้วเทน้ำออกให้ได้มากที่สุด นำตัวอย่างไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 $^{\circ}C$ จนแห้งและกลายเป็นน้ำแข็งทั้งหมด นำไปทำให้แห้งโดยใส่ในเครื่อง lyophilizer freeze dryer ที่อุณหภูมิ -55 $^{\circ}C$ และดูดอากาศภายใน chamber ออกให้หมดทิ้งไว้ข้ามคืน

เมื่อตัวอย่างกระดูกแห้งสนิทดีแล้ว นำมาทุบให้ได้ขนาดไม่เกิน 5 มม. แล้วนำไปปั่นให้ได้เป็นผงกระดูกขนาดเล็ก (ground bone matrix) ด้วยเครื่องปั่นที่ใช้รู sieve ขนาด 1,000 micron โดยทำการหล่อเย็นตัวอย่างด้วย liquid nitrogen เมื่อปั่นเสร็จ นำผงกระดูก (ground bone matrix) ที่ได้มาทำการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralization) โดยนำไปใส่ใน diluted hydrochloric acid (0.5 N HCl) ในสัดส่วน 100 mg DBM ต่อ 10 ml 0.5 N HCl เพื่อดึงเอาแร่ธาตุต่างๆ ในกระดูก โดยเฉพาะแคลเซียมออกไป จนได้เป็นเนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix (DBM) หลังจากนำ DBM ออกจากกรดที่เวลา 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แต่ละช่วงเวลาที่นำ DBM ออกจากกรด ให้ล้างเอากรดออกด้วย dH_2O จำนวนมาก หลายรอบ แช่ไว้ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ sterilization แล้วล้างเอา 70% ethanol ออกด้วย dH_2O จำนวนมากหลายรอบ

นำ DBM ที่ได้ทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer freeze dryer อีกครั้ง และเก็บ DBM ที่แห้งสนิทที่อุณหภูมิ -80 $^{\circ}C$ ทำการวัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมที่คงเหลืออยู่ (residual calcium content) ในขั้นต่อไปโดยใช้เทคนิค o-cresolphthalein complexone calcium binding assay (Arsenazo III calcium assay)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชิ้นกระดูกส่วน long bone

↓

เลาะเอาส่วนกล้ามเนื้อและไขมันที่ติดอยู่ออกให้ได้มากที่สุด ล้างด้วย3% hydrogen peroxide

↓

นำมาปั่นด้วยเครื่องบดปั่น ให้ได้ขนาดไม่เกิน 1000 μm

↓

นำมาอยู่ในกรด 0.5 N HCl ปริมาตร 1 L เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนกรด ทุก 1 ชั่วโมง ตักผงกระดูกออกมาบางส่วนที่เวลา 1, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง

↓

ล้างกรดออกด้วย strile dH_2O แช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างด้วย strile dH2O

↓

ทำให้ DBM แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer โดยเปิดเครื่องข้ามคืน ที่อุณหภูมิ -55°C เมื่อแห้งแล้ว เก็บไว้ใน sterile conical tube ที่อุณหภูมิ -80°C

↓

นำ DBM ในแต่ละช่วงเวลามาหาปริมาณแคลเซียมที่คงเหลืออยู่ เทียบกับผงกระดุกที่ไม่ได้อยู่ในกรด และรายงานค่าเป็น% ของปริมาณแคลเซียมที่คงเหลืออยู่เทียบกับตอนต้น

↓

นำ DBM ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลือน้อยที่สุดมา ทดสอบกับเซลล์ที่ต้องการศึกษา

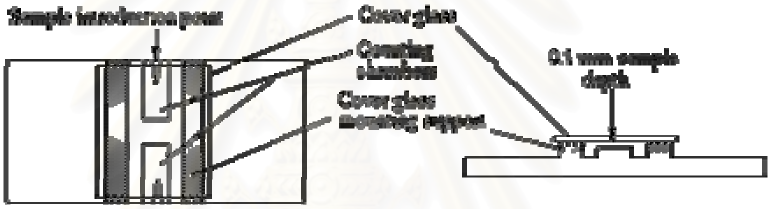
รูปที่ 13 แสดงขั้นตอนการเตรียม Demineralized Bone Matrix

<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์</u>

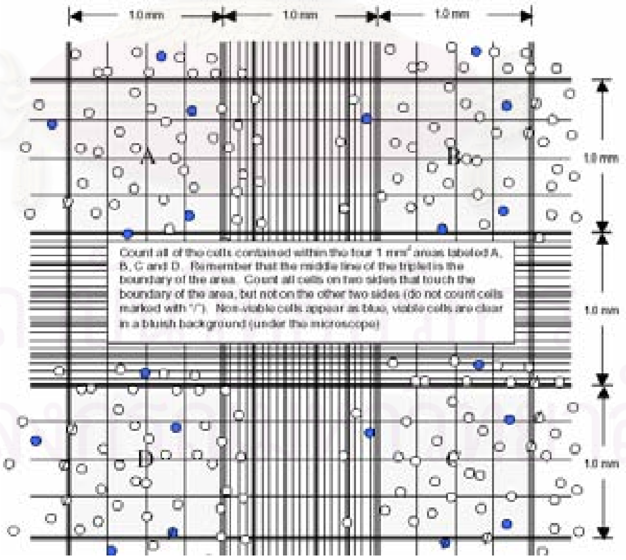
นำเซลล์ Wharton's jelly derived cells ที่แยกได้จากสายสะดือรกมาเพาะเลี้ยงใน tisse culture media (α-MEM) ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS ซึ่งได้รับ DBM จำนวน 5 mg (กลุ่มทดลอง) กับกลุ่มซึ่งเพาะเลี้ยงใน α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS ซึ่งไม่ได้รับ DBM (กลุ่มควบคุม) โดยเพาะเลี้ยงใน T-25 flask ประมาณ 5.0 x 10^5 เซลล์ต่อ flask (หรือ 2.0 x 10^4 เซลล์/ซม.^{2}) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในทั้งสองสภาวะ

<u>การประเมินการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์</u>

ทำการประเมินการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (assessment of cell proliferation) ของเซลล์ Wharton’s jelly derived cells ที่แยกได้จากสายสะดือรก ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันดังที่กล่าวในข้างต้น ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 6-well plates (ประมาณ 1.0×10^4 เซลล์/well) เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน จึงทำการแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงโดยทำให้เซลล์หลุดลอกออกด้วยทริปซิน (trypsinization) inactivate ด้วย medium ที่มีส่วนผสมของ FBS ปริมาตรเท่ากับ trypsin ที่ใส่ นำไป centrifuge เก็บ pellet cell ล้างเซลล์ และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยใช้ hemocytometer ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion test (เซลล์ที่ตายจะติดสีของสารละลาย trypan blue ให้นับเฉพาะเซลล์ที่ไม่ติดสี) จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากทั้งเซลล์ที่เลี้ยงทั้งสองสภาวะด้วย growth curve



รูปที่ 14 แสดงส่วนประกอบของ hemocytometer



รูปที่ 15 แสดงภาพขยายของช่องซึ่งใช้ในการนับเซลล์ของ Hemocytometer โดยนับเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (ไม่ติดสีของสารละลาย trypan blue) ในช่อง A, B, C และ D ตามลำดับ

จากนั้นคิดคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability number) จากสูตร

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี $\times 10^4 \times$ ค่า dilution factor

<u>วิธีการทดสอบ In vitro functional human mesenchymal stem cell Identification</u>

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของ differentiated supplement ต่างๆ

ชนิด	ส่วนประกอบ
Adipogenic Supplement (100X)	hydrocortisone, isobutylmethylxanthine, และ indomethacin
Osteogenic Supplement (20X)	dexamethasone, ascorbate-phosphate, และ □-glycerolphosphate
Chondrogenic Supplement (100X)	dexamethasone, ascorbate-phosphate, proline, pyruvate และ TGF-□3
ITS Supplement (100X)	insulin, transferrin, selenious acid, bovine serum albumin, และ linoleic acid

หมายเหตุ ให้ aliquot และเก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C ยกเว้น Adipogenic supplement เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

ตารางที่ 4 แสดง antibody ที่ใช้ในการตรวจ cell differentiation ชนิดต่างๆ

ชนิด	ส่วนประกอบ
Goat anti-mouse FABP-4 (Fat)	lyophilized goat anti-mouse FABP-4 polyclonal antibody
Mouse anti-human Osteocalcin (Bone)	lyophilized mouse anti-human osteocalcin monoclonal antibody
Goat anti-human Aggrecan (Cartilage)	lyophilized goat anti-human aggrecan polyclonal antibody

ตารางที่ 5 แสดงการเตรียม basal medium ชนิดต่างๆ

α-MEM Basal Medium (Fat and Bone)	Amount	Final Concentration
α-MEM	90 mL	90%
FBS	10 mL	10%
100X Penicillin-Streptomycin-Glutamine	1.0 mL	100 U/mL Penicillin 100 μg/mL Streptomycin 2 mM L-Glutamine

D-MEM/F-12 Basal Medium (Cartilage)	Amount	Final Concentration
D-MEM/F-12	49 mL	99%
ITS Supplement	500 μL	1%
100X Penicillin-Streptomycin-Glutamine	500 μL	100 U/mL Penicillin 100 μg/mL Streptomycin 2 mM L-Glutamine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำ sterile cover slip (นำไป autoclave แล้วเผาไฟ) แล้วใส่ใน 24-well-plates (Costar, Corning NY) จนครบทุกช่อง เติม PBS 0.5 ml ใช้ปลายทิปกด slide ให้จมติดพื้น well incubate ที่ 37 °C จากนั้นดูดเอา PBS ออกทิ้งไป ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นแบ่งเซลล์ Wharton's jelly derived cells เป็น 3 กลุ่ม เพื่อทดสอบการเกิดกระบวนการ differentiation เป็นเซลล์ 3 ชนิด คือ adipocytes, osteocytes, และ chondrocytes แล้วใส่ใน 24-well-plates ดังนี้

1. ทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer ให้ได้จำนวน 4×10^4 เซลล์/well จำนวน 12 ช่อง ที่มี α-MEM basal medium incubate ที่สภาวะ 37 °C, 5%CO_2 รอจนกระทั่งเซลล์ 100% confluent จากนั้นเติม Adepogenic differentiation medium (ผสม Adepogenic supplement 50 μL ใน α-MEM basal medium 5 ml) ปริมาตร 0.5 ml/well จำนวน 10 well และเติม 2% FBS + α-MEM medium ปริมาตร 0.5 ml/well จำนวน 2 well (เป็นกลุ่มควบคุม) ทำการเปลี่ยน Adepogenic differentiation medium ทุก 3-4 วัน จากนั้นนำ slide มาทดสอบในวันที่ 10 และวันที่ 20

2. ทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer ให้ได้จำนวน 8×10^3 เซลล์/well จำนวน 12 ช่อง ที่มี α-MEM basal medium incubate ที่สภาวะ 37 °C, 5%CO_2 รอจนกระทั่งเซลล์ 50-70% confluent จากนั้นเติม Osteogenic differentiation medium (ผสม Osteogenic supplement 250 μL ใน α-MEM basal medium 5 ml) ปริมาตร 0.5 ml/well จำนวน 10 well และเติม 2% FBS + α-MEM medium ปริมาตร 0.5 ml/well จำนวน 2 well (เป็นกลุ่มควบคุม) ทำการเปลี่ยน Osteogenic differentiation medium ทุก 3-4 วัน จากนั้นนำ slide มาทดสอบในวันที่ 10 และวันที่ 20

3. ทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer ให้ได้จำนวน 2.5×10^5 เซลล์/15 ml tube จำนวน 4 หลอด centrifuge ที่ 200 xg 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม D-MEM/F-12 basal medium จากนั้น centrifuge ที่ 200 xg 5 นาทีอีกรอบ ดูด medium เก่าออก จากนั้นเติม Chondrogenic differentiation medium (ผสม Chondrogenic supplement 25 μl ใน D-MEM/F-12 basal medium 2.5 ml) ปริมาตร 0.5 ml หมุนฝาเกลียวเล็กน้อยพอให้มีอากาศแลกปลี่ยนได้ incubate ที่สภาวะ 37 °C, 5%CO_2 ทำการเปลี่ยน Chondrogenic differentiation medium ทุก 3-4 วัน จากนั้นนำ pellet cell มาทดสอบในวันที่ 20 โดยการเขี่ย pellet มาวางบนสไลด์ไอออนบวก ใช้สไลด์อีกอันมาวางทาบแล้ว smear ให้เซลล์กระจายติดอยู่บนสไลด์

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยเทคนิค Chemical staining

การทดสอบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนเป็นเซลล์ adipocytes จริง ทดสอบได้ด้วยการย้อม Oil Red O staining ซึ่งผลบวกจะเห็นเซลล์ติดสีแดง ส่วนการทดสอบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนเป็นเซลล์ osteocytes จริง ทดสอบได้ด้วยการย้อม Von Kossa staining ซึ่งผลบวกจะเห็นเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ

Adipocytes (Oil Red O)	Osteocytes (Von Kossa)
1. Frozen section	1. Deparafinized → dH2O
2. Dipsection in 70% EtOH สักครู่	2. แช่ใน 5% $AgNO_3$ 1 ชั่วโมง
3. ย้อมใน oil red O (ใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันการระเหย) ประมาณ 5 นาที	3. ล้าง dH_2O 2 ครั้ง (เขย่า)
4. ล้างอย่างรวดเร็วใน 70% EtOH (ระวังเซลล์หลุด)	4. แช่ใน Photographic developer solution 2 นาที (เทน้ำยาทิ้ง)
5. ล้างด้วย dH_2O	5. ล้างด้วย dH_2O 2 ครั้ง
6. counterstain ด้วย hematoxylin	6.แช่ในใน 5% sodium thiosulfate solution 5 นาที
7. mount ด้วย glycerol 1 หยด แล้วนำ slide มาวางปิด เช็ดส่วนเกินรอบ slide ด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปส่องกล้อง	7.ล้างใน running tap H_2O 2 นาทีแล้วตามด้วย dH_2O
	8.counterstain ใน nuclear fast red 5 นาที
	9. ล้าง dH2O
	10. ปล่อยจนแห้งสนิท

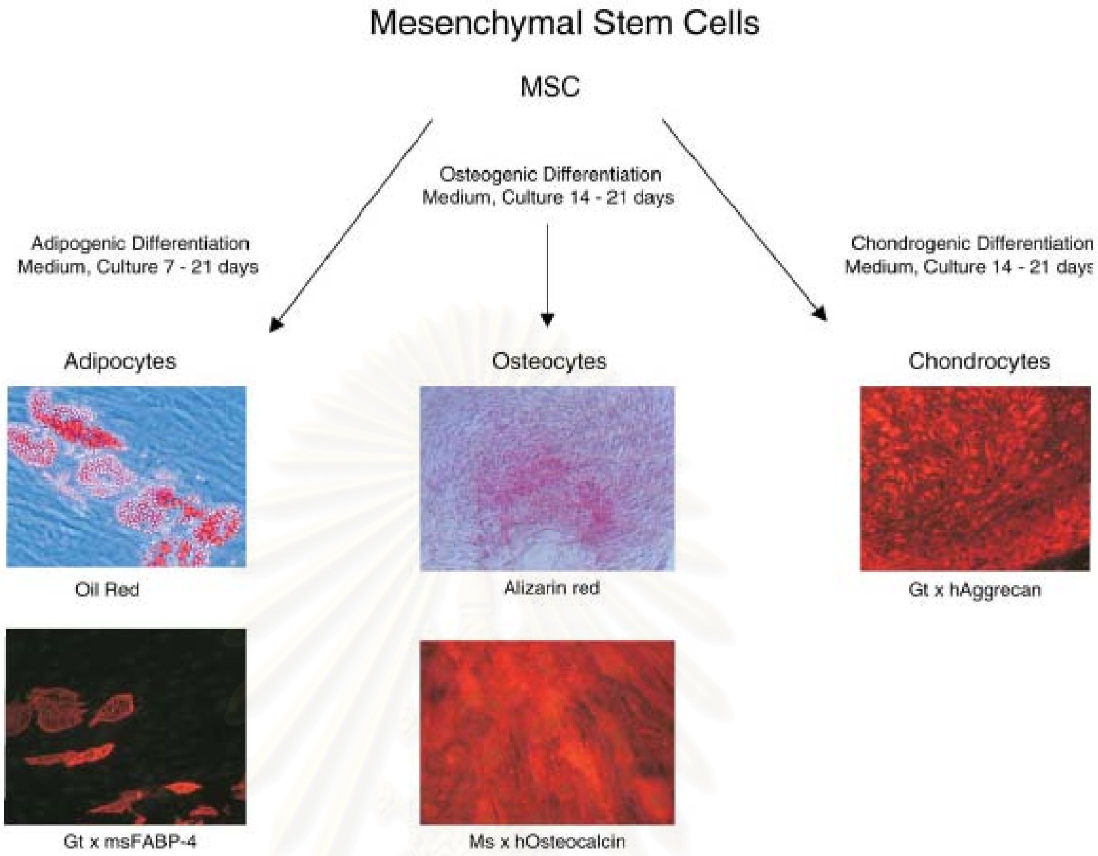
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>กระบวนการ Fixing and staining Procedure (Immunocytochemistry)</u>

การทดสอบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนเป็นเซลล์ adipocytes จริง ทดสอบได้ด้วยการตรวจด้วย FABP-4 Ab การทดสอบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนเป็นเซลล์ osteocytes จริง ตรวจด้วย Osteocalcin Ab ส่วนเซลล์ chondrocytes ตรวจด้วย Aggrecan Ab โดยใช้เอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) conjugate อยู่กับ secondary Ab และให้ diamino benzidine (DAB) เป็น substrate product ที่ได้จะเป็นสีน้ำตาลเข้ม แสดงว่าเกิดผลบวก จากการส่องในกล้องจุลทรรศน์

Adipocytes (FABP-4)	Osteocytes (Osteocalcin)	Chondrocytes (Aggrecan)
1. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS 1 ml		
2. Fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ใน PBS เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง		
3. ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย 1% BSA ใน PBS 0.5 ml เป็นเวลา 5 นาที		
4. Permeabilize and block cells ด้วย 0.01% Triton X 100, 0.1% Normal Horse serum ใน PBS 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที		
5. dilute goat anti-mouse FABP-4 antibody ให้ได้ความเข้มข้น 1 μg/100 μL	5. dilute mouse anti-human Osteocalcin antibody ให้ได้ความเข้มข้น 1 μg/100 μL	5. dilute goat anti-human Aggrecan antibody ให้ได้ความเข้มข้น 1 μg/100 μL
6. หลังจาก blocking เติม goat anti-mouse FABP-4 antibody working solution 300 μL/well incubate เซลล์ 2 ชั่วโมง	6. หลังจาก blocking เติม mouse anti human Osteocalcin antibody working solution 300 μL/well incubate เซลล์ 2 ชั่วโมง	6. หลังจาก blocking เติม goat anti-human Aggrecan antibody working solution 300 μL/well incubate เซลล์ 2 ชั่วโมง
7. wash เซลล์ 3 ครั้งด้วย 1% BSA ใน PBS 0.5 ml ครั้งละ 5 นาที		
8. เติม rabbit anti goat Immunoglobulin (IgG) ที่ conjugate กับ HRP และ incubate 30 นาที	8. เติม goat antimouse Immunoglobulin (IgG) ที่ conjugate กับ HRP และ incubate 30 นาที	8. เติม rabbit anti goat Immunoglobulin (IgG) ที่ conjugate กับ HRP และ incubate 30 นาที
9. wash เซลล์ 3 ครั้งด้วย 1% BSA ใน PBS 0.5 ml ครั้งละ 5 นาที		
10. เติม substrate DAB (diamino benzidine) 10 นาที		
11. ล้างน้ำเปล่าเพื่อหยุดปฏิกิริยา	11. ล้างน้ำเปล่าเพื่อหยุดปฏิกิริยา	11. ล้างน้ำเปล่าเพื่อหยุดปฏิกิริยา
12. counterstain ด้วย hematoxylin เพื่อย้อมนิวเคลียส		
13. mount slide แล้วนำไปส่องดูในกล้องจุลทรรศน์		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบ In vitro functional mesenchymal stem cell identification โดยการชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes เซลล์ osteocytes และเซลล์ chondrocytes

จากรูปที่ 16 การพิสูจน์ว่า MSCs เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes หรือไม่ ทำได้สองวิธี คือการย้อม Oil Red O staining เพื่อดู oil droplet ภายในเซลล์ ซึ่งจะเห็นว่าติดสีแดง หรือตรวจดู FABP-4 บนผิวเซลล์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteocytes ทดสอบโดยการย้อม Alizarin red staining จะเห็นว่าเซลล์ติดสีแดง หรืออาจย้อม Von Kossa staining ก็ได้โดยจะเห็นเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ และตรวจดู Osteocalcin ส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ chondrocytes ทดสอบโดยการตรวจ Aggrecan ซึ่งการตรวจทั้ง FABP-4, Osteocalcin, และ Aggrecan นั้นจะมี secondary antibody ซึ่ง conjugate กับ Rhodamine Red ซึ่งเมื่อไปส่องดูใต้กล้อง fluorescence microscope จะเห็นเซลล์เป็นสีแดง (ดังรูปที่16) แสดงว่าเซลล์มีกระบวนการ differentiation เกิดขึ้นจริง

การทดสอบ osteoblastic differentiation ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay

หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานทดลองในสภาวะที่แตกต่างกันข้างต้นเป็นเวลา 7 วัน จึงทำการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay โดยใช้ Sigma Diagnostics alkaline phosphatase kit (Catalog no.86-2, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis) ชั้นของเซลล์ซึ่งถูกล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วนำมาตรึง (fix) ด้วย citrate-acetone-formaldehyde fixative solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที และย้อมด้วย alkaline-dye mixture ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และใช้สารละลาย napthol AS-BI alkaline solution and fast red violet B (FRV-alkaline solution) สำหรับตรวจวัด enzyme activity และทำการ counterstained slide ด้วย hematoxylin solution, gill No. 3 จากนั้นทำการวิเคราะห์เซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

การศึกษาปริมาณ alkaline phosphatase activity จากเซลล์ด้วยวิธี in vitro alkaline phosphatase assay (ดูวิธีการเตรียมสารละลายในภาคผนวก)

ชั่ง DBM สำหรับใส่ในเซลล์กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 5 mg เก็บใน sterile microcentrifuge tubes แล้ว split cell ลงใน T-25 tissue culture flask จากนั้น treat cell ด้วย 2%FBS Tissue culture media เติม DBM ลงในกลุ่มทดลอง incubate เป็นเวลา 0, 3, 5, 7, และ 10 วัน incubate ที่สภาวะ 37°C, 5%CO_2 เมื่อได้เวลาที่กำหนดให้นำเอา tissue culture media ออก ใน flask ที่เติม DBM ให้ล้างด้วย PBS แล้วดูดเอา DBM ออกให้มากที่สุด เติม ice cold dH_2O 2 ml ลงในแต่ละ flask แล้วขุดลอกเซลล์ออกจาก flask โดยใช้ cell scraper

นำสารละลายที่มีเซลล์ขูดลอกย้ายลงใน 15 ml centrifuge tube วางบนน้ำแข็ง จากนั้นทำการสั่นสะเทือนโดยใช้ความถี่สูงเพื่อให้เซลล์แตกออก (sonicate) เป็นเวลา 30 วินาที 1 ครั้ง ด้วยเครื่อง sonicator ตั้งเครื่องที่ 30% amplitude เติม sample 200 ul ลงในแต่ละ well ของ 96 well plate สำหรับ blank และ sample เติม pNPP 40 ul ลงแต่ละ well อย่างรวดเร็ว incubate assay plate ที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10N NaOH 10 ul ลงในแต่ละ well ยกเว้น blank อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วย plate reader แล้วจึงคำนวณค่า pNP amount โดยใช้ working sheet

Determination of the extinction coefficient for pNP

นำ stock pNP solution (2 mM) ที่แช่แข็งมาละลาย และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 μM โดยเติม pNP 25 μl ลงใน dH_2O 975 μl นำ pNP 50 μM ที่ dilute เสร็จแล้วมา dilute ต่อ ดังตาราง

Volume of 50 μM pNP (μL)	Volume of the Diluent (μl)	Conc. of pNP (μM)
0	250	0
50	200	10
125	125	25
200	50	40

ย้าย pNP ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้นี้บรรจุลงใน 96-well assay plate วัดค่าการดูดกลืนของแสง (OD) ที่ 405 nm โดยใช้ plate reader บันทึกข้อมูลลงเป็น excel data sheet และสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน จากนั้นจึงคำนวณ extinction coefficient ตาม Beer's law (A=E*C*L) ดูวิธีการวัดค่า OD จากเครื่อง Multiskan ได้ที่ภาคผนวก

การคำนวณผลการทดลอง (Calculation)

1) Protein amount of testing samples:

จาก BSA standard curve to get ug protein/ml of each testing samples.

y = mx + b, (OD = m*ug/ml + b) => (OD-b)/m => protein amount = ug/ml*volume of cell extraction for AP assay (100 ul)

2) pNP amount of testing samples:

a. จาก pNP standard curve to get extinction coefficient for pNP:

$$E = \frac{\text{\# units OD}}{\text{Nmol/ml*1 cm}} \Rightarrow \frac{1}{E} = \frac{\text{nmol/ml * 1cm}}{\text{\# units OD}} \Rightarrow \frac{1}{E} = \frac{\text{nmol * 1cm}}{\text{\# units*ml}}$$

b. จากค่า extinction coefficient เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ pNP ใน testing samples:

$$\text{pNP concentration} = \text{\#units of sample OD} * \frac{\text{nmol}}{\text{\# units*ml}} = \text{nmol/ml}$$

c. จาก pNP concentration of testing sample เพื่อให้ได้ค่า total amount of pNP in cell extraction in the assay for each sample:

Amount of pNP = pNP concentration * total volume of AP assay (0.25 ml) = nmol

d. จาก pNP amount เพื่อให้ได้ pNP production per minute:

pNP/min = pNP amount / 20 min = nmol / min

3. pNP amount per minute/ mg protein

จาก pNP amount per minute and protein amount เพื่อให้ได้ ratio of pNP/min : protein pNP : protein = nmol/min/ug protein = umol/min/mg ptotein

Overview of Calculation:

units of sample OD * 1 cm * nmol * total volume used in AP assay (250 ul)

----

units of OD from pNP standard * ml

---

conc of protein (ug/ml)*vol of cell extraction used in AP assay (200ul)*Rx time(20 min)

= # units of sample OD * 1/E * 0.25

Reaction time (20 min) * amount of protein

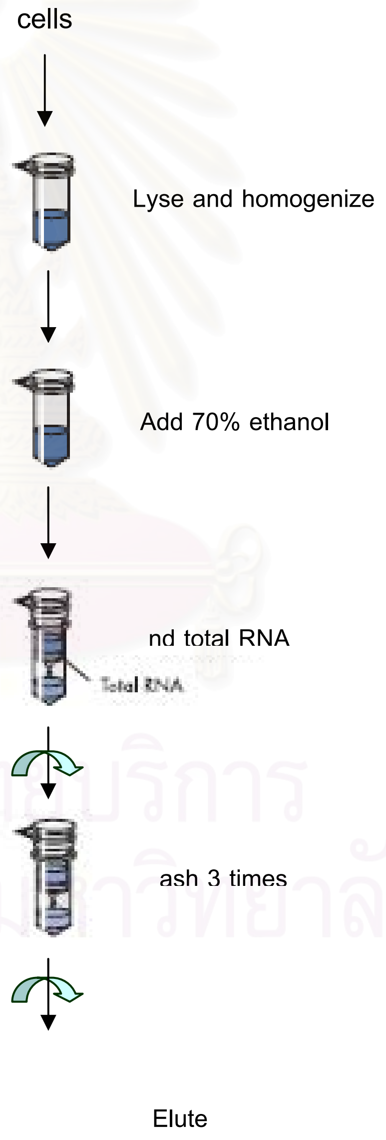
= (#units of sample OD/reaction time) * 1/E * 0.25 * 1/amount of protein

↑ ↑ ↑ ↑

Column E F G H in worksheets

<u>วิธีการแยกสกัด total RNA จากเซลล์</u>

นำ MSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton’s jelly ของสายสะดือรก ที่เลี้ยงใน α-MEM ซึ่งมีส่วนผสมของ 2%FBS + DBM กับเซลล์ที่เลี้ยงเฉพาะใน α-MEM + 2%FBS เป็นเวลา 7 วัน มาแยกสกัด total RNA โดยใช้ RNA easy Mini kit (Qiagen) ทำการวัดและคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ RNA (μg/ml) = ค่าการดูดกลืนแสง (OD ที่ 260 nm) x 40 x dilution factor โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ความบริสุทธิ์ของ RNA ดูได้จากอัตราส่วน OD ที่ 260 nm : OD ที่ 280 nm ควรมีค่าใกล้เคียง 2



รูปที่ 17 แสดงวิธีการ extract total RNA จากเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. **Harvest cells** : lyse cell โดยตรง โดยดูด cell-culture medium ออก (ล้างเอา DBM ออกโดยใช้ PBS) คว่ำบนกระดาษไม่ให้เหลือสารละลายติดอยู่ใน flask

↓

2. **Disrupt cells** : เติม Buffer RLT 350 µl ลงใน cell-culture dish แล้ว collect lysate ด้วย cell scraper จากนั้น pipet lysate ลงใน microcentrifuge tube แล้ว vortex หรือ pipet เพื่อ mix

↓

3. **Homogenize lysate** : ดูด lysate ผ่านเข็มเบอร์ 20 (0.9 mm diameter) อย่างน้อย 5 ครั้ง

↓

4. **เติม 70% ethanol** 1 เท่าตัวลงใน homogenized lysate แล้ว mix ให้เข้ากันด้วย pipet

↓

5. **ย้าย sample ทั้งหมดลง RNeasy spin column** และใส่ลงใน 2 ml collection tube ปิดฝาเบาๆ และ centrifuge เป็นเวลา 15 วินาทีที่ความเร็วรอบ ≥8000 x g (≥10,000 rpm) ดูดสารละลายที่ผ่าน tube ทิ้งให้หมด

↓

6. **เติม Buffer RW1 700 µl** ลงใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆ และ centrifuge เป็นเวลา 15 วินาทีที่ความเร็วรอบ ≥8000 x g (≥10,000 rpm) เพื่อล้าง spin column membrane ดูดสารละลายที่ผ่าน tube ทิ้งให้หมด

↓

7. **เติม Buffer RPE 500 µl** ลงใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆ และ centrifuge เป็นเวลา 15 วินาทีที่ความเร็วรอบ ≥8000 x g (≥10,000 rpm) เพื่อล้าง spin column membrane ดูดสารละลายที่ผ่าน tube ทิ้งให้หมด

↓

8. **เติม Buffer RPE 500 µl** ลงใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆ และ centrifuge เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ ≥8000 x g (≥10,000 rpm) เพื่อล้าง spin column membrane ดูดสารละลายที่ผ่าน tube ทิ้งให้หมด

↓

9. **ย้าย** RNeasy spin column **ลงใน** 1.5 ml collection tube **อันใหม่** เติม RNase-free water 30–50 µl ลงใน spin column membrane โดยตรง ปิดฝาเบาๆ และ centrifuge เป็นเวลา 1 นาทีที่ความเร็วรอบ ≥8000 x g (≥10,000 rpm) เพื่อแยกเฉพาะ (elute) RNA ออกมาเก็บใน tube เฉพาะ

หมายเหตุ ถ้าคาดว่า yield >30 µg, ให้ทำซ้ำ โดยใส่ RNase free water อีก 30–50 µl หรือeluate จากขั้นที่ 9

รูปที่ 18 แสดงขั้นตอนการ extract total RNA จากเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การศึกษาการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี cDNA array</u>

<u>การเตรียม sample RNA สำหรับการทดลอง</u>

เตรียม umbilical cord mesenchymal stem cell ลงใน tissue culture flask ขนาด T-75 ให้ได้จำนวนเซลล์ที่เท่ากัน treat ด้วย α-MEM ที่มี 2% FBS , pennicilin กับ streptomycin และ amphotericin B ใน flask ละ 20 ml เติม DBM 15 mg ในกลุ่มทดลอง incubate เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการ extract total RNA โดยใช้ RNeasy Mini Kit (Qiagen)

คำนวณความเข้มข้นของ total RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 260 nm (ความเข้มข้นไม่ควรต่ำกว่า 60 ng/µl) และค่าของ A260:A280 ratio ควรอยู่ในช่วง 1.9 ถึง 2.1

<u>การเตรียม cDNA probe สำหรับการทำ hybridization</u>

1. เตรียม annealing mixture: สำหรับแต่ละตัวอย่างของ total RNA sample ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ลงใน sterile PCR tube ผสมให้เข้ากันด้วย pipettor และ centrifuge ในช่วงเวลาสั้น ตั้งอุณหภูมิใน thermal cycler ที่ 70 °C, 3 นาที และที่ 37 °C, 10 นาที

Total RNA	5.0 µg
RT Primer (P)	1 µl
RNase-free H2O	ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 10 µl

2. เตรียม RT cocktail: เตรียมขณะที่ incubate annealing mixture ที่ 37 °C อุ่น RT cocktail ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 นาที

RT Cocktail for Chemiluminescent Detection	
Components	2 arrays
Buffer BN	8 µl
RNase-free H2O	8 µl
RNase Inhibitor (RI)	2 µl
Reverse Transcriptase (RE)	2 µl
Final Volume	20 µl

3. RT reaction: สำหรับแต่ละ array เติม RT cocktail 10 µl ลงใน Annealing Mixture 10 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วย pipettor และ incubate ต่อที่ 37 °C เป็นเวลา 25 นาที อุ่นที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ hydrolyze RNA และ inactivate เอนไซม์ reverse transcriptase เมื่อจบ RT reaction ให้ตั้งไว้บนน้ำแข็งขณะที่เริ่มขั้นตอนถัดไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. เตรียม LPR cocktail: สำหรับแต่ละ GEArray kit, mix ส่วนผสมลงใน sterile PCR tube

LPR Cocktail for Chemiluminescent Detection	
Components	2 arrays
Buffer L	36 μl
Buffer AF (BLUE tube)	18 μl
Biotin-16-dUTP	4 μl
DNA Polymerase (LE)	2 μl
Final Volume	60 μl

5. Linear polymerase reaction (LPR) labeling reaction:

สำหรับแต่ละ array เติม LPR Cocktail 30 μl ลงในแต่ละ RT reaction และ mix ให้เข้ากันด้วย pipettor ตั้งค่าใน thermal cycler สำหรับ LPR ดังนี้ คือ

อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที; (85 °C, 1 นาที, 50 °C, 1 นาที, 72 °C, 1 นาที) จำนวน 30 รอบ; และอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

6. ทำการ denature labeled cDNA probe และหยุดปฏิกิริยาโดยการ heat LPR tube ที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาทีและใส่ในน้ำแข็งทันที ก็จะได้ cDNA probe ที่พร้อมทำ hybridization ควรเก็บ probe ไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C ก่อนนำมาทำ hybridization

<u>ขั้นตอนการทำ hybridization</u>

1. Pre-hybridization: ควรทำระหว่างขั้นตอนสุดท้ายของ probe synthesis และ ก่อนเริ่มต้นการทดลอง ควรจดบันทึก array bar code number เอาไว้ก่อน ทำการ pre-wet array membrane โดยเติม dH_2O 5 ml ลงใน hybridization tube และ invert tube ขณะที่เตรียม GEAprehyb อยู่ จากนั้นอุ่น GEAhyb hybridization solution ที่ 60 °C และ invert ขวดหลายครั้งให้ส่วนผสมของบัฟเฟอร์ละลายเข้าด้วยกันอย่างสมบูรณ์ ทำการ heat sheared salmon sperm DNA ที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที ดูด dH_2O จาก hybridization tube ทิ้งให้หมด แล้วเติม GEAprehyb solution 2 ml (ภาคผนวก) หมุนฝาปิดให้แน่นและ vortex tube สารละลายให้เข้ากัน ใส่ tube ลงใน hybridization cylinder ทำการ pre-hybridize ใน hybridization oven ที่ 60 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยการหมุนอย่างต่อเนื่องที่ 5-10 rpm อย่างไรก็ตามถ้ามีความจำเป็นอาจทำการ pre-hybridization ได้ถึง 72 ชั่วโมง

2. Hybridization: ดูด GEAprehyb จาก hybridization tube ทิ้งให้หมด เติม GEAhyb (ที่มี probe , ดูภาคผนวก) ลงใน hybridization tube ทำการ hybridize ข้ามคืนที่ 60 °C และหมุนอย่างต่อเนื่องที่ 5-10 rpm

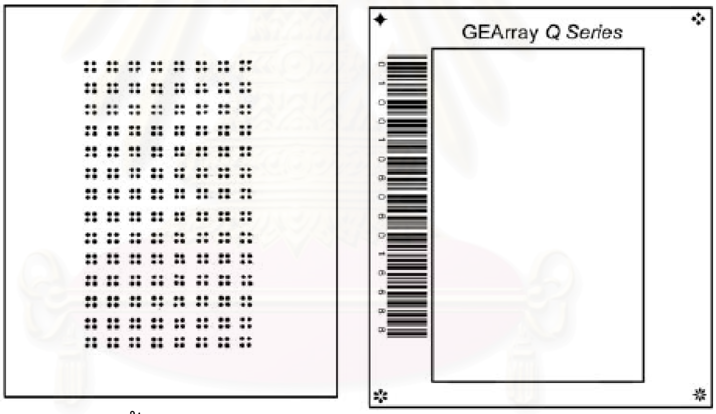
3. Washing: ริน GEAhyb solution จาก hybridization tube ลงใน microcentrifuge tube ที่สะอาด เก็บไว้ที่ -20 °C และทำการ redenature โดยการต้มเป็นเวลา 2-5 นาที ก่อนนำมาใช้ซ้ำ ล้าง membrane 2 ครั้งด้วย wash solution 1 ปริมาตร 5 ml ที่ 60 °C, 20-30 rpm, 15 นาที แล้ว vortex แล้วล้าง membrane อีก 2 ครั้งด้วย wash solution 2 5 ml ที่ 60 °C, 20-30 rpm, 15 นาที แล้ว vortex

หมายเหตุ Wash Solution1: 2X SSC, 1% SDS

(ผสม 20X SSC 100 ml และ 20 % SDS 50 ml ในน้ำ 1 L)

Wash Solution2: 0.1X SSC, 0.5 % SDS

(ผสม 20X SSC 5 ml และ 20% SDS 25 ml ในน้ำ 1 L)



รูปที่ 19 แสดงด้านทั้งสองของ GEArray® Q Series membrane โดยด้านซ้ายเป็น array side ซึ่งบรรจุด้วย cDNA spot เป็นด้านที่อยู่ข้างในของ hybridization tube ส่วนด้านขวามือเป็น Reverse side เป็นด้านที่พิมพ์ข้อมูลของ array อยู่ด้านนอกของ hybridization tube

<u>ขั้นตอนของการทำ chemiluminescent detection</u> (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง)

1. Blocking array: หลังจากดูด wash สุดท้ายทิ้งไปแล้ว ให้เติม GEAblocking solution Q 2 ml ลงไปทันที incubate เป็นเวลา 40 นาที หมุนอย่างต่อเนื่องที่ 20-30 rpm

2. Binding of alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (AP): ดูด GEAblocking solution Q จาก tube ทิ้งไป เติม binding buffer 2 ml และ incubate เป็นเวลา 10 นาที และหมุนอย่างต่อเนื่องที่ 5-10 rpm

การเตรียม Binding Buffer: ทำการ dilute 5X Buffer F ด้วย dH_2O ปริมาตร 5 เท่า เพื่อเตรียม 1X Buffer F และ dilute AP 1:8,000 ลงใน 1X Buffer F ให้ได้ binding buffer (ควรเติม AP ปริมาตรไม่น้อยกว่า 2 μl) โดยใช้ 1X Buffer F 16 ml ในแต่ละ tube สำหรับ washing

3. Washing: ล้าง membrane 4 ครั้งด้วย 1X buffer F 4 ml เป็นเวลา 5 นาทีด้วยการเขย่า vortex tube เบาๆ หลังจากเติม fresh 1X buffer F ลงในแต่ละ reaction แล้ว rinse หรือล้าง 2 ครั้งด้วย buffer G 3 ml

4. Detection: เติม CDP-Star chemiluminescent substrate 1.0 ml ลงใน hybridization tube แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที (ต้องให้ membrane อาบด้วย substrate ทั้งหมด) จากนั้นทำการซับ (blot) membrane ลงบนกระดาษกรองเพื่อเอา CDP-Star solution ที่เกินออก (ระวังอย่าให้ membrane แห้งสนิท) วาง membrane ลงใน plastic sheet protector หรือใน plastic zip-lock bag ขนาดเล็ก อย่าให้มีฟองอากาศ

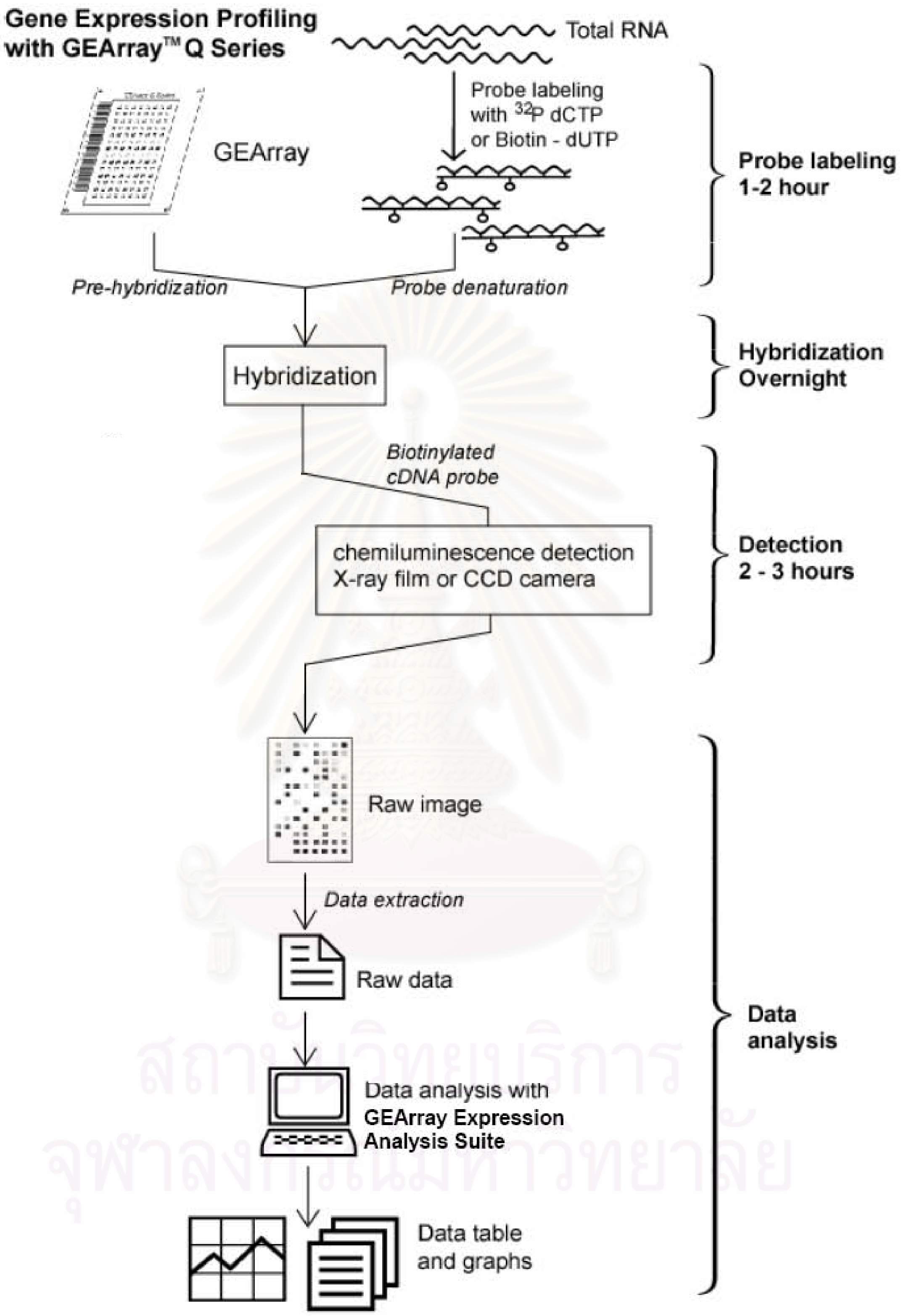
Image and data acquisition and analysis

1. Image acquisition : blank side ของ array ต้องหันหน้าให้กับ film ตำแหน่งของ bar code ต้องอยู่ด้านขวาและชื่อของ array ให้อยู่ด้านบน ทำการ record array image โดยใช้ X-ray film (ให้ expose X-ray film ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนได้ภาพที่ชัดเจน) และแปลงภาพลงคอมพิวเตอร์โดยใช้ desktop scanner และบันทึกภาพเป็น electronic file in grayscale (8 or 16 bit) และแปลงไฟล์เป็น TIFF format หรือ JPEG format

2. Image Analysis and Data Acquisition & Analysis

ใช้โปรแกรม Quantity One เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ แล้วคัดลอกข้อมูลทั้งหมดที่ได้ลงในโปรแกรม Microsoft EXCEL (ดูภาคผนวก) นำค่า intensity/mm^2 มาลบกับของ blank ก่อนเพื่อปรับค่ารบกวนทิ้งไป จากนั้นนำค่าในแต่ละยีนมาหารกับค่า intensity/mm^2 ของ internal control ยีน (เลือกยีน PPIA ซึ่งมีอยู่ 4 ช่อง โดยหาค่าเฉลี่ยก่อน) ได้เป็นค่า normalize สำหรับแต่ละช่อง แล้วนำค่าของกลุ่มที่ได้รับ DBM เป็นตัวตั้ง หารด้วยกลุ่มควบคุม (ได้ E/C ratio)

โดยถ้า	E/C	มีค่ามากกว่า	2.00	จัดเป็น highly up-regulation
	E/C	มีค่าอยู่ระหว่าง	1.00-2.00	จัดเป็น up-regulation
	E/C	มีค่าอยู่ระหว่าง	0.51-0.99	จัดเป็น down-regulation
	E/C	มีค่าน้อยกว่า	0.50	จัดเป็น highly down-regulation



รูปที่ 20 แสดงขั้นตอนของกระบวนการศึกษาการแสดงออกของยีนใน GEArray Q and S Series

<u>การทำ RT-PCR จาก total RNA ที่ extract จากเซลล์</u>

ละลาย template RNA, primer solutions, dNTP mix, 5x QIAGEN onestep RT-PCR buffer, และ RNase-free water วางทุกหลอดไว้บนน้ำแข็ง จากนั้นเตรียม master mix ซึ่งประกอบด้วย ส่วนผสมทั้งหมดสำหรับ RT-PCR ยกเว้น template RNA (ควรเตรียม master mix ให้มีปริมาตรมากกว่าที่กำหนดไว้ 10% สำหรับทุก reaction) ผสม master mix ให้เข้ากัน, และใส่ปริมาตรที่เหมาะสมลงใน PCR tube เติม template RNA ลงในแต่ละ PCR tube จากนั้นตั้งโปรแกรม thermal cycler โดยเริ่มต้น RT-PCR program ขณะที่ PCR tube ตั้งบนน้ำแข็ง รอจนกระทั่ง thermal cycler อุณหภูมิใกล้ถึง 50°C จึงวาง PCR tube ลงบน thermal cycler หลังจาก amplification เก็บตัวอย่างข้ามคืนที่ 2–8°C หรือ –20°C จนกว่าจะนำมาใช้

No.	Name	Sequences (5' -3')	product	Tm
1.	RUNX2 (Cbfa1)	Foward : $^{5'}$ CCCCACGACAACCGCACCAT $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ CACTCCGGCCCACAAATC $^{3'}$	270bp	64°C
2.	SMAD2	Foward : $^{5'}$ AGAGAGTTGAGACACCAGTTTTGC $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ ATAGTCATCCAGAGGCGGAAGTT $^{3'}$	86 bp	60°C
3.	SMAD7	Foward : $^{5'}$ GAATCTTACGGGAAGATCAACCC $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ CGCAGAGTCGGCTAAGGTG $^{3'}$	67 bp	60°C
4.	GADPH	Foward : $^{5'}$ ACCACAGTCCATGCCATCAC $^{3'}$ Reverse: $^{5'}$ TCCACCACCCTGTTGCTGTA $^{3'}$	370 bp	60°C

ตารางที่ 6 แสดงชื่อยีน ลำดับเบส ขนาดของ product และ Tm ของ Primer

จากตารางที่ 6 แสดง Primer ของยีนที่สนใจ สำหรับทำ RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจเพื่อยืนยันผลว่าสอดคล้องกับการทำ cDNA array หรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Step	Time (min)	Temp (°C)
Reverse transcription:	30 min	50°C
Initial PCR activation step:	15 min	95°C
3-step cycling		
Denaturation:	0.5 min	94°C
Annealing:	1 min	60°C
Extension:	1 min	72°C
Number of cycles: 30 cycles		
Final extension:	10 min	72°C

ตารางที่ 7 แสดง Thermal cycler condition

ดูผลผลิตจากการทำ RT-PCR (PCR product) ได้โดยการนำผลผลิตทั้งหมด รวมทั้ง PCR marker (Biorad) ขนาด 50 – 1,000 bp ผสมกับ loading dye ให้ได้ความเข้มข้นรวมสุดท้ายเป็น 1X จากนั้นใส่ลงในหลุมของ 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 90 V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ gel ไปแช่ (stain) ในสารละลาย 0.1% ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และ destain ในน้ำสะอาดอีกประมาณ 10-15 นาที และนำเข้าเครื่องฉายรังสี UV เพื่อถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิตที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูลและการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ความถี่ (frequency) ในรูปของกราฟและตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยข้อมูลเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous data) เพื่อใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูล โดยใชสถิติทดสอบดังต่อไปนี้ เช่น unpaired t-test สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน ANOVA สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน χ^2-test สำหรับทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่จำแนกเป็นกลุ่ม (categorical data) และ correlation สำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < .05$

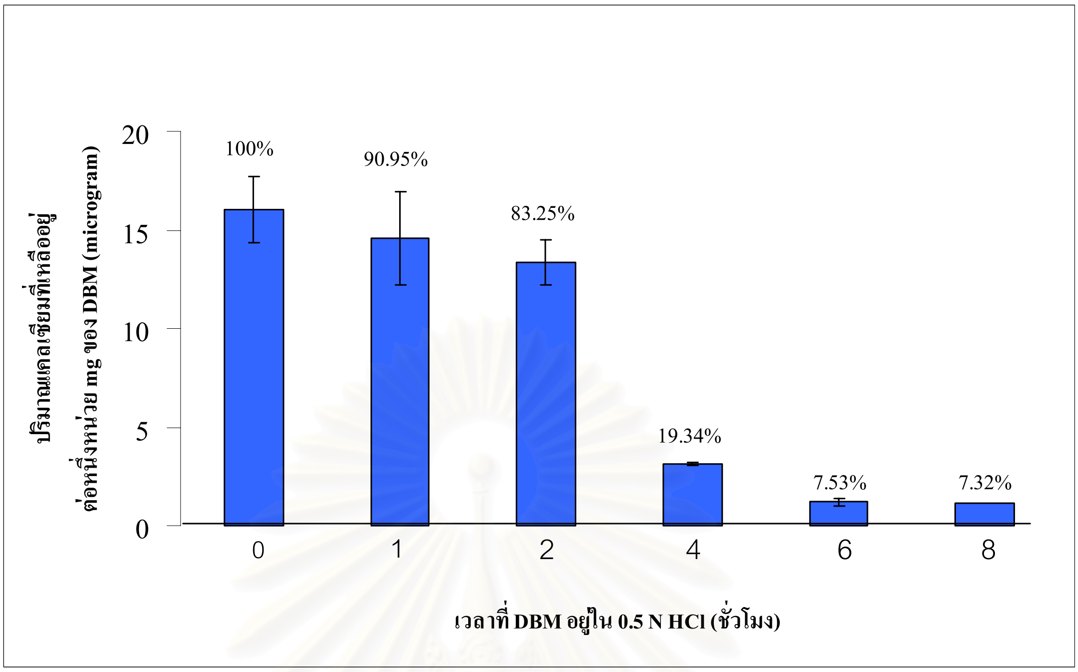
บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสายสะดือรกจากมารดาภายหลังคลอดบุตร จากนั้นทำการแยกเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly โดยแยกเอาหลอดเลือดที่อยู่ภายในชิ้นเนื้อออกให้หมด ล้างด้วย PBS ผสมกับ pennicillin และ streptomycin เพื่อป้องกันการติดเชื้อแล้วนำมาวางลงใน Petri dish ที่มี α-MEM จากนั้นใช้ใบมีดปราศจากเชื้อตัดชิ้นเนื้อดังกล่าวให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร ทำการแยกเพาะเลี้ยง Wharton's jelly cells จากชิ้นเนื้อโดยทำ primary culture ด้วยวิธี outgrowth technique โดยนำชิ้นเนื้อที่ตัดเรียบร้อยแล้วมาวางเรียงใน tissue culture flask เลี้ยงใน α-MEM ที่มี 10% FBS และ penicillin รวมกับ streptomycin ทำการเลี้ยงในตู้อบ incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C, 5% CO_2 จนกระทั่งเซลล์เริ่มเจริญเพิ่มจำนวนล้อมรอบชิ้นเนื้อ ทำการเพาะเลี้ยงต่อให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนกระจายตัวเต็มพื้นที่ tissue culture flask แล้วทำการศึกษารูปร่างเซลล์ (morphology) และคุณลักษณะ (characteristic) ของเซลล์ก่อนและหลังทดสอบด้วย DBM

เพื่อที่จะศึกษาปริมาณแคลเซียมที่คงเหลืออยู่ในผงกระดูก DBM เปรียบเทียบในช่วงเวลาที่ผงกระดูก DBM ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralization) จึงนำผงกระดูกมาทำการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized time) เป็นเวลา 1, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อผงกระดูกที่ผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ใน 0.5 N HCl มีปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ใน bone matrix เทียบกับส่วนที่ไม่ได้ผ่านกรด เป็นดังนี้คือ 90.95, 83.25, 19.34, 7.53, และ 7.32 ตามลำดับ ดังรูปที่ 21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



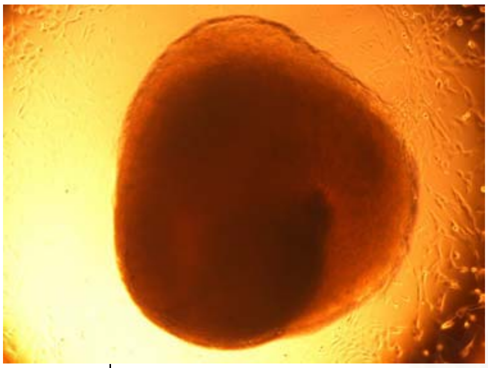
รูปที่ 21 แสดงปริมาณของแคลเซียมในผงกระดูกที่ลดลงตามเวลาเมื่ออยู่ใน 0.5 N HCl กับปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่เทียบกับตอนต้น

รูปที่ 22 แสดง DBM ที่อยู่ใน 0.5 N HCl เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำมาล้างกรดออก ทำการ sterilization และนำไปทำ freeze dry เก็บไว้ใน sterile conical tube เพื่อนำไปทดสอบกับเซลล์ที่ต้องการ

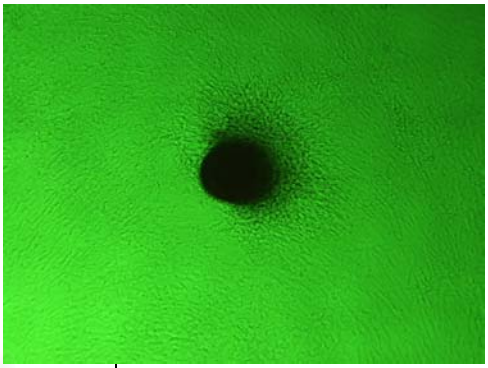
เนื่องจาก DBM ที่มีประสิทธิภาพในการชักนำเซลล์ osteoprogenitors ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ควรมีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ใน DBM ประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก DBM ซึ่งอยู่ใน 0.5 N HCl เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เนื่องจากมีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 7.32 มาทำการศึกษาต่อ (รูปที่ 22)

DBM ที่นำมาใช้ในการศึกษาในระดับเซลล์ทดลอง (in vitro) ของเซลล์ Wharton's jelly derived cells มีระดับแคลเซียมคงเหลืออยู่ประมาณ 7 - 8% ของปริมาณแคลเซียมที่มีอยู่ตอนต้น เซลล์ไลน์ปฐมภูมิที่สร้างขึ้นจากการเพาะเลี้ยง และทำการศึกษา ลักษณะของ fibroblast-like cell เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2-3 สัปดาห์ต่อมา สังเกตเห็นว่าชั้นของเซลล์ Wharton's jelly derived cells มีการเจริญเพิ่มจำนวนเกือบเต็มจานทดลอง (80% confluence) จึงทำการลอกเซลล์ออกจากจานทดลองด้วยทริปซิน (trypsinization) ล้างเซลล์และเพาะเลี้ยงด้วย α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 10%FBS แล้วทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ Wharton's jelly derived cells จากการเพาะเลี้ยง พบว่าลักษณะของเซลล์มีลักษณะเป็นแฉกคล้ายรูปดาวและลักษณะคล้ายกระสวย (spindle and stellate shape) เห็นไซโตพลาสมเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous cytoplasm) ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับเซลล์ fibroblasts (fibroblast-like cell) ดูได้จากรูปที่ 23G หรือ 23H ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เหมือนกับรูปร่างของ mesenchymal stem cells เช่นกัน ผู้วิจัยจึงต้องการพิสูจน์ว่าเซลล์ไลน์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ MSCs จริงหรือไม่ ด้วยวิธี In vitro functional mesenchymal stem cells identification ในขั้นถัดไป

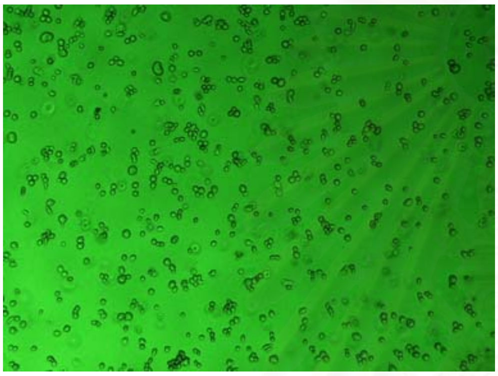
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



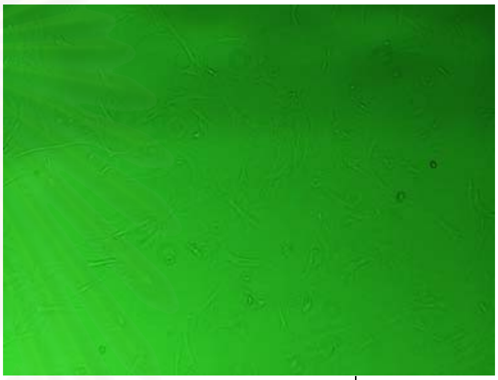
(A) เซลล์เริ่ม outgrowth ออกจาก tissue



(B) เซลล์เพิ่มจำนวนจน confluence รอบ tissue



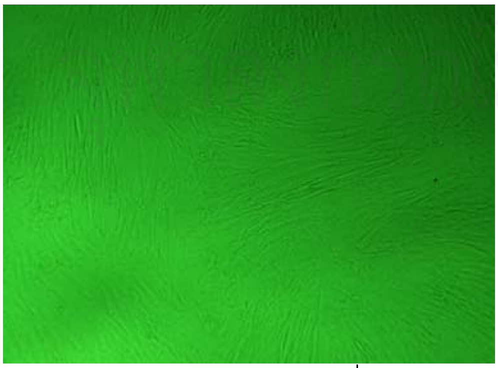
(C) ทำการลอกเซลล์ออกจาก flask (trypsinization)



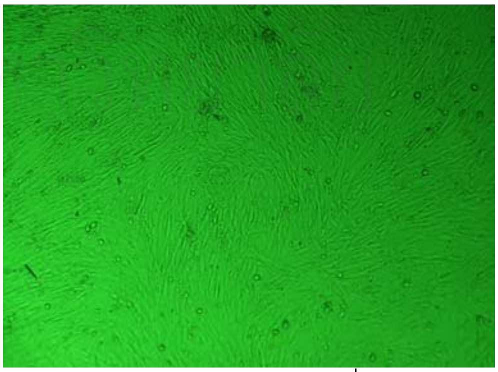
(D) แสดง cell proliferation ในวันที่ 1

(E) แสดง cell proliferation ในวันที่ 3

(F) แสดง cell proliferation ในวันที่ 5



(G) แสดง cell proliferation ในวันที่ 7



(H) แสดง cell proliferation ในวันที่ 14

รูปที่ 23 แสดงเซลล์ Wharton's jelly derived cells ที่ได้จากการทำ Primary culture (x 10)

(A) เซลล์เริ่ม outgrowth ออกจาก tissue ภายหลังจากเลี้ยงไปได้เป็นเวลา 7 วัน

(B) เซลล์เริ่ม outgrowth ออกจาก tissue จนเซลล์ confluence ในวันที่ 14

(C) นำ tissue ออกจาก flask แล้วทำการลอกเซลล์ โดยการทำ trypsinization เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อ ใน T-75 flask จนเซลล์ confluence

(D) เซลล์กลับลงมาติดกับพื้น flask แล้วมีการเจริญเพิ่มจำนวนต่อในวันที่1

(E) การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ในวันที่ 3

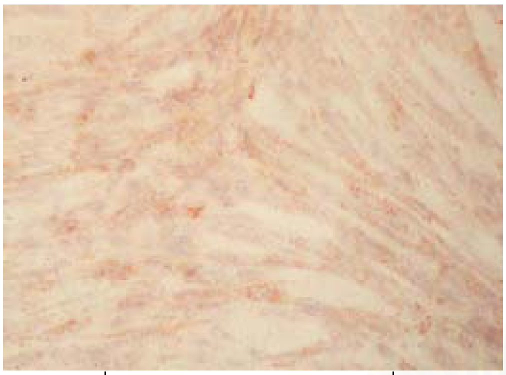
(F) การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ในวันที่ 5

(G) การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ในวันที่ 7

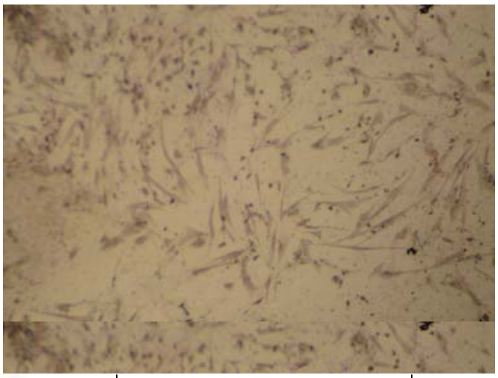
(H) การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ในวันที่ 14 (confluence)

จากรูปที่ 23 จะเห็นถึงรูปร่างลักษณะ (morphologic pattern) ของ Wharton's jelly derived cells ที่ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีรูปร่างยาวเหมือนกระสวย (spindle and stellate shape) เห็นไซโตพลาสมเป็นเนื้อเดียวกัน (fine homogenous cytoplasm) ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะของเซลล์ fibroblasts ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าเซลล์ไลน์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ MSCs หรือไม่ ทดสอบด้วยเทคนิค In vitro functional mesenchymal stem cells identification (รูป 24 และ 25)

เซลล์ต้นกำเนิดนั้นมีหน้าที่หลายประการ เช่น สามารถกลับไปเป็นเซลล์ของตนเอง (self renew) และสามารถเพิ่มจำนวนได้มากเพื่อเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ progenitors ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นเซลล์ไลน์ซึ่งจำเพาะต่อไป กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิดถูกค้นพบจาก adult tissue หลายประเภท เช่นเซลล์ bone marrow-derived stem cells (BMSCs) หรือเซลล์ mesenchymal stem cells (MSCs) เป็นต้น เซลล์ MSCs สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่นเซลล์ adipocytes เซลล์ chondrocytes เซลล์ osteocytes เซลล์ hepatocytes เซลล์ cardiomyocytes และเซลล์ประสาท (neurons) ซึ่งความสามารถของเทคโนโลยีในการคัดเลือกเซลล์รวมถึงการผลิต recombinant growth factors เพื่อที่จะได้แยกและเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดในระดับเซลล์ทดลอง (in vitro) ได้อย่างต่อเนื่อง ในระหว่างการแยกและการเพิ่มจำนวนเซลล์ MSCs สถานะของเซลล์ต้นกำเนิดที่จะประเมินค่าได้ดีที่สุดโดยการวัดความสามารถของเซลล์เหล่านี้เพื่อเปลี่ยนไปเป็น mesenchymal lineages หลายชนิด

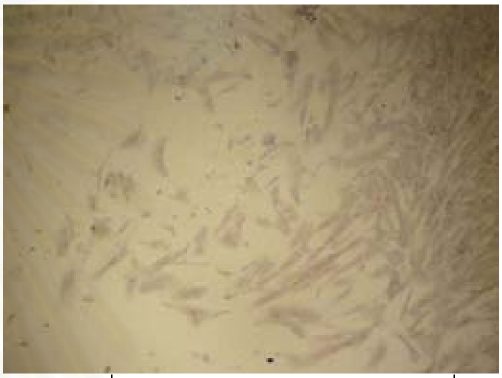


(A) เซลล์ที่ย้อมด้วย Oil Red O ในวันที่ 10



(B) เซลล์ที่ย้อมด้วย FABP-4 Ab ในวันที่ 10

(C) เซลล์ที่ย้อมด้วย Von Kossa ในวันที่ 10



(D) เซลล์ที่ย้อมด้วย Osteocalcin Ab ในวันที่ 10

รูปที่ 24 แสดงผลการทดสอบ in vitro functional mesenchymal stem cell identification จากเซลล์ Wharton’s jelly derived cells ที่แยกได้จากสายสะดือรก ในวันที่ 10 (10 X)

(A) เซลล์ที่เลี้ยงใน Adepogenesis media supplements ในวันที่ 10 ทำการย้อมด้วยวิธี Oil Red O staining สังเกตว่าเซลล์ติดสีแดง บ่งชี้ว่าเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes

(B) เซลล์ที่เลี้ยงใน Adepogenesis media supplements ในวันที่ 10 ทำการย้อมด้วย FABP-4 antibody สังเกตว่าเซลล์ติดสีน้ำตาล แสดงถึงผลบวกว่าเริ่มมีเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes ซึ่งยืนยันกับรูปที่ 24A

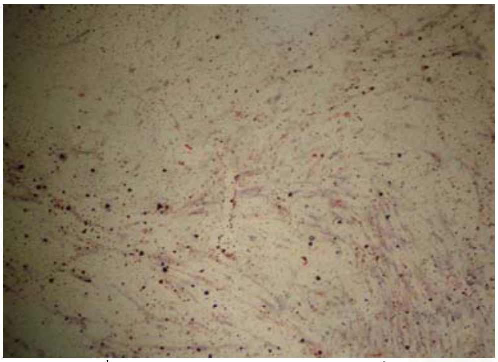
(C) เซลล์ที่เลี้ยงใน Osteogenesis media supplements ในวันที่ 10 ทำการย้อมด้วยวิธี Von Kossa staining เพื่อดูกระบวนการเกิด mineralization ในเซลล์ osteocytes สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง แสดงผลลบ บ่งชี้ว่ายังไม่มีการสะสมแร่ธาตุของเซลล์

(D) เซลล์ที่เลี้ยงใน Osteogenesis media supplements ในวันที่ 10 ทำการย้อมด้วย Osteocalcin antibody สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง บ่งชี้ว่ายังไม่มีการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ ซึ่งยืนยันกับรูปที่ 24C

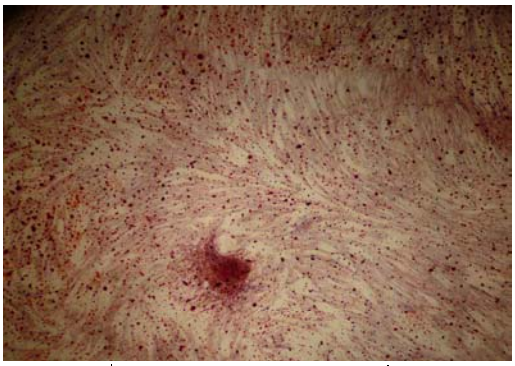
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าเซลล์ Wharton's jelly derived cells ที่แยกได้จากสายสะดือรก ด้วยวิธี primary culture นั้นมีคุณสมบัติเป็น MSCs หรือไม่ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบเซลล์ให้เปลี่ยนแปลงเป็น multiple mesenchymal lineages โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Wharton's jelly derived cells ใน adipogenesis, chondrogenesis และ osteogenesis media supplements ซึ่งพบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น adipogenic, chondrogenic, และ osteogenic lineages ได้จริง โดยใช้ antibodies ซึ่งประกอบไปด้วย goat anti-mouse FABP-4, goat anti-human Aggrecan และ mouse anti-human Osteocalcin เพื่อตรวจวัด mature phenotypes ของเซลล์ adipocytes เซลล์ chondrocytes และเซลล์ osteocytes ในวันที่ 10 และ 20 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



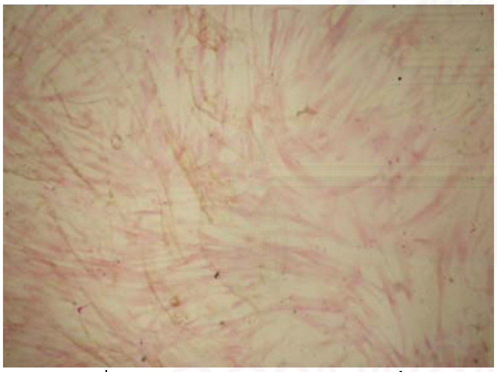
(A) เซลล์ที่ย้อมด้วย Oil red O ในวันที่ 20 (Con)



(B) เซลล์ที่ย้อมด้วย Oil red O ในวันที่ 20 (E)

(C) เซลล์ที่ย้อมด้วย FABP-4 Ab ในวันที่ 20 (Con)

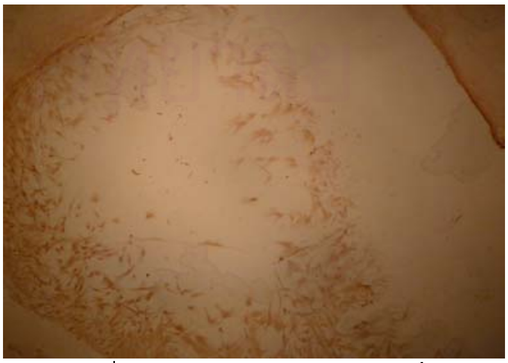
(D) เซลล์ที่ย้อมด้วย FABP-4 Ab ในวันที่ 20 (E)



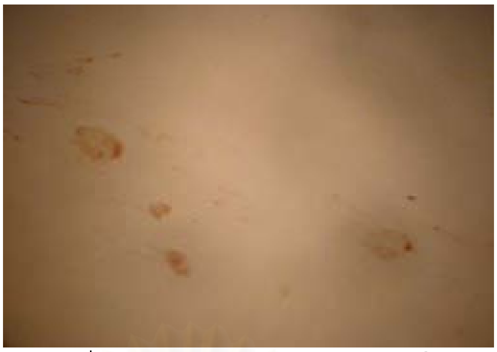
(E) เซลล์ที่ย้อมด้วย Von Kossa ในวันที่ 20 (Con)

(F) เซลล์ที่ย้อมด้วย Von Kossa ในวันที่ 20 (E)

(G) เซลล์ที่ย้อมด้วย Osteocalcin ในวันที่ 20 (Con)



(H) เซลล์ที่ย้อมด้วย Osteocalcin ในวันที่ 20 (E)



(I) เซลล์ที่ย้อมด้วย Aggrecan Ab ในวันที่ 20 (E)

รูปที่ 25 แสดงผลการทดสอบ in vitro functional mesenchymal stem cell identification จากเซลล์ Wharton's jelly derived cells ที่แยกได้จากสายสะดือรก ในวันที่ 20 (10 X) โดย Con คือเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงอยู่ใน α-MEM + 2% FBS ส่วน E คือเซลล์ซึ่งเลี้ยงอยู่ใน induction media supplement ชนิดต่างๆ

(A) เซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน α-MEM + 2% FBS ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Oil Red O สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง บ่งชี้ว่าไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes

(B) เซลล์ที่เลี้ยงใน Adepogenesis media supplement ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Oil Red O สังเกตว่าเซลล์ติดสีแดงเข้ม พบว่ามีลักษณะของ fat nodule ที่ติดสีแดงเข้ม บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes เช่นเดียวกับในวันที่ 10 ในรูป 24A

(C) เซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน α-MEM + 2% FBS ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย FABP-4 Antibody เพื่อยืนยันผลควบคู่กับ Oil Red O สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง บ่งชี้ว่าไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes สอดคล้องกับผลในรูป 25A

(D) เซลล์ที่เลี้ยงใน Adepogenesis media supplement ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย FABP-4 Antibody สังเกตว่าเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้ม บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes สอดคล้องกับผลในรูป 25B

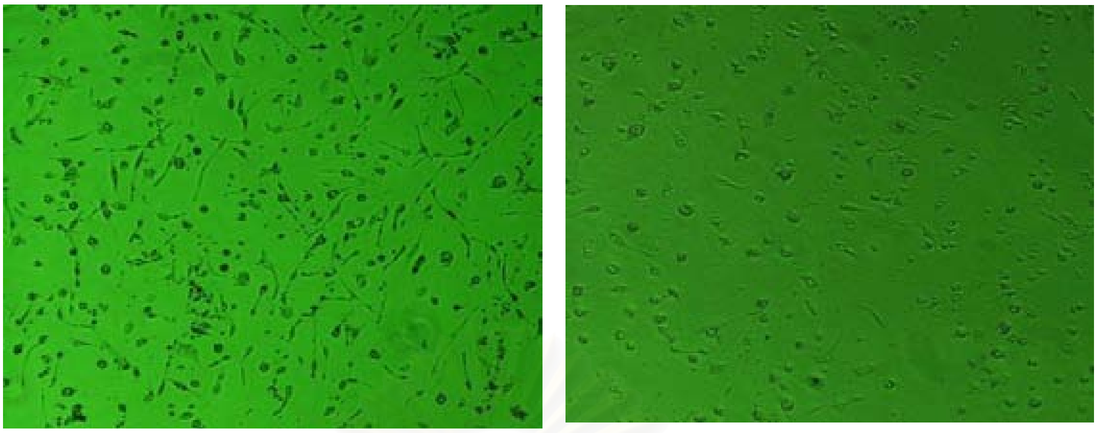
(E) เซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน α-MEM + 2% FBS ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Von Kossa สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง บ่งชี้ว่าไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteocytes

(F) เซลล์ที่เลี้ยงใน Osteogenesis media supplement ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Von Kossa สังเกตว่าเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้ม แสดงลักษณะของ mineralized nodule บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteocytes

(G) เซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน α-MEM + 2% FBS ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Osteocalcin Antibody เพื่อยืนยันผลควบคู่กับ Von Kossa staining สังเกตว่าเซลล์ติดสีจาง บ่งชี้ว่าไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteocytes

(H) เซลล์ที่เลี้ยงใน Osteogenesis media supplement ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Osteocalcin Antibody สังเกตว่าเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้ม บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteocytes สอดคล้องกับผลในรูปที่ 25F

(I) เซลล์ที่เลี้ยงใน Chondrogenesis media supplement ในวันที่ 20 ทำการย้อมด้วย Aggrecan Ab สังเกตว่ามีเซลล์ติดน้ำตาลเข้มกระจายอยู่บนสไลด์ บ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ chondrocytes



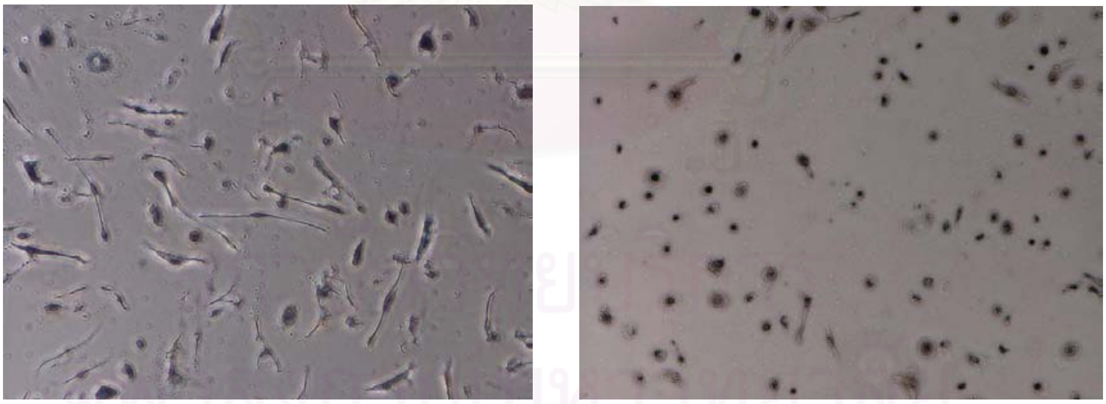
(A) None (B) +DBM

รูปที่ 26 แสดงการศึกษา morphology study ของเซลล์ MSCs ที่ได้จาก Wharton’s jelly tissue (x 10) หลังทดสอบด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน

(A) เซลล์ MSCs ที่ไม่ได้รับ DBM มีรูปร่างแบบ spindle shape

(B) เซลล์ MSCs ที่ได้รับมี DBM รูปร่างแบบ shortened and flattened shape

เพื่อศึกษาถึงรูปร่างลักษณะของเซลล์ MSCs ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง จะเห็นว่าเซลล์ MSCs ที่ไม่ได้รับ DBM มีรูปร่างแบบ spindle shape ส่วนเซลล์ที่ได้รับ MSCs ที่ได้รับมี DBM รูปร่างแบบ shortened and flattened shape หรือ cuboidal shape ดังแสดงในรูป 26A และ 26B



(A) None (B) +DBM

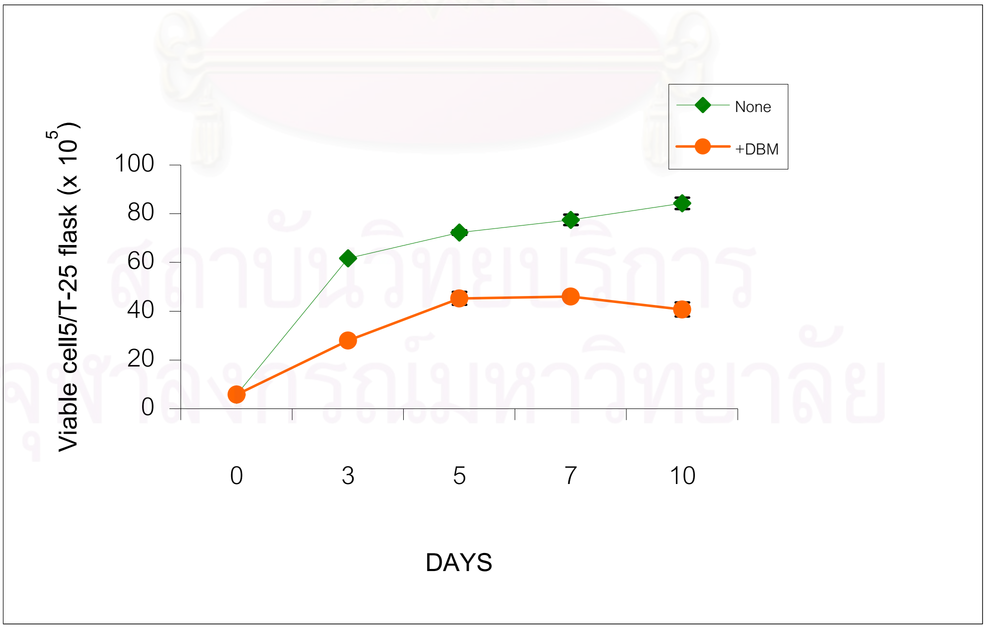
รูปที่ 27 แสดงการศึกษา alkaline phosphatase staining assay ของเซลล์ MSCs ที่ได้จาก Wharton’s jelly tissue (x 10) หลังทดสอบด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน (x 10)

(A) เซลล์ MSCs ที่ไม่ได้รับ DBM จะติดสีน้ำเงิน บ่งชี้ถึงระดับ alkaline phosphatase activity ที่ต่ำ

(B) เซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM จะติดสีม่วงแดง บ่งชี้ถึงระดับ alkaline phosphatase activity ที่สูง

เพื่อที่จะศึกษาถึงความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive ability) ของ DBM ต่อกระบวนการชักนำใน Wharton's jelly cells ผู้วิจัยจึงได้เลือกวิธี alkaline phosphatase staining assay เพื่อประเมินผลของ DBM ต่อการชักนำ Wharton's jelly cells ด้วยการเติม DBM ลงในเซลล์กลุ่มทดลอง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมไม่ได้รับ DBM หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ทำการสังเกตรูปร่างลักษณะของเซลล์และการทดสอบด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) ดังแสดงในรูปที่ 26A ในทางตรงกันข้าม กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ DBM ปรากฏว่ามีรูปร่างสั้น (shortened) และแบน (flattened) คล้ายลูกเต๋า (cuboidal shape) ในรูป 26B นอกจากนี้เซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งติดสีน้ำเงิน บ่งชี้ถึงระดับ alkaline phosphatase activity ที่ต่ำ ขณะที่กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ DBM จะติดสีม่วงแดง (red purple) แสดงว่ามีระดับ alkaline phosphatase activity สูงมาก (รูปที่ 27)

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Wharton's jelly derived cells โดยแบ่งเป็นกลุ่มทดลอง ซึ่งได้รับ DBM และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM นำมาเพาะเลี้ยง และทำการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตในวันที่ 3, 5, 7 และ 10 โดยการย้อมด้วยสารละลาย trypan blue แล้วทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer ซึ่งเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของสารละลาย trypan blue ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 28

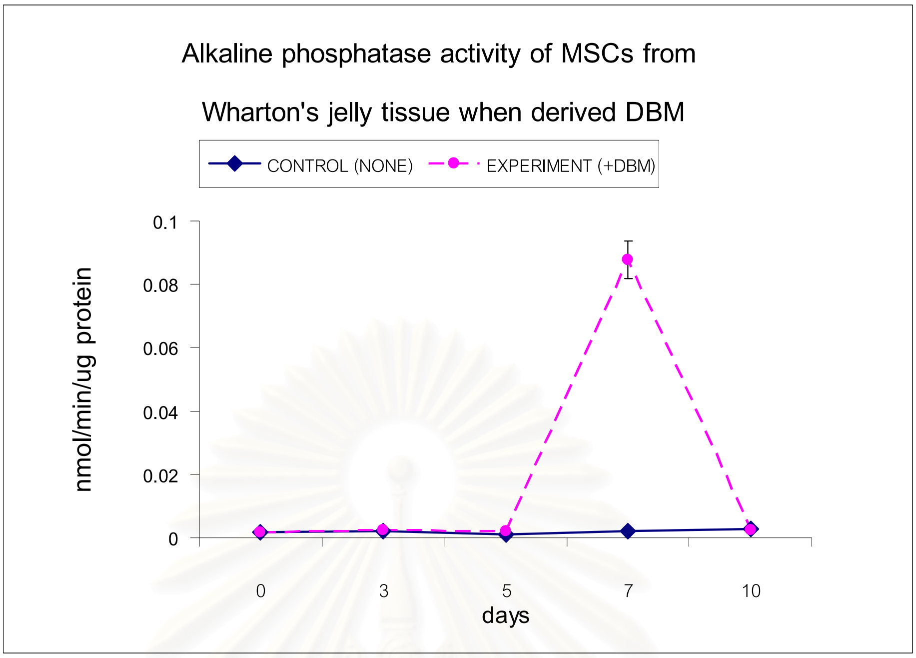


รูปที่ 28 แสดงผลการทดสอบ Trypan blue proliferation assay ของเซลล์ MSCs ในกลุ่มทดลอง (experimental group) ซึ่งได้รับ DBMและเซลล์ในกลุ่มควบคุม (control group) ซึ่งไม่ได้รับ DBM ณ วันที่ 3, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ (เริ่มต้นที่จำนวนเซลล์ในหน่วย x 10^5 เซลล์)

การศึกษาผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ MSCs ที่ได้จาก Wharton's jelly tissue ในสายสะดือรก ด้วยวิธีการประเมินประสิทธิภาพ (assessing potential mitogenic effect) ซึ่งได้จากการสังเกตผลการทดลองก่อนหน้านี้ของคณะวิจัย พบว่าหลังจากทำการปลูกถ่าย DBM ลงในหนู (nude mice) มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ตั้งต้นของกระดูก (osteoprogenitors) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro*) โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS กับยาปฏิชีวนะ โดยมีเซลล์ MSCs จำนวน 5.0×10^5 เซลล์/T-25 flask ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ได้รับ DBM จำนวน 5 mg กับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน ทำการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 3, 5, และ 7 ด้วย hemocytometer ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นเป็น 8×10^6 เซลล์/T-25 flask ในขณะที่จำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ DBM มีจำนวนเซลล์ประมาณ 4.0×10^6 เซลล์/T-25 flask

จากรูปที่ 28 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ MSCs มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงที่สุดประมาณวันที่ 5-7 ทั้งสองกลุ่ม โดยเซลล์ MSCs ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ DBM นั้นมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ได้รับ DBM นั้นมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยกว่า ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดกระบวนการ differentiation ไปเป็นเซลล์ osteoblasts ร่วมด้วย ซึ่งจะทำการพิสูจน์ในขั้นต่อไปโดยการศึกษา osteogenic markers ที่สำคัญ เช่นตรวจวัดการแสดงออกของ alkaline phosphatase ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay หรือ alkaline phosphatase activity assay และทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ชนิดนี้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



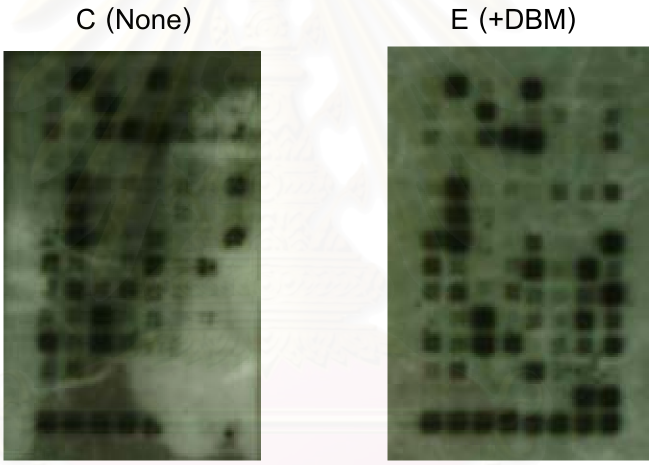
รูปที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบระดับ alkaline phosphatase activity ในหน่วย nmol/min/μg protein ของเซลล์ MSCs ในกลุ่มทดลอง ซึ่งได้รับ DBM และเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับ DBM ณ วันที่ 3, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ (เริ่มต้นที่จำนวนเซลล์ในหน่วย x 10^5 เซลล์)

จากรูปที่ 29 พบว่า ระดับ alkaline phosphatase activity ของเซลล์ที่ได้รับ DBM ในช่วงแรก (วันที่ 0, 3, 5) นั้นอยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 0.01 nmol/min/μg protein) และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 (Mean = 0.087745 nmol/min/μg protein, SD = ± 0.0061) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และลดลงในวันที่ 10 ใกล้เคียงกับในช่วงต้น

รูปที่ 30 แสดง total RNA ที่ extract ได้จากเซลล์ MSCs มาทำ formaldehyde gel electrophoresis เพื่อดูปริมาณและคุณภาพ ก่อนนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA probe และทำปฏิกิริยา RT-PCR ในขั้นต่อไป (C = None, E = + DBM เป็นเวลา 7 วัน)

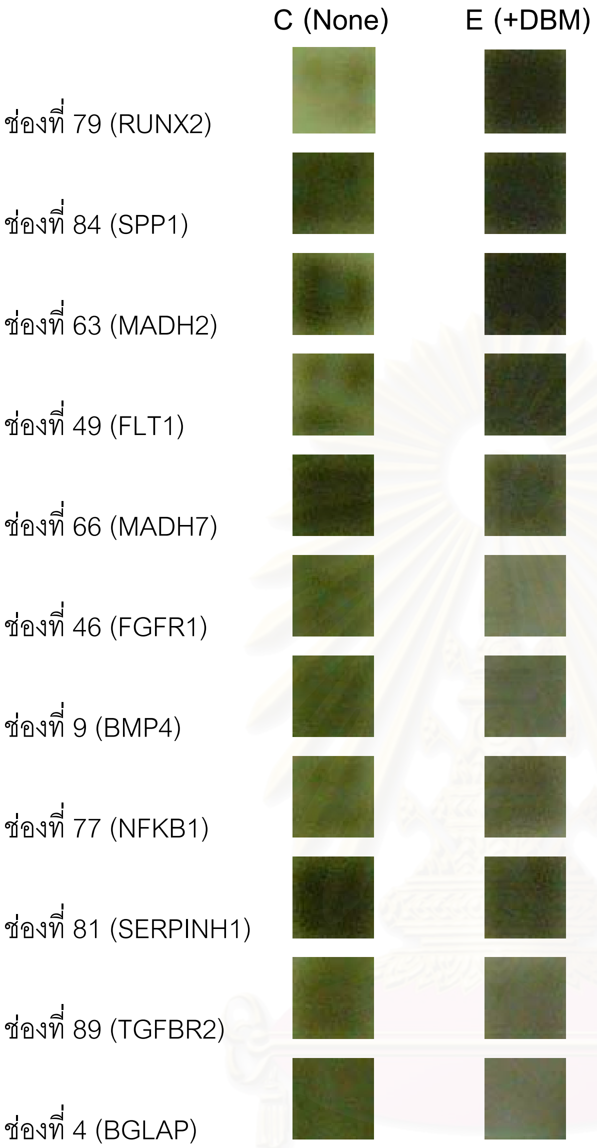
จากรูปที่ 30 แสดงถึง total RNA ที่แยกสกัดได้จากเซลล์ทั้งในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม โดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen) เมื่อได้ product มาแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าว พบว่าได้ 2.16 สำหรับ RNA ที่แยกได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม และได้ 2.01 สำหรับ RNA ที่แยกได้จากเซลล์ในกลุ่มทดลอง (ค่า OD 260 nm/OD280 nm ratio ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.9 – 2.1) จากนั้นจึงนำ total RNA นี้มาทำ formaldehyde gel electrophoresis ซึ่งจะเห็น product ของ RNA อยู่ 2 ขนาด คือ 18s กับ 28s โดยขนาด 18s ที่มีขนาดเล็กก็เคลื่อนออกมาก่อนพบอยู่ด้านล่าง ขณะที่ขนาด 28s นั้นมีขนาดใหญ่กว่าพบอยู่ด้านบน

ผลการเปรียบเทียบ



รูปที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบ array membrane ที่ได้จากการทำ cDNA array

จากรูปที่ 31 ซึ่งแสดงผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ osteogenesis จากการนำ RNA ที่แยกได้จากเซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA probe ซึ่งติดฉลากด้วย biotin-16-dUTP จากนั้นนำไปทำ hybridization ข้ามคืน ล้างเอา probe ที่ไม่เกาะบน membrane ออกให้หมด แล้วทำการ detect สัญญาณ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแต่ grid ที่เกิดขึ้นด้วยโปรแกรม Quantity One และหาสัดส่วนของ E/C ratio เพื่อให้ทราบว่ายีนใด up-regulation หรือ down-regulation



รูปที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบ grid ใน human osteogenesis cDNA array ของ MSCs ที่แยกได้จาก Wharton's jelly tissue ในสายสะดือรก เมื่อได้รับ DBM บางส่วน

จากรูปที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบ grid ใน human osteogenesis cDNA Array จะเห็นระดับ gene expression ที่แตกต่างกัน ยีนที่มีระดับ gene expression เพิ่มขึ้น (up regulation) จะเห็น grid ของกลุ่มทดลอง (ได้รับ DBM) มีความเข้มมากกว่า grid ของกลุ่มควบคุม ในขณะที่ยีนที่มีระดับ gene expression ลดลง (down regulation) จะเห็น grid ของ E มีความเข้มน้อยกว่า grid ของ C

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบค่า intensity ratio (area intensity/mm^2) ของยีนจากเซลล์ MSCs ที่แยกได้จากสายสะดือรก เมื่อได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิค cDNA array ของ ทำการวัดค่าด้วยโปรแกรม Quantity one แบ่งเป็นกลุ่มที่ up regulation และกลุ่ม down regulation (เรียงค่าจากมากไปหาน้อย)

ตารางแสดง gene ที่ up regulation

แสดงยีนที่มีค่า E/C Ratio มีค่ามากกว่า 2.00

Gene	E/C ratio
VDR	8.455126
RUNX2	6.97554
TGFB2	2.402011
CD36	2.364661
FLT1	2.14079
SMAD2	2.130615

แสดงยีนที่มีค่า E/C Ratio มีค่าอยู่ระหว่าง 1.00-2.00

Gene	E/C ratio	Gene	E/C ratio
ITGA1	1.924301	CTSK	1.248678
SMAD4	1.854928	TNF	1.246027
COL16A1	1.853031	ANXA5	1.241091
PDGFA	1.705492	NFKB1	1.216457
EGF	1.568472	COL10A1	1.206989
SPP1	1.470695	SMAD1	1.20649
ITGA2	1.460258	BGN	1.185278
IGF2	1.419921	BMP6	1.182748
COL4A3	1.394368	SMAD5	1.155607
FN1	1.371369	ALPL	1.130387
COL11A1	1.355433	ITGA3	1.127584
EGFR	1.338472	DCN	1.129674
SPARC	1.327123	SOX9	1.117095
ITGB1	1.326483	SMAD9	1.11554
MSX1	1.326103	COL4A4	1.10264
COL4A5	1.306775	CSF3	1.014254
COL5A1	1.295062	IGF1	1.006448
COL12A1	1.25219	MMP9	1.003596
MMP10	1.250362		

ตารางแสดง gene ที่ down regulation

แสดงยีนที่มีค่า E/C Ratio มีค่าอยู่ระหว่าง 0.51-0.99

Gene	E/C ratio	Gene	E/C ratio
TGFBR2	0.992569	FGF1	0.772921
COL15A1	0.99056	SMAD6	0.734103
RSL1D1	0.970666	ITGAM	0.748437
BMP5	0.959051	COL19A1	0.734338
SCARB1	0.955137	COL9A2	0.731175
COL18A1	0.945414	FGFR3	0.724001
FGFR2	0.934987	COL1A1	0.715683
ITGAV	0.934077	BMP3	0.702768
SMAD7	0.913975	GDF10	0.700505
BMP4	0.89768	BMPR1A	0.673665
COL17A1	0.889129	FGF2	0.633147
IGF1R	0.870798	COL2A1	0.631869
VCAM1	0.863313	ICAM1	0.627061
MMP8	0.832894	FGFR1	0.617144
BMP8B	0.830974	COL7A1	0.609405
BGLAP	0.830364	CSF2	0.586131
TGFB1	0.807487	COL14A1	0.556018
ARSE	0.799068	CASR	0.769144
TWIST1	0.783306	COL3A1	0.753864
MSX2	0.77526	BMP2	0.563724
BMP7	0.774784		

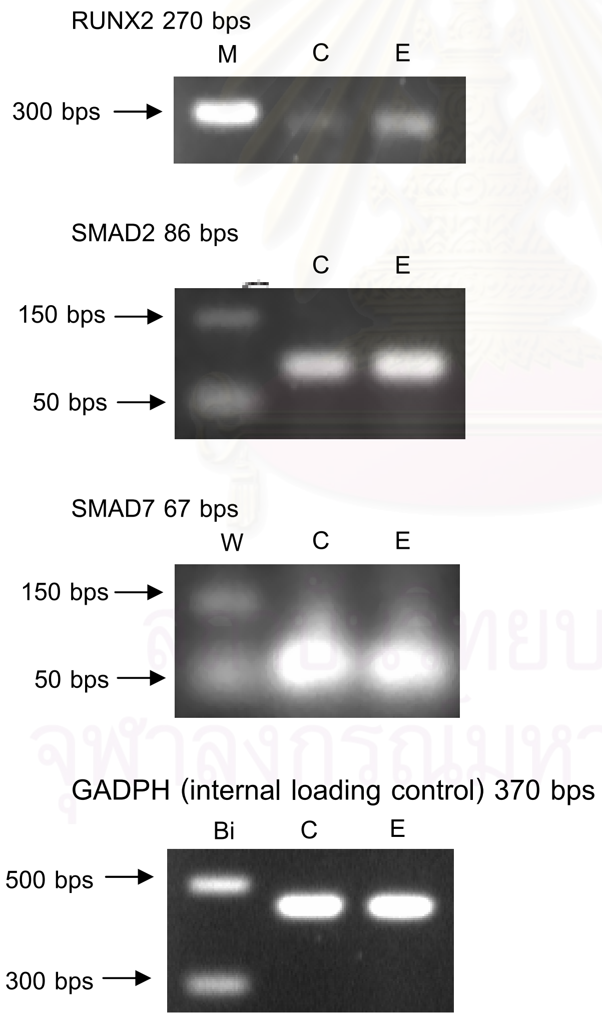
แสดงยีนที่มีค่า มีค่าน้อยกว่า 0.50

Gene	E/C ratio
FGF3	0.488468
BMP1	0.481683

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

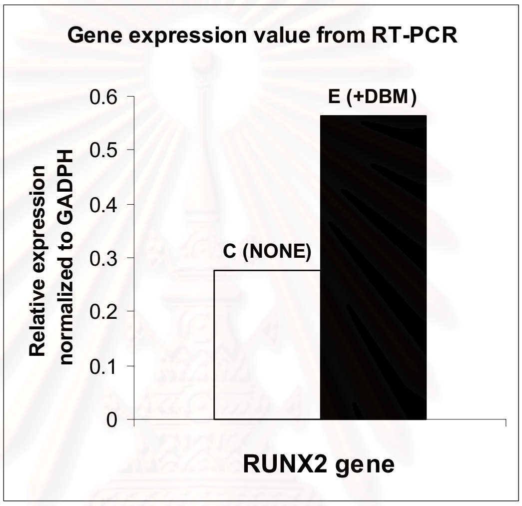
จากตารางที่ 8 ยีนที่มีการ up regulation ในระดับสูง (E/C Ratio มากกว่า 2.00) มีอยู่จำนวน 6 ยีน โดยยีน VDR มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด ในขณะที่ ยีน SMAD2 มีระดับการแสดงออกน้อยที่สุด ขณะที่ยีนที่มีการ up regulation ในระดับปานกลาง (E/C Ratio มีค่าอยู่ระหว่าง 1.00 – 2.00) มีอยู่จำนวน 37 ยีน โดยยีน ITGA1 มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด ในขณะที่ยีน MMP9 มีระดับการแสดงออกน้อยที่สุดในกลุ่มนี้

ส่วนยีนที่มีการ down regulation ในระดับสูง (E/C Ratio น้อยกว่า 0.50) มีอยู่ 2 ยีน คือ ยีน FGF3 มีระดับการแสดงออกต่ำที่สุด ในขณะที่ ยีน BMP1 มีระดับการแสดงออกน้อยที่สุดในกลุ่มนี้รองลงมา ขณะที่ยีนที่มีการ down regulation ปานกลาง (E/C Ratio มีค่าอยู่ระหว่าง 0.51-0.99) มีอยู่จำนวน 41 ยีน โดยยีน TGFBR2 มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในกลุ่ม ในขณะที่ ยีน BMP2 มีระดับการแสดงออกน้อยที่สุดในกลุ่มนี้

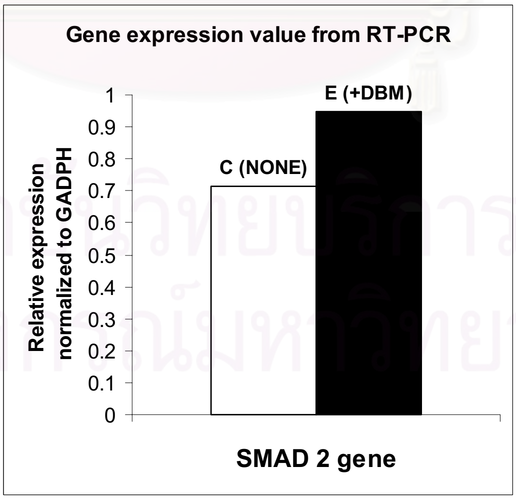


รูปที่ 33 แสดงผลการ run agarose gel electrophoresis ของ PCR product จากการทำ RT-PCR ของ total RNA ที่ได้จากเซลล์ MSCs (M = PCR marker, C = None, E = +DBM)

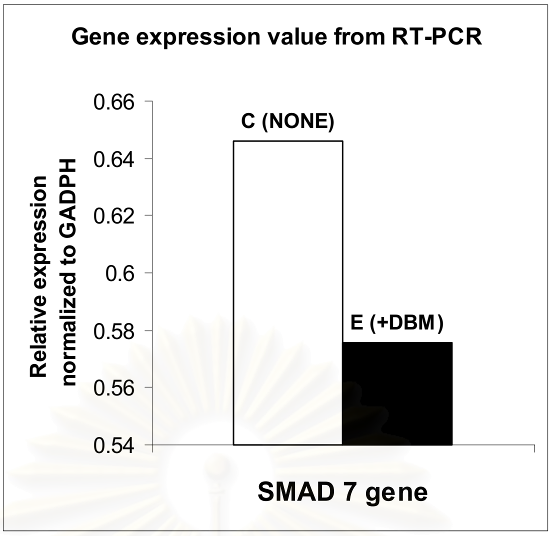
จากภาพที่ 33 แสดง product จากการทำ agarose gel electrophoresis จำนวน 3 lane โดย lane ที่หนึ่งจะเป็น PCR marker ที่มีการระบุตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับ PCR product lane ที่สองเป็น RT-PCR product จาก total RNA ของกลุ่มควบคุม ส่วน lane สุดท้ายเป็น RT-PCR product จาก total RNA ของกลุ่มทดลอง (+DBM) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ มาจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR มากกว่า 1 ครั้ง



(A)



(B)



(C)

รูปที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบ intensity ratio ของ agarose gel electrophoresis จากการทำ RT-PCR ของเซลล์ MSCsในกลุ่มยีนเดียวกัน

(A) แสดงระดับ Relative expression ของยีน Runx2 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ MSCs ในกลุ่มทดลอง (ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน) กับเซลล์ MSCs ในกลุ่มควบคุม ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ MSCsในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกมากกว่า

(B) แสดงระดับ Relative expression ของยีน SMAD2 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ MSCs ในกลุ่มทดลอง (ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน) กับเซลล์ MSCs ในกลุ่มควบคุม ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ MSCsในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกมากกว่า

(C) แสดงระดับ Relative expression ของยีน SMAD7 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ MSCsในกลุ่มกลุ่มทดลอง (ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน) กับเซลล์ MSCsในกลุ่มควบคุม ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ MSCsในกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกมากกว่า

จากรูปที่ 34 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ MSCs จาก Wharton’s jelly เมื่อ ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน กับกลุ่มควบคุม เทียบระหว่างวิธี cDNA array กับทำวิธี RT-PCR analyses พบว่าผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกัน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงผลของ demineralized bone matrix (DBM) ในการชักนำเซลล์ให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly จากสายสะดือรก ซึ่งสันนิษฐานว่ามีคุณสมบัติเป็น mesenchymal stem cells เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงทำการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) การศึกษา cell proliferation โดยการทำ growth curve การตรวจวัดตัวบ่งชี้ของเซลล์กระดูก (osteoblastic marker) โดยการย้อมด้วย alkaline phosphatase staining assay และการศึกษา in vitro alkaline phosphatase activity และพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของเซลล์ในระดับยีน โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธี cDNA array และเลือกยีนที่สนใจมาทำการยืนยันผลการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR analyses

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยง Wharton's jelly derived cells พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปดาวกระจายหรือกระสวย คล้ายลักษณะของ fibroblast cells ซึ่ง mesenchymal stem cells (MSCs) มีลักษณะดังกล่าวด้วยเช่นกัน ผู้วิจัยจึงพิสูจน์ด้วยวิธี in vitro functional mesenchymal stem cell identification พบว่า Wharton's jelly derived cells มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ MSCs จริง เนื่องจากสามารถชักนำให้ Wharton's jelly derived cells เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ adipocytes เซลล์ osteocytes และเซลล์ chondrocytes เมื่อได้รับ adipogenic differentiation medium, osteogenic differentiation medium, และ chondrogenic differentiation medium ตามลำดับ โดยการทดสอบด้วยวิธี immunocytochemistry และการย้อมสีที่จำเพาะต่อเซลล์ชนิดนั้น

ต่อจากนั้นจึงนำเซลล์ MSCs ที่แยกได้จากสายสะดือรกมาศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) เมื่อได้รับ DBM (ที่มีปริมาณแคลเซียมเหลืออยู่น้อยที่สุด จากการนำไปอยู่ใน 0.5 N HCl เป็นเวลา 8 ชั่วโมง) โดยเลี้ยงอยู่ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ ร่วมกับ α-MEM ที่มี 2%FBS พบว่ามีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงที่สุดประมาณวันที่ 5-7 ทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ DBM มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยกว่า จึงสรุปว่าอาจเกิดกระบวนการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts (osteoblastic differentiation) เนื่องจากเซลล์ที่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมี proliferation rate ลดลง (รูปที่ 28) ผู้วิจัยจึงทำการพิสูจน์ว่า

เกิดกระบวนการ differentiation ของเซลล์จริง โดยการตรวจวัด osteogenic marker ที่สำคัญ คือ alkaline phosphatase activity ด้วยวิธี histochemical และ biochemical assay

การตรวจวัดตัวบ่งชี้ของเซลล์กระดูก (osteoblastic marker) โดยการย้อมด้วย alkaline phosphatase staining assay พบว่า เซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM มีจำนวนเซลล์ลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteoblasts ซึ่งสังเกตได้จากการที่ลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็น cuboidal shape (รูปที่ 26B) และติดสีน้ำม่วงแดงของการย้อม alkaline phosphatase แสดงว่าเซลล์มีการแสดงออกของ alkaline phosphatase และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoblastic differentiation) ดังแสดงในรูปที่ 27B ส่วนการตรวจทาง biochemical assay คือ วัด activity ของ alkaline phosphatase ในวันที่ 3, 5, 7, และ 10 พบว่าเซลล์ MSCs ที่ได้รับ DBM มี activity สูงสุดในวันที่ 7 (รูปที่ 29) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นก็ลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น สรุปได้ว่าเซลล์ MSCs เมื่อได้รับ DBM มีการแสดงออกของ alkaline phosphatase activity จริง

จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ชนิดนี้ต่อไป ด้วยวิธี cDNA array โดยเลี้ยง MSCs ร่วมกับ DBM เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการแยก RNA ออกจากเซลล์ แล้วทำการเปลี่ยนเป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase หลังจากได้ cDNA probe ซึ่งติดฉลากด้วย biotin-16-dUTP จึงนำไปทำ hybridization กับชิ้นส่วนของ DNA จำเพาะที่อยู่บน array membrane (ที่มี osteogenesis gene จำนวน 96 ยีน internal control gene จำนวน 5 ยีน) พบว่ามี highly upregulation (E/C ratio มากกว่า 2.00) จำนวน 6 ยีน และ upregulation จำนวน 37 ยีน มียีนซึ่ง highly downregulation (E/C ratio น้อยกว่า 0.50) จำนวน 2 ยีน และ downregulation จำนวน 41 ยีน (ตารางที่ 8)

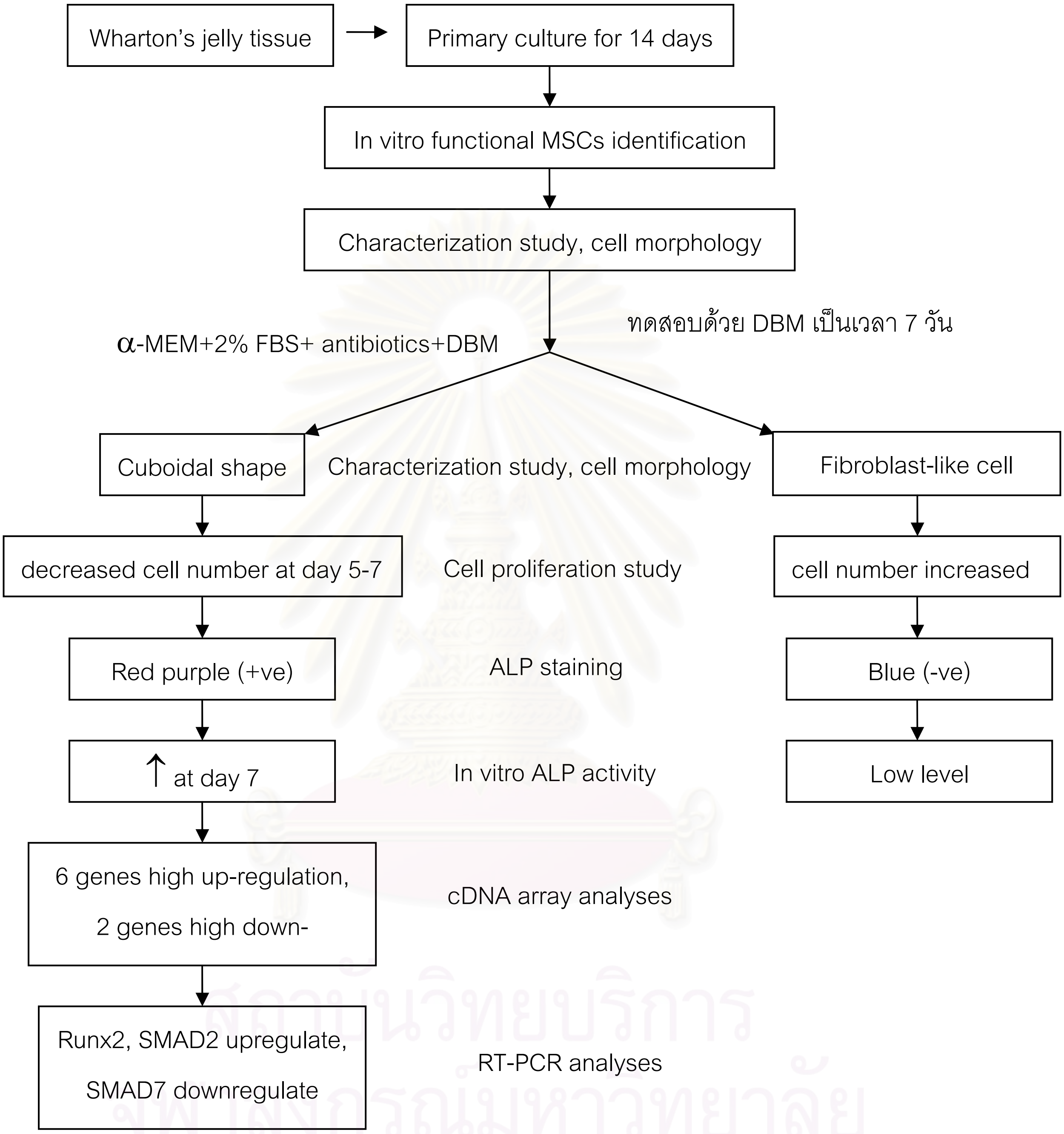
เลือกยีนที่สนใจและมีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างชัดเจน จำนวน 3 ยีน คือยีน Runx2, SMAD2, และ SMAD7 เพื่อนำ RNA มาทำ RT-PCR เพื่อยืนยันผลการแสดงออกของยีนว่าแตกต่างกันหรือไม่ โดยนำ PCR product มาทำ agarose gel electrophoresis แล้วหาค่า intensity ด้วยเครื่อง gel doc analyzer (ภาพของ gel แสดงในรูปที่ 33) ใช้ยีน GADPH เป็น internal control gene พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับการทำ cDNA array คือยีน Runx2 กับ SMAD2 นั้น upregulation ส่วน SMAD7 นั้น downregulation (รูปที่ 34)

โดยยีน Runx2 นั้นมีความสำคัญใน TGF-β signaling pathway ซึ่งเป็นวิถีที่สำคัญของ growth factor ที่สำคัญของการชักนำการสร้างกระดูกคือโปรตีน BMPs ซึ่งโปรตีน BMPs สามารถชักนำให้เซลล์ตั้งต้น เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกโดยผ่านกระบวนการ endochondral calcification หลังจากปลูกถ่ายลงในกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลอง

โปรตีน BMP-2 เป็นสารกระตุ้นชักนำให้มีการสร้างกระดูก (osteoinductive factor) และยังชักนำเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal cells) เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้ ในปัจจุบันมีการนำ BMPs มาศึกษาทางด้านออร์โธปิดิกส์ เช่น spinal fusion (ใช้ร่วมกับ titanium cages) osteonecrosis ของสะโพก และ fracture healing ทางด้านทันตกรรมนำมาใช้ฟื้นฟูภาะการสูญเสียกระดูกส่วน alveolar ในโรคปริทนต์ (periodontal diseases) เมื่อ BMPs จับกับ type I receptor จะกระตุ้นให้ type II receptor เข้ามารวมกันเป็น heterodimeric receptor complexes และกระตุ้นให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตบน receptor (autophosphorylation) จากนั้นส่งสัญญาณไปกระตุ้นโปรตีน SMADs BMPs type I receptor เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ SMAD2,3 ส่วน SMAD6,7 มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการดังกล่าว จึงจัดเป็น inhibitory SMADs ดังนั้น ยีน SMAD2 กับ SMAD7 จึงมีความสำคัญใน BMPs signaling pathway ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้น

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ อาจจะสามารถนำเซลล์ที่แยกสกัดได้จากเลือดสายสะดือรกมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความสามารถในการชักนำเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก (osteoinductivity) ของเนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix ในหลอดทดลอง (in vitro bioassay) ได้ในอนาคต

Demineralized bone matrix (DBM) เป็นวัสดุที่มีประสิทธิภาพ สำหรับนำมาใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทั้งในด้านโครงสร้างและหน้าที่กับกระดูกของผู้ป่วยเอง demineralized bone grafts ซึ่งได้จากกระดูกส่วน cortical bone และ cancellous bone สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในทางคลินิก เช่น ซ่อมแซมอาการบาดเจ็บของกระดูก ความผิดปกติชนิดต่างๆ รวมทั้งกระดูกหักที่ไม่เชื่อมติดกัน (nonunion fracture) เนื้องอกในกระดูก (bone cyst) และการทำศัลยกรรมใบหน้าและขากรรไกร (craniomaxillofacial reconstruction)[31-34] DBM เป็นวัสดุโครงร่าง (scaffold) ที่มีประสิทธิภาพสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีความสามารถในการค้ำจุนและชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) ใน matrix-incorporated osteoprogenitor สารโปรตีน bone morphogenetic proteins (BMPs) ที่สกัดได้จาก DBM สามารถชักนำให้มีการสร้างกระดูกใหม่ได้ (osteoinductivity) [35, 36] เซลล์ตั้งต้นของกระดูก (osteoprogenitor cells) จากไขกระดูกเมื่อรวมตัวกับ DBM สามารถส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกได้ดี ภายในบริเวณที่แหว่งหายไป (defect site) เมื่อเปรียบเทียบการให้ DBM เพียงอย่างเดียว [37, 38] นอกจากนี้การศึกษาในแหล่งของ osteogenic cells อื่นๆ เช่น bone marrow stromal cells แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ DBM ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ภายในบริเวณที่มีความผิดปกติของกระดูก (osseous defect)



รูปที่ 35 สรุปผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถนำชีววัสดุ (biomaterial) มาประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาทางคลินิกในการซ่อมแซมกระดูกโดยการรวมเข้าด้วยกัน (incorporation) ของ osteogenic cells และโครงร่าง (scaffold) [39] จึงต้องทำการศึกษาการกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic differentiation) ในระดับเซลล์ทดลองก่อนเข้าสู่ขั้นการศึกษาโดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง [40] การนำเซลล์เข้ามารวมกับวัสดุโครงร่างมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการรักษาภาวะผิดปกติทางกระดูกเนื่องจากมีโครงร่างให้เซลล์ได้เกาะและเจริญอยู่ภายใน และเมื่อทำการใส่ลงในบริเวณ defect site สามารถเกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ (new bone formation) [41] ผลเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก(osteogenic differentiation) ของเซลล์ใน biomaterial แล้วเซลล์กระดูกสามารถเจริญเต็มที่และมีกระบวนการสร้างกระดูกที่รวดเร็ว (rapid bone formation) DBM เป็นชีววัสดุธรรมชาติโดยเป็นโครงร่างให้การค้ำจุนและส่งเสริมให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกจึงสามารถเกิดการพัฒนาของเซลล์กระดูก (osteoblastic phenotype) และเกิดการสะสมของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (new bone matrix) [42]

การศึกษานี้ได้แสดงแนวทางเลือกหนึ่งในการแยก Wharton’s jelly derived cells จากสายสะดือรกได้อย่างรวดเร็ว จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphological transformation) จากรูปร่างคล้ายกระสวยแบบยาว (long spindle-like cells) มาเป็นแบบสี่เหลี่ยม (cuboidal-like cells) ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า DBM มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของ Wharton’s jelly derived cells ซึ่งพอสันนิษฐานได้โดยการชักนำให้เกิดกระบวนการ differentiation ของ Wharton’s jelly derived cells ในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) และยืนยันผลการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) ได้ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay

จากการศึกษาของ Dengshun Miao และคณะ (2002) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัด alkaline phosphatase (ALP) histochemistry จาก decalcified paraffin-embedded bone ของหนู (rodent) มีการตรวจวัด ALP activity ใน bone tissue อย่างกว้างขวางในเซลล์ pre-osteoblasts, เซลล์ osteoblasts, เซลล์ lining cells บนพื้นผิวของกระดูก trabecular, เซลล์ osteocytes, เซลล์ endosteal cells, และเซลล์ subperiosteal cells ในบริเวณที่เกิดการสร้างกระดูกใหม่ ALP activity ถูกตรวจวัดในบริเวณ osteoid โดยนำ bone tissue ไป fixed ใน periodate–lysine–paraformaldehyde (PLP) fixative, ทำการ decalcified ในสารละลาย EDTA-G solution, และฝัง (embed) ใน paraffin จากนั้นนำ bone tissue section ไปทำ deparaffinize แล้ว hydrated

โดยผ่าน xylene และ alcohol จากนั้น incubate ข้ามคืนในสารละลาย 100 mm Tris-maleate buffer (pH 9.2) ที่มี 1% magnesium chloride และ incubate อีก 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในสารละลาย ALP substrate solution (Tris-maleate buffer, naphthol AS-MX phosphate และ Fast Red TR) ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ section มา counterstain ด้วยสารละลาย Vector methyl green nuclear counterstain และ mount ด้วย Kaiser's glycerol jelly แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นว่าในบริเวณที่มีการสร้างกระดูกใหม่ (new bone formation) จะตรวจพบ ALP activity ในบริเวณที่มีเซลล์ osteoblasts, เซลล์ pre-osteoblasts รวมถึง osteoid โดยจะเห็นว่าติดสีม่วงแดง ซึ่งเป็นความสำเร็จครั้งแรกในการศึกษา ALP activity ด้วยวิธี visualized histochemistry ใน decalcified, paraffin-embedded mineralized tissue ซึ่งเทคนิคนี้สะดวกในการนำมาช่วยพิสูจน์เพื่อศึกษาพฤติกรรมของเซลล์ osteoblasts ในระหว่างกระบวนการ osteogenesis [22]

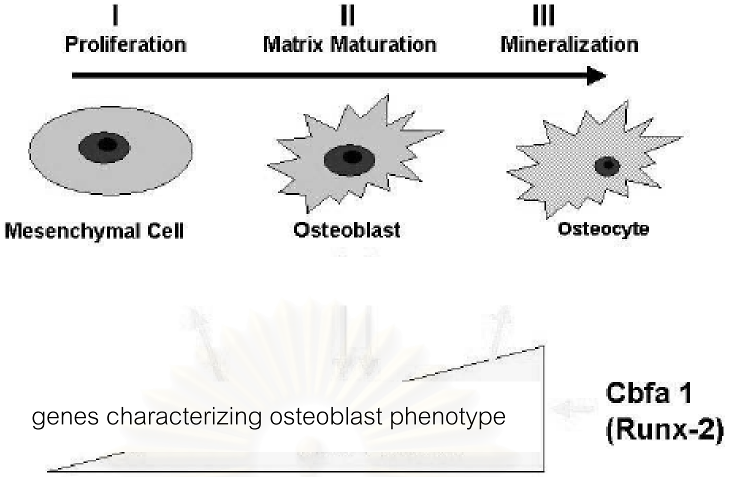
ในการศึกษา in vitro dose-response ของ DBM ที่ผสมกับ conditioned media (DBM-CM) ช่วยส่งเสริมระดับ alkaline phosphatase activity ของเซลล์ human periosteal ใน dose-dependent fashion พบว่าระดับ alkaline phosphatase activity ทั้งในการวิเคราะห์แบบ biochemical และ histochemical analysis เพิ่มสูงขึ้นใน flask ซึ่งได้รับ DBM-CM เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 5 วัน การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกิดกระบวนการ osteogenic differentiation ด้วยวิธี cDNA array analysis พบยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน เช่น ยีน biglycan, TGF-beta1, และ TGF-betaR1 นั้น up-regulated ในขณะที่ยีน collagen14A1 นั้น down-regulated เมื่อได้รับ DBM-CM [47]

เซลล์ osteoblasts ได้มาจากเซลล์ common progenitors ต่างๆ รวมทั้ง เซลล์ chondrocytes เซลล์ myocytes เซลล์ไขมัน adipocytes รวมถึงฮอร์โมนและ local factors ต่างๆ ที่ควบคุมกระบวนการ differentiation ของเซลล์เหล่านี้ ได้มีการทบทวนถึงการควบคุมกระบวนการ osteoblastic differentiation ซึ่งถูกควบคุมโดย local factors เช่น bone morphogenetic proteins (BMPs) กับ hedgehog (hhg) และ transcription factor เช่น Runx2 BMPs เป็น potent regulators ของกระบวนการ osteoblastic differentiation เป็นส่วนใหญ่ท่ามกลาง local factors ต่างๆ ซึ่ง Sonic และ Indian hedgehog ก็มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ osteoblastic differentiation โดยทำปฏิกิริยาร่วมกับ BMPs Runx2 เป็นสมาชิกของ runt domain gene family ซึ่งแสดงบทบาทสำคัญในกระบวนการกำหนด osteoblast cell lineage และการเจริญเต็มที่ของเซลล์ osteoblasts Runx2 เป็น transcription factor ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการ osteoblastic differentiation และกระบวนการสร้างกระดูก

(bone formation) เนื่องจากในหนูที่ขาดยีน Runx2 นั้นจะขาด bone formation จนถึงการยับยั้งการเจริญเต็มที่ของเซลล์ osteoblasts อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าการควบคุมกลไกการแสดงออกของยีน Runx2 นั้นยังไม่กระจ่างเท่าไรนัก ส่วน BMPs เป็น local factors ที่สำคัญซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีน Runx2 ดังนั้น ปฏิกิริยาซึ่งใกล้ชิดกันระหว่าง local factors เช่น BMPs และ hedgehog กับ transcription factor คือ Runx2 มีความสำคัญต่อกระบวนการ osteoblastic differentiation และกระบวนการ bone formation [51]

เนื้อเยื่อกระดูก (skeletal tissue) นั้นประกอบไปด้วย mesenchymal cells หลายชนิด เช่น เซลล์ osteoblasts เซลล์ chondrocytes เซลล์ myoblasts เซลล์ bone marrow stromal cells รวมถึงเซลล์ adipocytes เซลล์ไลน์เหล่านี้เชื่อว่ามีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ common mesenchymal progenitors ที่เรียกว่า pluripotent mesenchymal stem cells เมื่อเซลล์ progenitors เหล่านี้มี specific phenotype ที่แสดงถึงการเจริญเต็มที่ ระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (differentiation) เซลล์ osteoblasts มีการแสดงออกของ phenotypic markers ที่หลากหลาย เช่น มีระดับ alkaline phosphatase activity สูง มีการสังเคราะห์ collagenous และ noncollagenous bone matrix proteins รวมทั้ง osteocalcin หน้าที่สำคัญส่วนใหญ่ของเซลล์ osteoblasts คือสร้าง mineralized bone เซลล์ osteoblasts มีการแสดงออกของ receptors ต่อฮอร์โมนที่หลากหลาย เช่น PTH, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 (1α,25$(OH)_2D_3$), estrogen, และ glucocorticoids ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการ osteoblastic differentiation local factors ที่หลากหลายจาก paracrine และ autocrine fashion เพื่อสำรวจบทบาทของฮอร์โมนเหล่านี้และ local factors ในกระบวนการ osteoblastic differentiation เปลี่ยนแปลงเป็น osteoblastic cell lines ได้สำเร็จ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ multipotent mesenchymal progenitors เพื่อศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ osteoblasts ในระดับ *in vitro* โดยแท้จริงแล้ว มีนักวิจัยหลายกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์หลายชนิด เพื่อแสดงให้เห็นว่า BMPs เป็น local factors ที่มีอำนาจมากในการควบคุมกระบวนการ osteoblastic differentiation [51]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

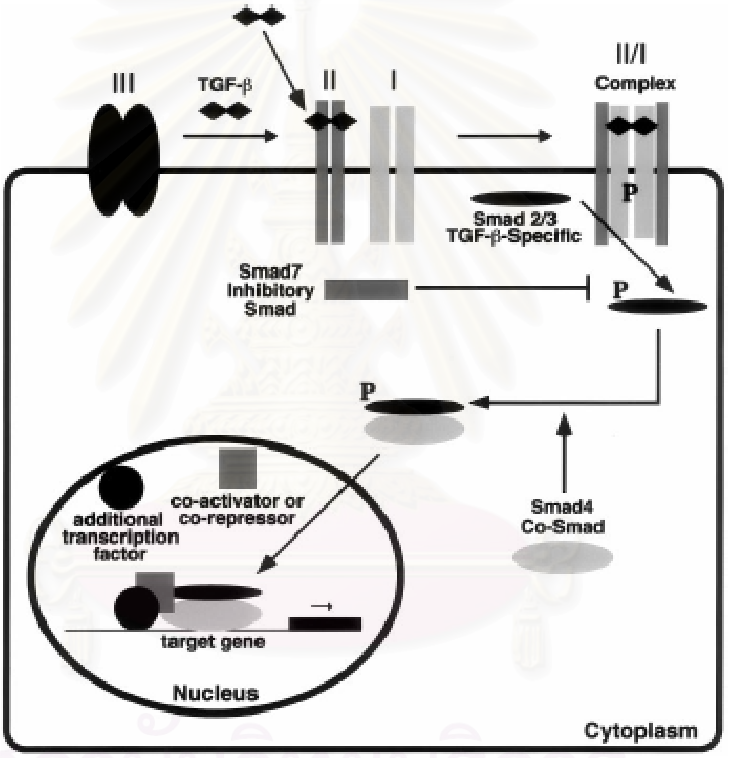


รูปที่36 แสดง Runx-2 เป็น transcription gene สำหรับยีน osteocalcin ซึ่งสังเคราะห์โดยเซลล์ mature osteoblasts ในระยะต้นของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation stage) ยีน osteocalcin ส่งเสริมการเจริญเต็มที่ของ mesenchymal precursor cells ไปเป็นเซลล์ osteoblasts ในช่วงสุดท้ายของระยะสะสมแร่ธาตุ (mineralization stage) ระดับของ osteocalcin ที่สูงจะยับยั้งกระบวนการ mineralization ของเซลล์ osteocytes

โปรตีน osteocalcin นั้นสังเคราะห์โดยเซลล์ osteoblasts ซึ่งถือเป็น osteoblast-specific gene ที่แท้จริง และสนับสนุนหน้าที่การควบคุมเซลล์ osteoblasts อย่างเด็ดขาด โดย osteocalcin มีบทบาทหลักในระหว่างการพัฒนาเซลล์ MSCs ไปเป็นเซลล์ osteoblasts และ osteoid ในระยะต้นของกระบวนการ osteoblastic differentiation ความเข้มข้นของ osteocalcin ในระดับต่ำ ส่งเสริมการเจริญเต็มที่ของ MSCs ไปเป็นเซลล์ osteoblasts จนกระทั่งระยะสุดท้ายของกระบวนการ mineralization ระดับของ osteocalcin ที่สูงจะยับยั้งกระบวนการสร้างกระดูก (ossification) และการรวมกลุ่มของเซลล์ osteocytes ซึ่งเจริญเต็มที่ (รูปที่ 36) [50]

การแสดงออกของยีน osteocalcin นั้นถูกควบคุมโดย osteoblast-specific transcription factor ที่รู้จักกันดีคือ Runx2 ซึ่งมีการแสดงออกในระยะต้นระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ osteoblasts Runx2 ควบคุมการแสดงออกของยีนที่แสดงคุณลักษณะของ osteoblast phenotype เช่น ยีน osteocalcin, osteopontin, type 1 collagen, bone sialoprotein, และ collagenase-3 มีการทดลอง knockout ยีน Runx2 ในหนู (mice) พบว่ากระบวนการ bone formation มีความเสียหายทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเป็นเซลล์ osteoblasts ที่สมบูรณ์ ส่วนในหนูที่ไม่มียีน Runx2 (null mice Runx2 (-/-)) นั้นขาด mineralized tissue โดยสมบูรณ์และตายหลังจากเกิดได้ไม่นาน ขณะที่หนูซึ่ง knockout ยีนเพียงครึ่งเดียว (Runx2(+/-)) ยังคงรอดชีวิตแต่จะมีกระดูกผิดรูปร่างอย่างรุนแรง ซึ่งเปรียบเทียบได้กับโรค cleidocranial

dysplasia ในมนุษย์ เป็น genetic bone disease ซึ่งจะพบความผิดปกติในกระดูกส่วน clavicle, patent cranial suture และ fontanelle, supernumerary teeth, short stature, และการเปลี่ยนแปลงของกระดูกส่วนอื่นๆ และในทางตรงกันข้าม การแสดงออกมากเกิน (overexpression) ของยีน Runx2 ในเซลล์ osteoblasts จะยับยั้งการเจริญเต็มที่ และเป็นสาเหตุของโรคกระดูกมีความหนาแน่นน้อยลง (osteopenia) รวมถึง multiple fracture ในสัตว์ จึงสรุปได้ว่าการยับยั้ง osteoblast core proteins (osteocalcin และ Runx2) นั้นมีผลตอบสนองต่อกระบวนการ osteoblastic differentiation และ maturation ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถชี้แนะว่าความสมดุลของยีน Runx2 มีความจำเป็นสำหรับ physiological bone formation [49]



รูปที่ 37 แสดงวิถี TGF-β signaling pathway โดยทั่วไป หลังจากที่ TGF-β ได้ผ่านการกระตุ้น ก็จะไปจับ (bind) กับ type II receptor (II) ในบางเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง TGF-β2 ซึ่งปฏิกิริยานี้ได้รับการส่งเสริมโดย type III receptor คือ betaglycan (III) การจับกันของ TGF-β เป็นผลให้เกิดการรวมตัวหรือคงที่ (stabilization) ของ complex ของ type I กับ II receptors (II/I) และ type II จะเติมหมู่ฟอสเฟต (kinase phosphorylate) รวมทั้งกระตุ้น type I receptor (I) เมื่อมีการกระตุ้น type I receptor kinase phosphorylates receptor-specific Smads ในวิถี TGF-β pathway เช่น Smad2 และ Smad3 ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถยับยั้งได้โดย Smad7 Phospho-Smad2 และ 3 จะรวมตัวกันเป็น complex กับ co-Smad (คือ Smad4) และเคลื่อนไปยังนิวเคลียส ซึ่งพวกมันอาจจะทำปฏิกิริยากับ transcription factors ตัวอื่นๆ หรือ coactivators และ corepressors เพื่อควบคุมกระบวนการ transcription ดังนั้น Smads และ nuclear factors ต่างๆ อาจจะจับกับ DNA โดยตรงหรือไม่ก็ได้ [48]

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาตั้งแต่มีการโคลน TGF-β receptor เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็น signaling pathway ทั่วไปที่ง่าย ไม่ยุ่งยากจาก ligand สู่กระบวนการ transcription นั้นมีความชัดเจน (รูปที่ 37) TGF-β ซึ่งผ่านการกระตุ้น receptor ของตัวเอง ทำให้เกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ receptors และคล้ายคลึงกันใน cytoplasmic Smad proteins กับ Smad complex ซึ่งเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสเช่นเดียวกับ transcriptional regulators [48]

กลุ่มของ Smad proteins ประกอบไปด้วย cytoplasmic TGF-β signaling machinery receptor-activated Smads สำหรับ TGF-β คือ Smad2 และ Smad3 ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดย TbRI บนลำดับ carboxy-terminal SSXS sequences โปรตีน Smads ซึ่งถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเหล่านี้จะรวมตัวกันเป็น heteromeric complex ร่วกับ co-Smad คือ Smad4 และเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียส ตัวยับยั้ง inhibitory Smads แสดงในวิถี TGF-β signaling คือ Smad7 ทำให้ขาด carboxy-terminal phosphorylation motif ของ Smad2 และ Smad3 แต่ทำปฏิกิริยากับ TbRI และ receptor-activated Smads ซึ่งยับยั้งวิถี ซึ่งการแสดงออกของ Smad7 expression นั้นถูกชักนำโดย TGF-β ทำให้เกิดการ downregulation ของ TGF-β response อย่างรวดเร็ว [48]

กล่าวโดยสรุป สายสะดือรกเป็นอวัยวะที่น่าสนใจและเป็นความหวังในการนำแหล่งของเซลล์เหล่านี้สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาวิธีการรักษาด้วยเซลล์ (cell-based therapy) และการนำประยุกต์ใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ผลการทดลองนี้สนับสนุนศักยภาพในการเจริญเป็นกระดูกในเซลล์ทดลอง (*in vitro*) ที่ได้จากสายสะดือและความสามารถของ DBM ในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของ Wharton’s jelly derived cells ซึ่งอาจนำมาซึ่งความรู้ใหม่ในการรักษาโรคกระดูก (bone reconstruction therapy) และเป็นรูปแบบการทดลองสำหรับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในการศึกษาขั้นตอนการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic pathway) ในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง *(in vitro)* ได้เป็นอย่างดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ปัญหาที่พบได้บ่อยจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาคือการปนเปื้อนติดเชื้อในแบคทีเรียและเชื้อราในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (contamination) จึงจำเป็นที่จะต้องมีขั้นตอนวิธีการที่ปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว (sterilization) และใช้ยาต้านเชื้อโรคและเชื้อรา (antibiotics)

จากประสบการณ์ของผู้วิจัยที่ผ่านมา พบว่า Wharton's jelly derived cells เลี้ยงใน Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) เสริมด้วย 10% FBS นั้นปรากฏว่าเซลล์ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเห็นลักษณะฝ่อและสลายของเซลล์อย่างชัดเจน ซึ่งการเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ใน α -MEM เสริมด้วย 10% FBS จะมีความเหมาะสมกว่า

จากผลงานวิจัย พบว่า DBM มีศักยภาพในการชักนำเซลล์ MSCs จาก Wharton's jelly tissue ให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts ได้ จึงควรนำไปศึกษาในเซลล์ไลน์กลุ่มอื่น หรือแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ รวมทั้งค้นหาวัสดุหรือสารชนิดอื่นๆ เพื่อมาชักนำเซลล์ MSCs ให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ osteoblasts ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Data monitor. Chapter 4: Bone Tissue Engineering Medimonitor-Special Millennium Edition. 2000 : 19-32.
2. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี . แผนยุทธศาสตร์โลหะและวัสดุแห่งชาติ พ.ศ. 2548-2557 ยุทธศาสตร์ที่ 4 : เทคโนโลยีวัสดุเพื่อพัฒนาการแพทย์และสาธารณสุข ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) (เอกสารเผยแพร่). กรุงเทพฯ : เอ็มเทค, พ.ศ. 2548.
3. Hosny, M., and Sharawy, M. Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofac Surg 1985 (43) : 837-44.
4. Andrades, J.A., et al. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. Int J Dev Biol 2001 (45) : 689-693.
5. Rosada, C., et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. Calcif Tissue Int 2003 (72) : 135-42.
6. Yamaguchi, A., and Komori, T., and Suda, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev 2000 (21) : 393-411.
7. Sobolewski, K., and Bankowski, E., and Chyczewski, L., et al. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. Biology of the neonate 1997 (71) : 11-21.
8. Mc, E.KD., et al. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochemical Society transactions 1991 (19) : 29S.
9. Parry, E.W. Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. The American journal of anatomy 1970 (107) : 505-18.
10. วินิดา บัณฑิต, อรศรี รมยะนันทน์ และสุจินต์ อึ้งถาวร. วิทยาฮิสโต1 : เซลล์และเนื้อเยื่อพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่3.กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.
11. Timothy, R.A., and Henderson, B. Methods in Bone Biology. London : Chapman & Hall, 1998.

12. สมปอง สรวมศิริ, วิโรจน์ จันทรัตน์. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง Anatomy and Physiology of Farm Animals. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้, พ.ศ. 2540.

13. สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์ (Essential Molecular Genetics). พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, พ.ศ. 2548

14. Urist, M.R. Surface-decalcified allogenic bone (SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyophilized bone implants. Clin. Orthop. 1968 (56) : 37-50.

15. Urist, M.R., et al. A bone morphogenetic polypeptide. Cacif Tissue Res 1976 (21) : 81-87.

16. Urist, M.R. Bone Morphogenetic protein, bone regeneration, heterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. Bone and Mineral Research 1989 (16) : 57-111.

17. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. Science 1965 (150) : 893-899.

18. Reddi, A.H., and Weintroub, S., and Muthukumaran, N. Biologic principles of bone induction. Orthop Clin North Am 1987 (18) : 207-212.

19. Reddi, A.H. Implant-stimulated interface reactions during collagenous bone-matrix-induced bone formation. Implant. J Biomed Mater Res 1985 (19) : 233-239.

20. Young, M.F., et al. Structure, expression and regulation of the major non collagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop 1992 (281) : 275-294.

21. Arnold, I.C., and Scott, P.B. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the21st century. Trends in Molecular Medicine 2001 (7) : 259-264.

22. Miao, D. Histochemical Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Decalcified Bone and Cartilage. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2002 (50) : 333-340.

23. ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องของแพทย์โรงพยาบาลรามาธิบดี. 2006. Stem cell [Online] Available from: http://www.amtt.org/ [2006, October 9]

24. JOSE, J.M., et al. MINIREVIEW : Mesenchymal Stem Cells. Exp Biol Med 2001 Vol. 226(6) : 507–520.

25. Hosny, M., and Sharawy, M. Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofac Surg 1985 (43) : 837-44.

26. Andrades, J.A., et al. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. Int J Dev Biol 2001 (45) : 689-693.

27. Zhou, S. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges. Cell and Tissue Banking 2005 (6) : 33-44.

28. George, R.B., Jr., and Zerler, B., and Moran, E. Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation. Cell Growth & Differentiation 2001 (12) : 61–83.

29. Wang, H.S. et.al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. Stem Cells 2004 (221) : 1330–1337.

30. Zhou, S. et al. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges. Cell Tissue Bank 2005 ; 6(1) : 33–44.

31. Delloye, C., et al. Induced healing of aneurysmal bone cysts by demineralized bone particles. A report of two cases, Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 1996;115:141-5.

32. Rosenthal, R.K., and Folkman, J., and Glowacki, J., Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cytes, and fibrous lesions, Clinical orthopaedics and related research 1999;364:61-9.

33. Kubler, N., and Michel, C., and Zoller, J., et al, Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants, Journal of cranio-maxillo-facial surgery 1995;23:337-46.

34. Mulliken, J.B., et al. Use of demineralized allogrneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities, Annals of surgery 1981;194:366-72

35. Honsawek, S., and Powers, R.M., and Wolfinbarger, L., Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model, Cell and tissue banking 2005;6:13-23.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

36. Honsawek, S., and Dhitiseith, D., "Content of bone morphogenetic protein-4 in human demineralized bone: relationship to donor age and ability to induce new bone formation, J Med Assoc Thai 2005;88 S4:S260-5.

37. Tiedeman, J.J., and Garvin, K.L., and Kile, T.A., Connolly JF, The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects, Orthopedics 1995;18:1153-8.

38. Rougraff, B.T., and Kling, T.J. Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow, J Bone and Joint Surg. American volume 2002;84A:921-9.

39. Petite, H., et al. Tissue-engineered bone regeneration, Nature biotechnology 2000;18:959-63.

40. Breitbart, A.S., et al., Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells, Plastic and reconstructive surgery 1998;101:567-74.

41. Bruder, S.P., and Fox, B.S., "Tissue engineering of bone: Cell based strategies, Clinical orthopaedics and related research 1999;367S:S68-83.

42. Ishaug, S.L., et al., Bone formation by three-dimentional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds, Journal of biomedical materials research 1997;36:17-28.

43. Aubin, J.E., and Kahn, A. The osteoblast lineage: Embryologic origins and differentiation sequence, in Favus MJ (ed): Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ed 3. Philadelphia : PA Lippincott-Raven, 1996. p 36.

44. Franceschi, R.T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10(1) : 40-57.

45. Lian, J.B., and Steim, G.S. Development of the osteoblast phenotype: Molecular mechanism mediating osteoblast growth and differentiation. Iowa Orthop J 1995; 15 : 118-140.

46. Jakubowski, H. CHAPTER3 - NUCLEIC ACIDS .BC Online 3C Language of DNA [Online] Available from:

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/ oldnalanguage .html [2007, mar 8]

47. Honsawek, S. The quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix and cDNA array analysis of osteogenic differentiation in human periosteal cells. Doctoral dissertation, Biomedical Sciences Program, Old Dominion University, 2003.

48. Rebecca, G.W. Fibrogenesis V. TGF-b signaling pathways .Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G845–G850, 2000.

49. Alexander, E., et al. Cbfa-1 (Runx-2) and Osteocalcin Expression by Human Osteoblasts in Heparin Osteoporosis in Vitro, Clin Appl Thromb Hemost 2006; 12; 465

50. Franceschi, R.T. Role of Cbfa1 in Ameloblastin Gene Transcription. Crit Rev Oral Biol Med 10(l): (1999) 40-57.

51. Akira Yamaguchi, Toshihisa Komori and Tatsuo Suda. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. Endocrine Reviews 21 (4) 2000 : 393-411.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

เรื่อง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือ

คณะผู้วิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการศึกษา การแสดงออกของยีนที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งได้ดำเนินการวิจัยโดยการใช้วิธีการอณูชีววิทยาศึกษาความเป็นไปได้ในเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือ โดยการวิจัยดังกล่าวไม่มีผลประโยชน์ในทางเศรษฐกิจใดๆ ทั้งสิ้น ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาจะสามารถนำข้อมูลมาอธิบายองค์ประกอบของยีนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์กระดูกในเซลล์ต้นกำเนิด กลไกของการเจริญของเซลล์กระดูก และพัฒนาการรักษาเพื่อชักนำเสริมสร้างกระดูก

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจและสามารถบอกเลิกการเข้าร่วมวิจัยนี้ได้ตลอดเวลา

ในการวิจัยนี้จะมีการเนื้อเยื่อและการเก็บเลือดจากสายสะดือรกหลังคลอดในปริมาณ 10-20 มิลลิเมตร ผู้วิจัยได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจว่าการเก็บเนื้อเยื่อและเลือดจากสายสะดือรกหลังคลอดจะไม่มีอันตรายใดๆ ต่อข้าพเจ้าและทารกของข้าพเจ้า

ผู้วิจัยรับรองว่าจะใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดจากสายสะดือรกหลังคลอดของข้าพเจ้าอย่างเป็นประโยชน์ที่สุด และใช้เฉพาะในโครงการวิจัยนี้เท่านั้น กรณีมีตัวอย่าง ดีเอ็นเอ (DNA) เหลือจากการวิจัย ผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่าง DNA ไว้ไม่เกิน 1 ปี และถ้าผู้วิจัยต้องการจะใช้ในการวิจัยอื่น ผู้วิจัยจะต้องแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบพร้อมทั้งได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าก่อนจึงจะใช้ตัวอย่าง DNA ในโครงการวิจัยอื่นได้ ถ้าตัวอย่าง DNA มีอายุเกิน 1 ปีจะถูกทำลายทิ้งไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย โดยไม่มีการเปิดเผยชื่อของท่าน หากท่านมีข้อสงสัยประการใด สามารถติดต่อสอบถามคณะผู้วิจัยที่ นพ. วรพงศ์ ภู่พงศ์ โทร 02-256-4164 ต่อ 223 หรือ นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก โทร 02-256-4482

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจและยินดีที่จะเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในการศึกษาวิจัยนี้ และได้ลงนามในใบยินยอมด้วยความสมัครใจ

ลงชื่อ .... ผู้ยินยอม

(...)

วันที่ .... เดือน .... พ.ศ. ....

ลงชื่อ .... ผู้รับผิดชอบโครงการ

(...)

วันที่ .... เดือน .... พ.ศ. ....

ลงชื่อ ....พยาน

(...)

วันที่ .... เดือน .... พ.ศ. ....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมี

สูตรการคำนวณความเข้มข้นสารละลายจากสารละลายเข้มข้น

ใช้สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นเดิม V_1 = ปริมาตรสารละลายเดิมที่ตักหรือแบ่งมา

N_2 = ความเข้มข้นที่เจือจางแล้ว V_2 = ปริมาตรทั้งหมดรวมทั้งน้ำและเนื้อสาร

1. การเตรียมสารละลาย 0.5 N HCl (จาก conc.HCl ความเข้มข้น 37.1 Molar)

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

(37.1 Molar) (V_1) = (0.5 Molar) (1000 ml)

ดังนั้น V_1 = 13.48 ml

หมายถึง ตวง concHCl มา 13.48 ml แล้วเติม dH_2O ให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 ml

2. การเตรียมสารละลาย 70% Ethanol (EtOH) จาก absolute Ethanol (95%)

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

(95%) (V_1) = (70%) (1000 ml)

ดังนั้น V_1 = 736.84 ml

หมายถึง ตวง absolute Ethanol มา 736.84 ml แล้วเติม dH_2O ให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 ml

3. การเตรียม cell culture medium (α-MEM) ที่มีส่วนผสมของ penicillin (100 unit/ml) / streptomycin (50 μg/ml) กับ 10% FBS

เติม FBS	10	ml
เติม α-MEM	90	ml

จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย pipette แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

4. 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 (20 X PBS)

ชั่ง Na_2HPO_4 anhydrous	1.48 g
ชั่ง KH_2PO_4 anhydrous	0.43 g
เติม NaCl	7.2 g

ปรับค่า pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1 M HCl เติม dH_2O ให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave

5. 1X PBS 1 liter

เติม 10X PBS 20 ml

เติม dH2O 980 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป autoclave

6. 0.1% (v/v) DEPC-treated water

เติม DEPC solution 2 ml ลงใน dH_2O 2 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้หนึ่งคืน แล้วนำไป autoclave

7. 10X Formamide agarose (FA) gel buffer, pH 7.0 (200 mM MOPS, 50 mM Sodium acetate, 10 mM EDTA)

ชั่ง MOPS (free acid) 41.86 g Sodium acetate 4.10 g และ EDTA.$2H_2O$ 3.72 g

ปรับค่า pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติม DEPC treated H_2O ให้ครบ 1 ลิตร

8. 1X Formaldehyde agarose (FA) gel running buffer

เติม 10X FA gel buffer 100 ml

เติม 37% (12.3 M) Formaldehyde 20 ml

เติม DEPC treated H_2O ให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

9. 5X loading buffer (เก็บไว้ได้ 3 เดือน ที่ 4 °C)

เติม 10X Formaldehyde agarose (FA) gel buffer	4 ml
เติม 100% Glycerol	2 ml
เติม Formamide	3,084 μl
เติม 500 mM EDTA, pH 8.0	80 μl

เติม bromophenol blue แล้วเติม DEPC treated H_2O ให้ครบ 10 ml

10. 1.2% Formamide agarose (FA) gel solution

เติม agarose powder 0.36 g

เติม 10X Formamide agarose gel buffer 3 ml

เติม DEPC treated H_2O 30 ml แล้วอุ่นด้วย microwave จนละลายหมด รอจนอุณหภูมิเหลือ 65 °C แล้วเติม 37% Formaldehyde 540 μl ผสมให้เข้ากัน รอให้เย็นแล้วจึงเทลงแม่พิมพ์

11. Tris-acetate-EDTA buffer (50x TAE) pH 7.6-7.8

ชั่ง Tris-HCl	240 g
เติม Glacial acetic acid	57.1 ml
เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

ปรับ pH ให้ได้ 7.6-7.8 ด้วย 1 HCl แล้วเติม dH2O ให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

12. 1X Tris acetate EDTA (TAE) buffer

เติม 50X TAE	20	ml
เติม dH_2O	980	ml

13. 2% (w/v) agarose gel

ชั่ง Agarose powder	2	g
เติม 1X TAE	100	ml

ใส่ลงใน flask ผสมให้เข้ากันทำให้ร้อนด้วยไมโครเวฟจน agarose จะละลายหมด

14. 2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.4) (0.15M)

ชั่ง 2-amino-2-methyl-1-propanol 1.41 g (1.41 ml)

เติม 2-amino-2-methyl-1-propanol ลงใน ultrapure dH2O ปรับ pH ให้ได้ 10.4 ด้วย 1 N HCl เติมน้ำให้ครบ 100 ml

15. Para-Nitrophenol (pNP)

ชั่ง p-Nitrophenol	13.9 mg
เติม 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer	50 ml

แบ่ง aliquot หลอดละ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C

16. p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) (100mM)

ชั่ง pNPP	0.658 g
เติม 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer	25 ml

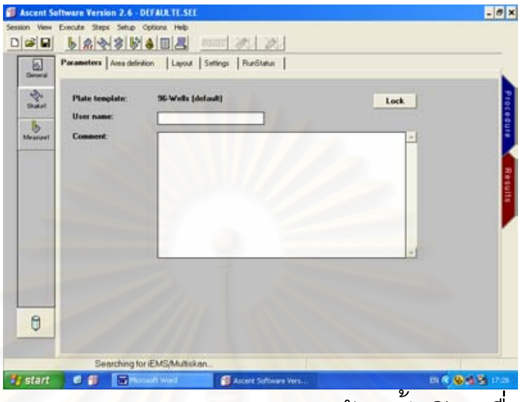
17. 10N NaOH

ชั่งNaOH 40 g

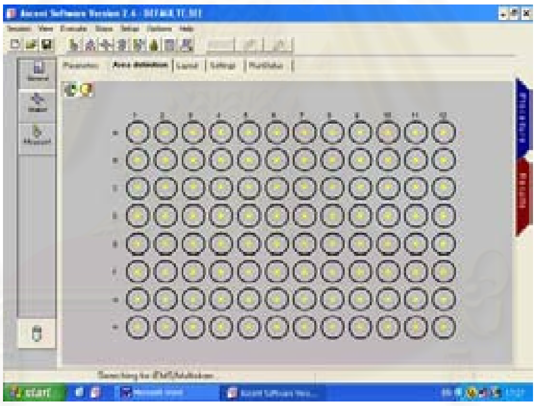
เติม dH2O ให้ได้ปริมาตร 100 ml

ภาคผนวก ค.

แสดงขั้นตอนการอ่านค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง Multiscan **ด้วยโปรแกรม** Ascent Software **ในการทดสอบ** alkaline phosphatase activity **ของ** mesenchymal stem cells **จาก** Wharton's jelly tissue **เมื่อได้รับ** DBM **ในวันที่** 0, 3, 5, 7 **และวันที่** 10

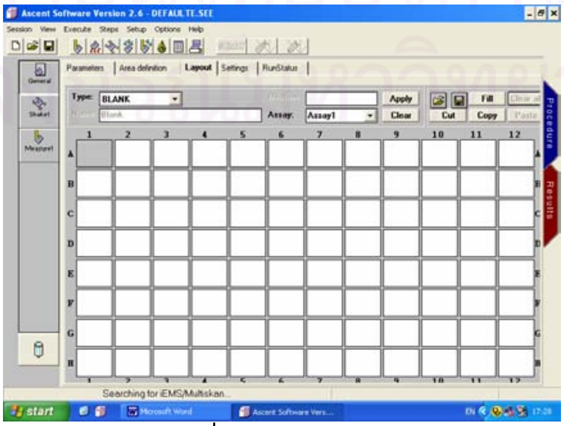


ขั้นที่ 1 เรียกโปรแกรม Ascent Software for Multiskan พร้อมทั้งเปิดเครื่อง Multuskan เพื่ออุ่นเครื่อง เมื่อโปรแกรมขึ้นมาแล้ว ไปที่ Parameter อ่านค่าที่ general 96 wells

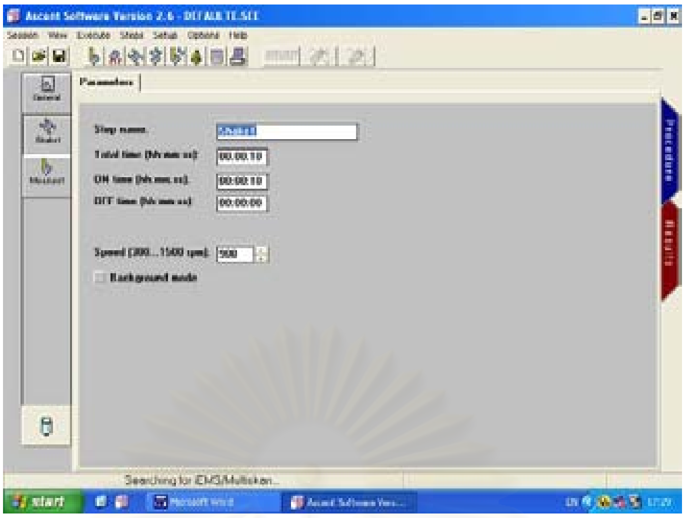


ขั้นที่ 2 กำหนดช่องที่จะทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (ช่องสีเหลือง คือ well ที่จะอ่านค่าการดูดกลืนแสง ขณะที่ช่องสีดำคือไม่อ่าน)

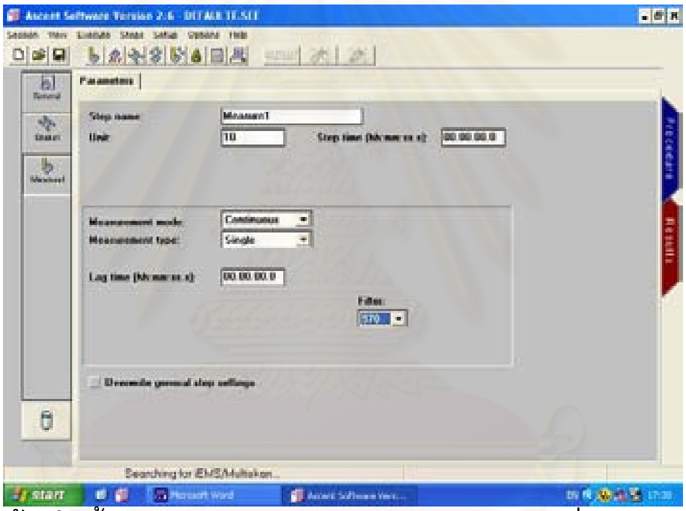
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



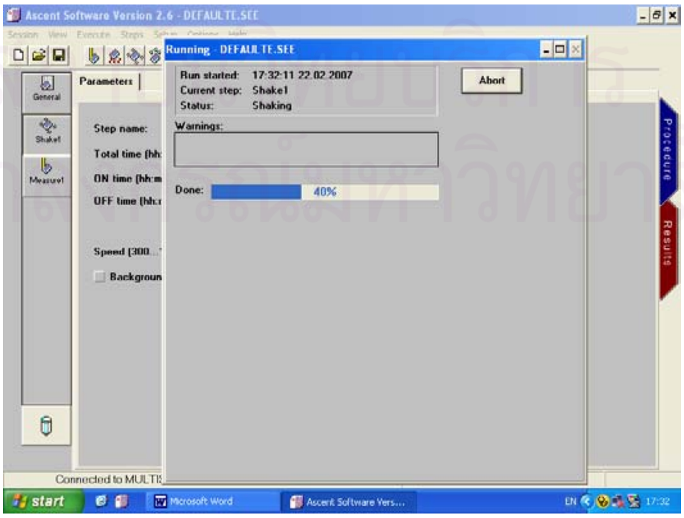
ขั้นที่ 3 ตั้งชื่อให้กับแต่ละช่อง well ที่จะอ่านค่าการดูดกลืนแสง (เช่น blank, sample)



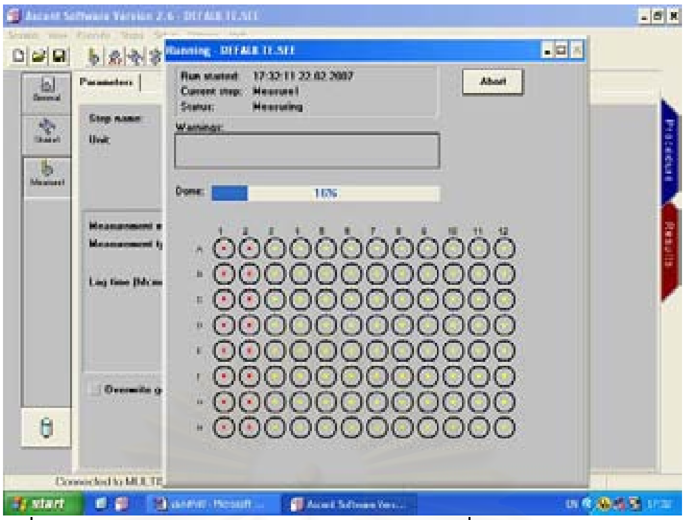
ขั้นที่4 ตั้งเวลาและให้ shake plate (เขย่า) 10 วินาที ก่อนวัดค่าการดูดกลืนของแสง



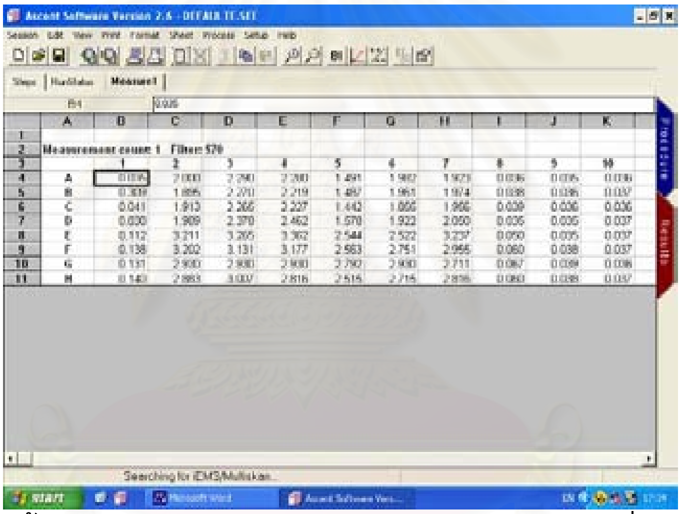
ขั้นที่5 ตั้งโปรแกรมให้อ่านค่าการดูดกลืนของแสงที่ 570 nm



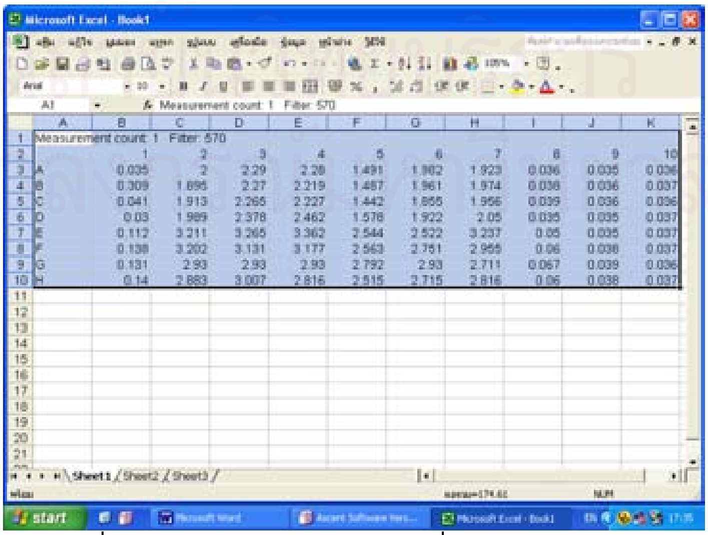
ขั้นที่6 โปรแกรมเตรียมความพร้อมก่อนการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (รอจนครบ 100%)



ขั้นที่7 เริ่มอ่านค่าการดูดกลืนของแสง รอจนเครื่องอ่านค่าได้ครบทุก well



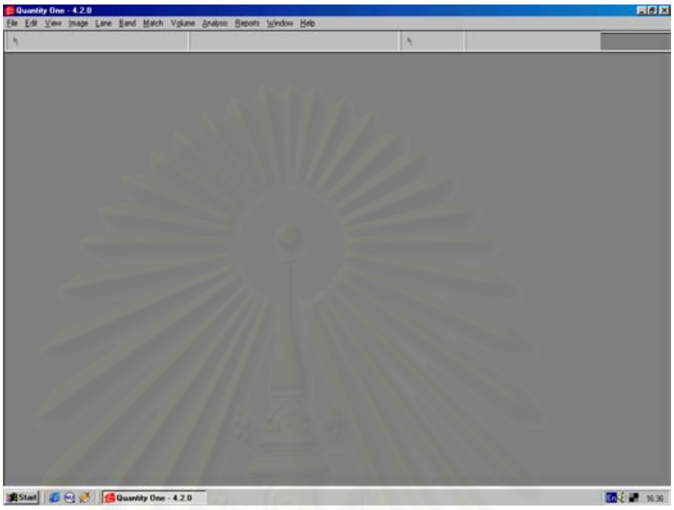
ขั้นที่8 แสดงผลของค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละ well ที่ได้



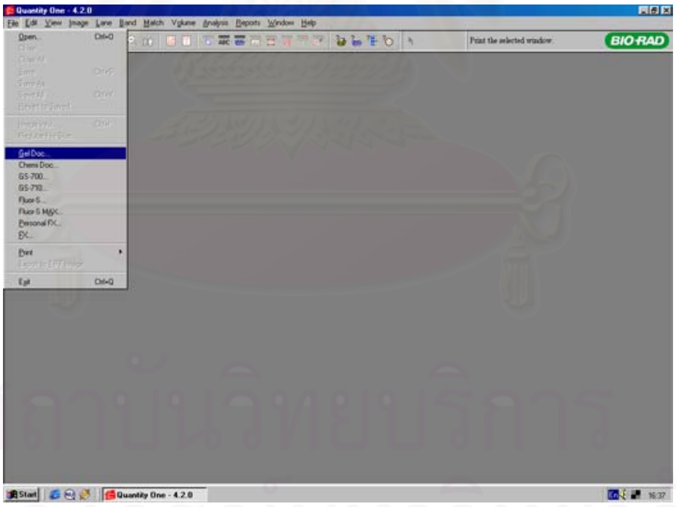
ขั้นที่ 9 คัดลอกผลที่ได้มาลงในโปรแกรม excel เพื่อทำการคำนวณ standard graph

ภาคผนวก ง.

ขั้นตอนการถ่ายรูป gel electrophoresis จากเครื่อง gel document analyzer ด้วยโปรแกรม Quantity one

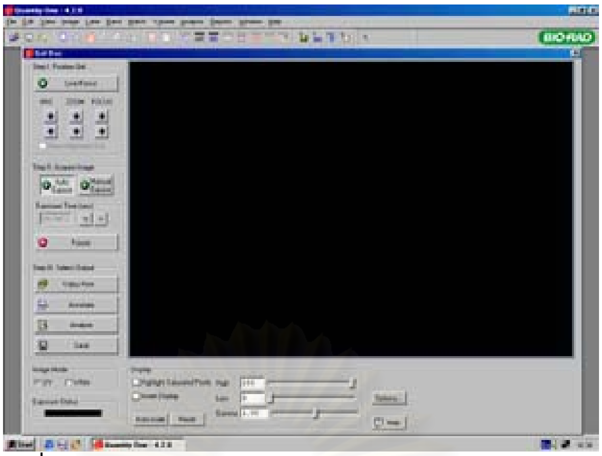


ขั้นที่ 1 เรียกโปรแกรม Quantity one ขึ้นมาจาก Destop

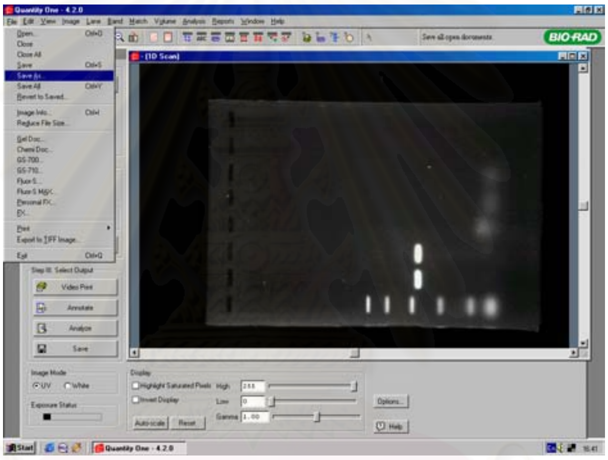


ขั้นที่ 2 ไปที่ File แล้วเลือกโหมด Gel Doc

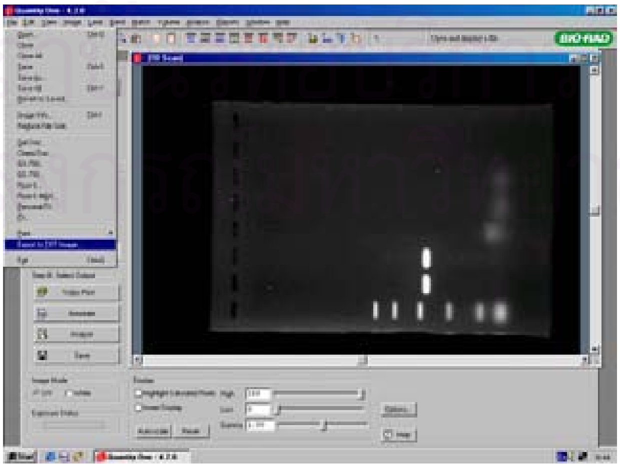
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ขั้นที่ 3 นำ gel ไปวางในเครื่อง gel doc กดปุ่ม Trans UV และปุ่ม Auto Exposure เพื่อแสดงภาพ



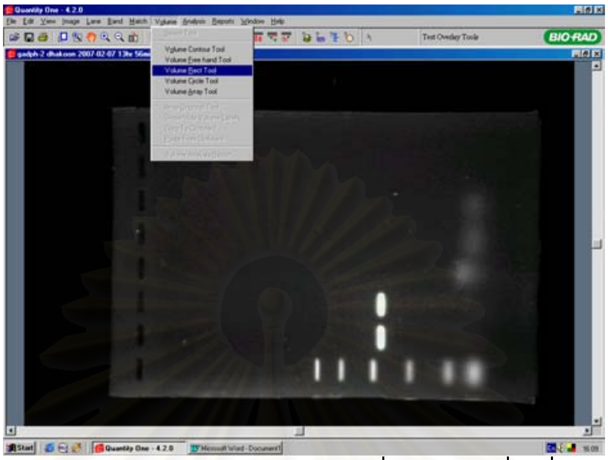
ขั้นที่ 4 ทำการปรับภาพเพื่อให้ได้แสงหรือความคมชัดตามที่ต้องการ จากนั้นไปที่ File เลือกโหมด Save As เพื่อบันทึกภาพ



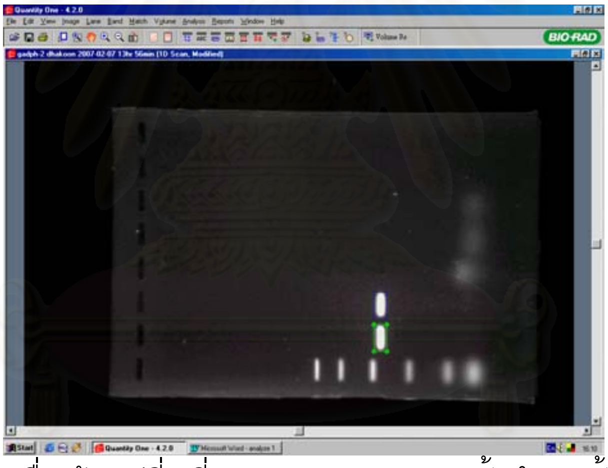
ขั้นที่ 5 ทำการบันทึกภาพในสกุล .TIF โดยไปที่ File เลือกโหมด Export to TIFF Image… จากนั้นกดปุ่ม Video Print เพื่อพิมพ์ภาพที่ได้เก็บเอาไว้

ภาคผนวก จ.

ขั้นตอนการวิเคราะห์ความข้มข้นของ band (density analysis) ด้วยโปรแกรม Quantity one

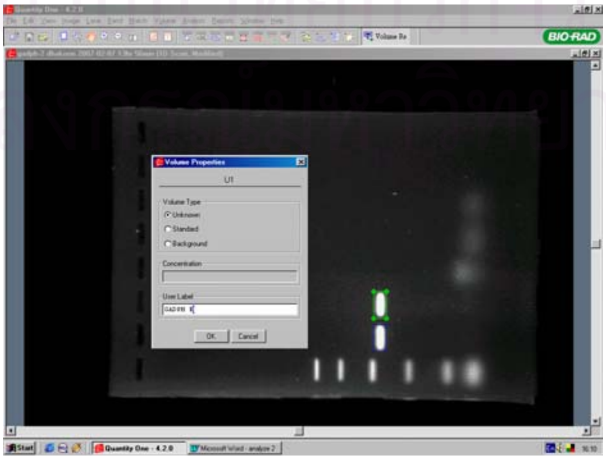


ขั้นที่ 1 ไปที่ Volumn เลือกโหมด Volumn Rect Tool เพื่อสร้างรูปสี่เหลี่ยมมาครอบ band ของ gel



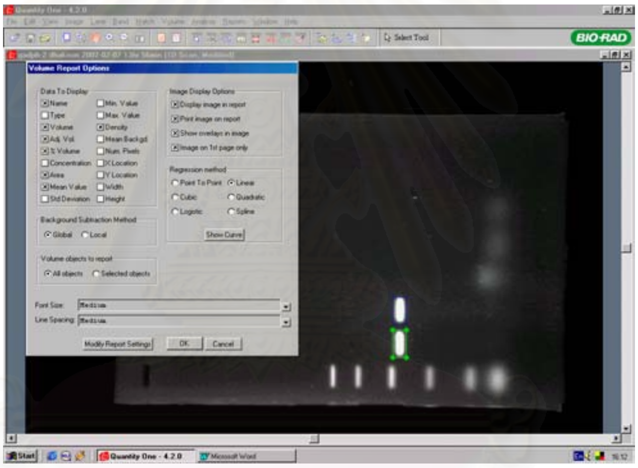
ขั้นที่ 2 คลิ๊กขวาเพื่อสร้างรูปสี่เหลี่ยมมาครอบ band จากนั้นทำการตั้งชื่อให้กับ band

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

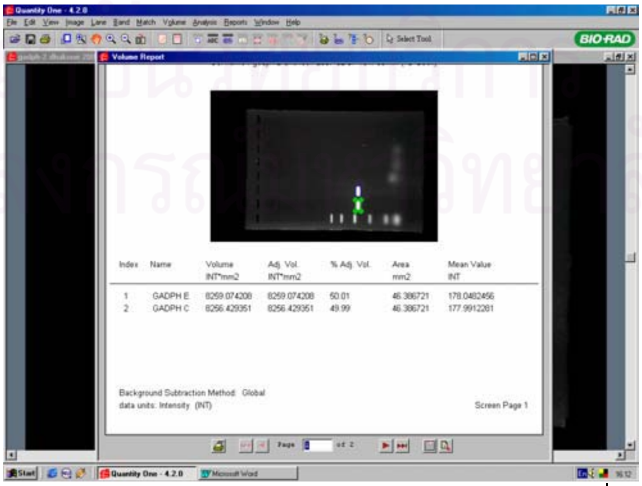


ขั้นที่ 3 กดดับเบิ้ลคลิ๊กซ้าย เพื่อตั้งชื่อให้กับ band

ขั้นที่ 4 ไปที่ Volumn แล้วเลือกโหมด Volumn Analysis Report… เพื่อเลือกฟังก์ชันในการวิเคราะห์ค่า intensity



ขั้นที่ 5 กดปุ่ม OK เพื่อแสดงค่า intensity ที่วัดได้

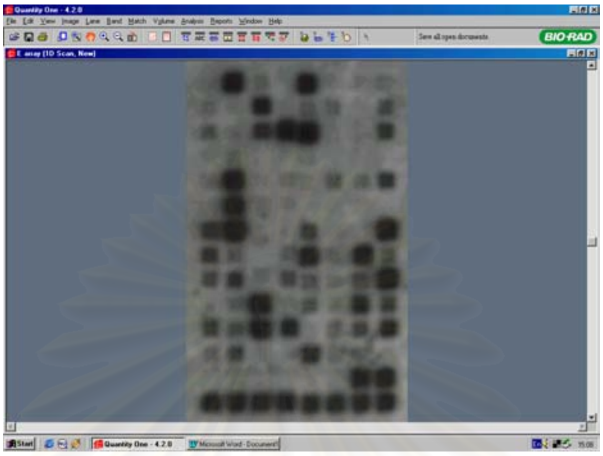


ขั้นที่ 6 เมื่อแสดงค่า Intensity แล้ว กดปุ่ม save ใน wordpad แล้ว copy ค่าที่ได้มาลงใน Microsoft EXCEL

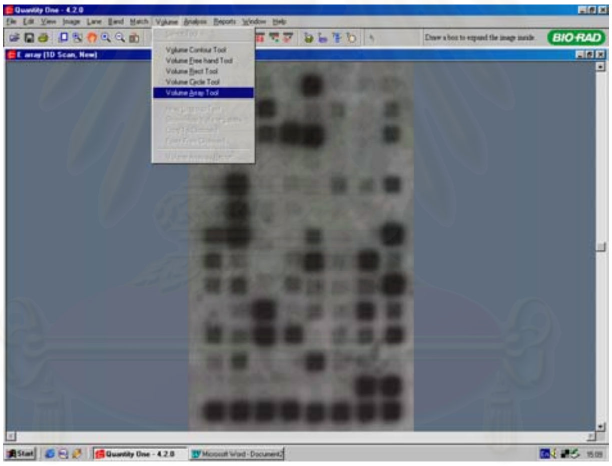
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ.

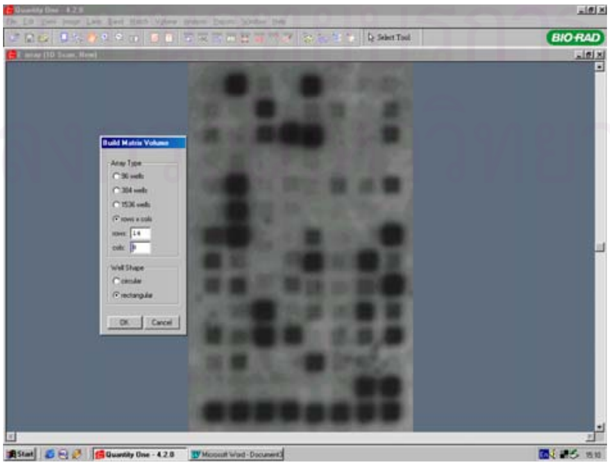
ขั้นตอนการวิเคราะห์ความเข้มของ array membrane grid ของ cDNA array ใน MSCs ที่แยกได้จาก Wharton's jelly tissue เมื่อได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน ด้วยโปรแกรม Quantity one



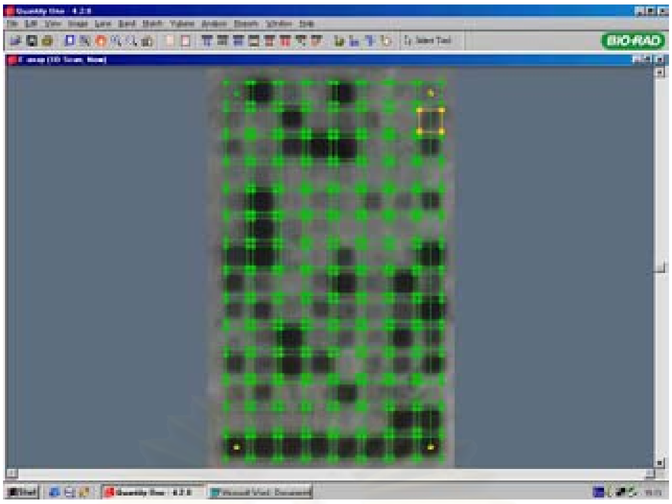
ขั้นที่ 1 เปิดโปรแกรม Quantity One แล้วเปิดไฟล์ภาพถ่าย array membrane สกุล TIF ขึ้นมา



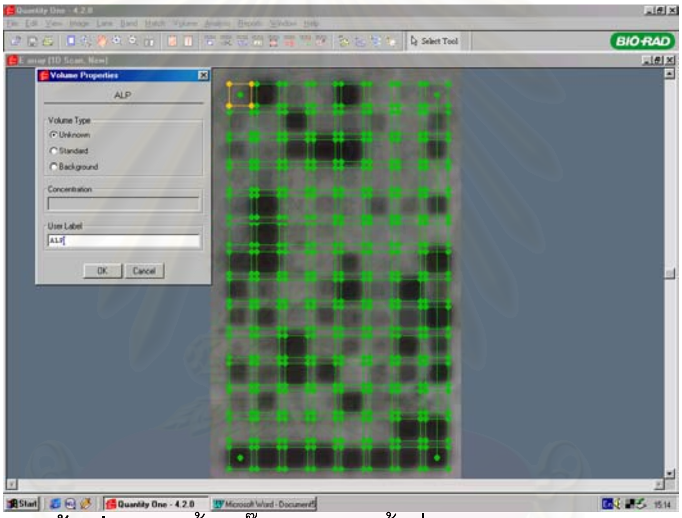
ขั้นที่ 2 ไปที่ Volumn เลือกโหมด Volumn Array Tool



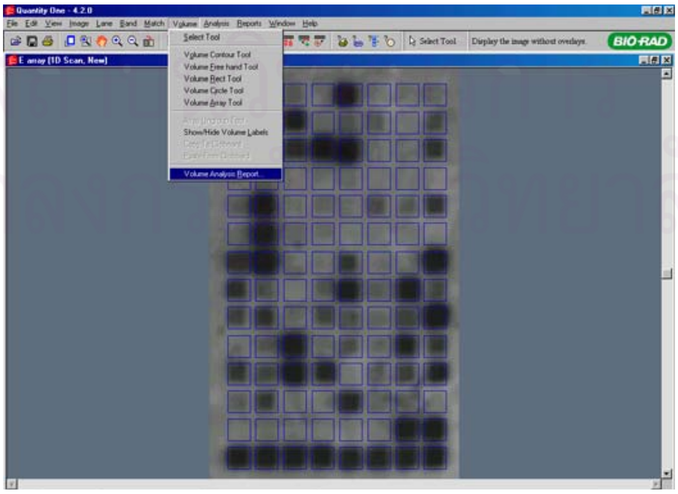
ขั้นที่ 3 ใส่จำนวน row และ column ของ array membrane ที่ทำ



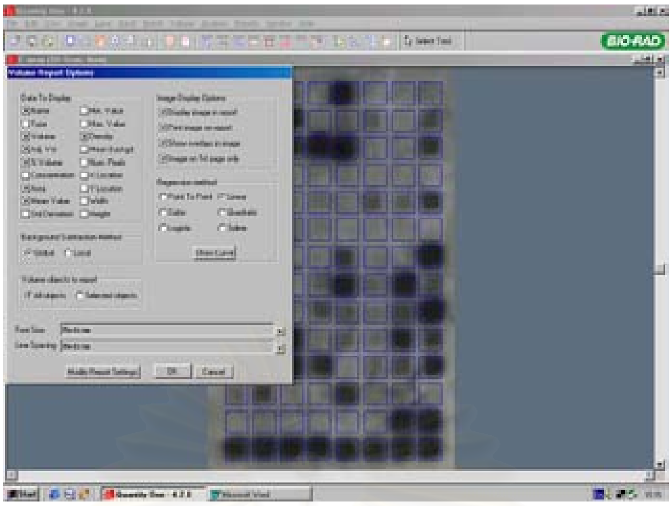
ขั้นที่ 4 เลื่อนช่องของ grid ให้ตรงกับ grid บน array membrane



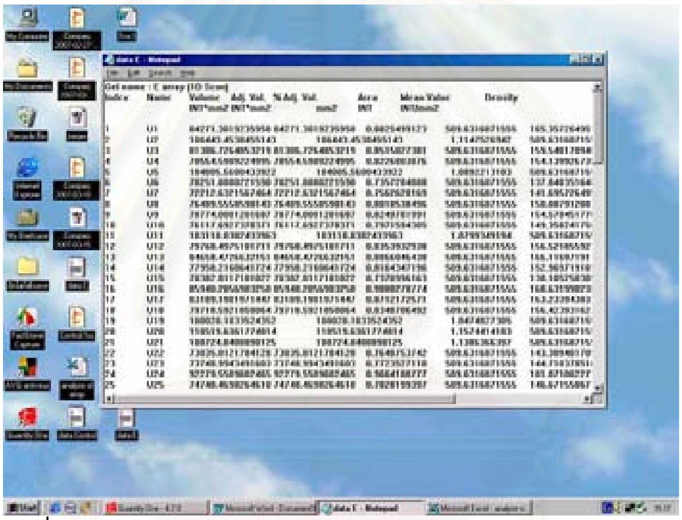
ขั้นที่ 5 ดับเบิ้ลคลิ๊กซ้าย แล้วตั้งชื่อให้กับแต่ละ grid



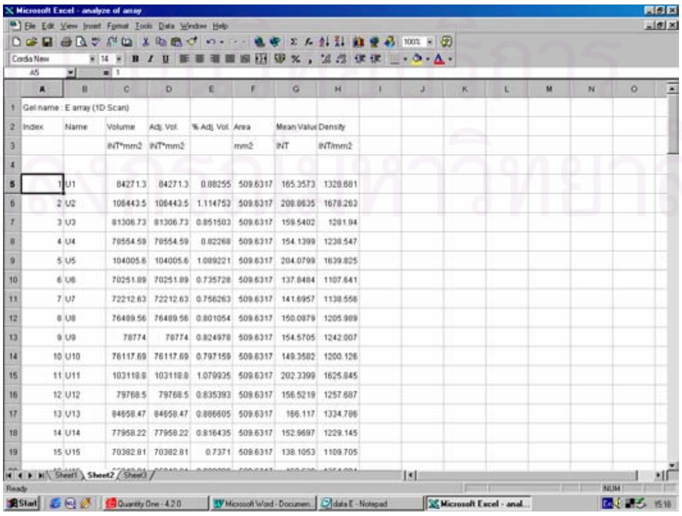
ขั้นที่ 6 ไปที่ Volumn เลือกโหมด Volumn Analysis Report



ขั้นที่ 7 เลือก Volumn Report Option แล้วกด OK



ขั้นที่ 8 แสดงข้อมูลที่ได้ออกมาใน Notepad แล้วทำการบันทึก copy มาลง Microsoft EXCEL



ขั้นที่ 9 แสดงข้อมูลที่ได้ใน Microsoft EXCEL

ภาคผนวก ช.

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

Dhitiseith D., Honsawek S., Phupong V. “Demineralized Bone Promotes Osteoblastic Differentiation of Wharton’s Jelly Cells from Umbilical Cord Tissue” Proceedings of the 6th National Symposium on Graduate Research 13-14 October 2006

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของเนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อสายสะดือรก

DEMENERALIZED BONE MATRIX PROMOTES OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF WHARTON'S JELLY CELLS FROM UMBILICAL CORD TISSUE

ฐากูร ฐิติเศรษฐ์[1], สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก[1], วรพงศ์ ภู่พงศ์[2]**

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย[1]

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย[2]

Dhakoon Dhitiseith[1], Sittisak Honsawek[1], Vorapong Phupong[2]**
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University[1]
Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University[2]

Abstract

Background: Wharton's jelly cells or mesenchymal progenitor cells are defined as self-renewable, multipotent progenitor cells with the unlimited capacity to differentiate into multiple lineage-specific cells that form bone, cartilage, fat and muscle tissues. Demineralized bone matrix (DBM) has been utilized in orthopedic, periodontal, and maxillofacial applications and extensively studied as a biomaterial to induce new bone formation.

Objective: To isolate and characterize Wharton's jelly cells and investigate the biological activity of DBM in Wharton's jelly cells

Material and Methods: Wharton's jelly cells were derived from human umbilical cord culture. Cells were treated with or without DBM and determined over 7 days of culture. Cell proliferation was examined by direct cell counting. Osteoblastic differentiation of Wharton's jelly cells was analyzed with alkaline phosphatase staining assay.

Results: Phenotypic characteristics of human Wharton's jelly cells were spindle and stellate shapes with fine homogenous cytoplasm, typically associated with fibroblast-like cells. The control cells (without DBM treatment) exhibited a spindle shape with little extracellular matrix whereas the DBM treated cells appeared shortened and flattened, and they were surrounded by extracellular matrix. DBM inhibited the growth of the Wharton's jelly cells by 50% as determined by direct cell counting. Morphologic and histochemical studies confirmed that DBM had a strong stimulatory effect on the alkaline phosphatase activities of Wharton's jelly cells, a very early marker of cell differentiation into the osteoblastic lineage.

Conclusion: Mesenchymal progenitor cells derived from umbilical cord could differentiate along an osteoblastic lineage and thus provide an alternative source for cell-based therapies and tissue engineering strategies.

Keywords: Alkaline phosphatase, Demineralized bone matrix (DBM), Osteoblastic differentiation, Umbilical cord, Wharton's jelly cells

บทนำ (Introduction)

สายสะดือรก (human umbilical cord) ประกอบไปด้วยหลอดเลือดซึ่งมี 1 หลอดเลือดดำ และ 2 หลอดเลือดแดงรวมอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่าวาร์ตันเจลลี (Wharton's jelly) ล้อมรอบอยู่ วาร์ตันเจลลีมีลักษณะคล้ายวุ้น (gelatinous) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอย่างหลวม (loose mucoid connective tissue) ประกอบด้วยเซลล์ที่กระจายอยู่ในสารชนิด amorphous ground substance ประเภทโปรติโอไกลแคน (proteoglycan) เช่น กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และคอลลาเจน (collagen) ชนิดต่างๆ [1] เซลล์ที่กระจายตัวอยู่ในเมตริกซ์ (matrix) พบว่ามีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast-like) ที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย (stellate) อยู่ในบริเวณสายสะดือที่ขมวดปม (collapsed cord) และมีรูปร่างยืดยาวออกในบริเวณสายสะดือที่ยืดตัว (distended cord) [2,3]

การศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly ของสายสะดือรกไปเพาะเลี้ยง (explant) พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงได้เซลล์ไลน์ของกระดูกอ่อน (chondrocyte lineage) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน [4,5] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงสามารถเปลี่ยนแปลงและแสดงลักษณะฟีโนไทป์คล้ายเซลล์กระดูก (osteoblast-like phenotype) ได้ในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro*) [5-7] เช่นเดียวกับ human umbilical cord mesenchymal (UCMS) cells เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนเจริญเพิ่มจำนวนจนเหมาะสม สามารถที่จะชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต่างๆ ได้หลายชนิด คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า Wharton's jelly นั้นน่าจะประกอบด้วย mesenchymal progenitor cells เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับกระดูกซึ่งผ่านขบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized bone material) จะสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไลน์ของกระดูก (osteoblastic lineage) ได้ ซึ่งอาจจะพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับวิธีการรักษาด้วยเซลล์ (cell-based therapy) กับการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่ได้จากสายสะดือรก (Wharton's jelly cells) ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาของเซลล์ชนิดนี้ในระดับ *in vitro* มากขึ้น รวมถึงสามารถเป็นแนวทางสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ทางการศึกษาด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods)

การเตรียมกระดูกซึ่งผ่านกระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ (Preparation of demineralized bone matrix)

ชิ้นส่วนของกระดูกถูกนำมาปั่นให้ละเอียดจนเป็นผง แล้วทำการลดปริมาณเกลือแร่ในผงกระดูก โดยนำไปใส่ในกรดไฮโดรคลอริกที่เจือจาง (0.5 N HCl) จนได้เป็นเนื้อเยื่อกระดูก demineralized bone matrix (DBM) ที่มีแคลเซียมเหลืออยู่ในระดับต่างๆ หลังจากนำ bone matrix ออกจากกรดที่เวลา 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเอากรดออกด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dried) และเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C วัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมที่คงเหลืออยู่ (Residual calcium content) ใช้วิธี o-cresolphthalein complexone calcium binding assay (Arsenazo III calcium assay)

การแยกเซลล์และเลี้ยงเซลล์ไลน์จากสายสะดือรก (Cell line initiation)

สายสะดือรกได้จากการผ่าตัดทำคลอดทารกที่เจริญเต็มที่ (full-term Caesarian section birth) โดยทำคลอดจากมารดาที่ให้ความยินยอมในการวิจัย (informed consent) จากนั้นทำการเลาะหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงที่

พันอยู่ในสายสะดือออกจนได้เนื้อเยื่อส่วน Wharton's jelly นำมาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-minimal essential medium (α-MEM, Gibco BRL) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ penicillin 200 units/ml และ streptomycin 100 μg/ml จากนั้นนำมาตัดให้ได้ชิ้นส่วนขนาดเล็กประมาณชิ้นละ 1 ม.ม. x ม.ม. แล้วนำมาวางบนพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงขนาด T-25 (T-25 flask) และเลี้ยงเซลล์ใน α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum (FBS) กับ penicillin (100 unit/ml) / streptomycin (50 μg/ml) แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เมื่อเซลล์แยกออกจากส่วนของเนื้อเยื่อและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนจนเหมาะสม (outgrowing cells) ทำการเก็บรวบรวมเซลล์ โดยการทำให้เซลล์หลุดลอกออกจากจานทดลองด้วยสารละลาย 0.025% trypsin กับ 0.05% EDTA และนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม เมื่อเซลล์วาร์ตันเจลลีเจริญและเพิ่มจำนวนจนใกล้เต็มจานทดลอง (confluence) ก็ทำการแบ่งจำนวนเซลล์เพื่อถ่ายลง T-75 flask โดยใช้อัตราส่วนการแบ่งเซลล์ (split ratio) ที่ 1:4 จากนั้นเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง (continually passaged) จนกระทั่งได้จำนวนที่พอเพียงจึงนำมารวมเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งด้วยความเย็น (cryopreserve) และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทำการศึกษาในภายหลัง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

นำเซลล์วาร์ตันเจลลีที่แช่แข็งมาทำให้ละลายและเพาะเลี้ยงใน α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS ซึ่งได้รับ DBM จำนวน 5 mg (กลุ่มทดลอง) กับกลุ่มซึ่งเพาะเลี้ยงใน α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS ซึ่งไม่ได้รับ DBM (กลุ่มควบคุม) โดยเพาะเลี้ยงใน T-25 flask ประมาณ 5.0×10^5 เซลล์ต่อ flask (หรือ 2.0×10^4 เซลล์/ซม.^{2})

การประเมินการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Assessment of cell proliferation)

ทำการประเมินการเจริญเพิ่มจำนวนของ Wharton's jelly cells ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันดังที่กล่าวในข้างต้น เมื่อเวลาผ่านไป 0, 3, 5, 7 และ 10 วัน จึงทำการแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงโดยทำให้เซลล์หลุดลอกออกด้วยทริปซิน (trypsinization) ล้างเซลล์ และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยใช้ hemocytometer ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion test จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากทั้งเซลล์ที่เลี้ยงทั้งสองสภาวะ

การทดสอบด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay

หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานทดลองในสภาวะที่แตกต่างกันข้างต้นเป็นเวลา 7 วัน จึงทำการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay โดยใช้ Sigma Diagnostics alkaline phosphatase kit (Catalog no.86-2, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis) ชั้นของเซลล์ซึ่งถูกล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วนำมาตรึง (fix) ด้วย citrate-acetone-formaldehyde fixative solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที และย้อมด้วย alkaline-dye mixture ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และใช้สารละลาย napthol AS-BI alkaline solution and fast red violet B (FRV-alkaline solution) สำหรับตรวจวัด enzyme activity และทำการ counterstained slide ด้วย hematoxylin solution, gill No. 3 จากนั้นทำการวิเคราะห์เซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

ข้อมูลที่ได้แสดงค่าเฉลี่ย (mean) กับค่าความคลาดเคลื่อน (standard error of the mean : SEM) ใช้การวิเคราะห์วิธี ANOVA ในการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ด้วยสถิติ Turkey-Type

multiple comparison test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยมากกว่าสองกลุ่มด้วย one-way ANOVA analysis โดยค่า P-Value น้อยกว่า 0.05 พิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง (Results)

เนื้อเยื่อผงกระดูกที่ผ่านขบวนการลดปริมาณเกลือแร่ใน 0.5 N HCl โดยร้อยละของปริมาณแคลเซียมที่เหลืออยู่ใน bone matrix เป็นดังนี้คือ 90.95, 83.25, 19.34, 7.53, และ 7.32 (weight percent) หลังจากนำผงกระดูกมาทำการลดปริมาณเกลือแร่ (demineralized time) เป็นเวลา 1, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) ขณะที่กระบวนการลดปริมาณเกลือแร่ดำเนินไป ความสามารถของบัฟเฟอร์สำหรับละลายเกลือ (buffering ability of solubilized salt) ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 6 ค่า pH ของสารละลายกรดเกลือ (eluent acid solution) ลดลงประมาณ pH 1.0

DBM ที่นำมาใช้ในการศึกษาในระดับเซลล์ทดลองของเซลล์วาร์ตันเจลลี มีระดับแคลเซียมคงเหลืออยู่ประมาณ 7 - 8% ของปริมาณแคลเซียมที่มีอยู่ตอนต้น เซลล์ไลน์ปฐมภูมิที่สร้างขึ้นจากการเพาะเลี้ยง และทำการศึกษาลักษณะของ fibroblast-like cell เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2-3 สัปดาห์ต่อมา สังเกตเห็นว่าชั้นของเซลล์วาร์ตันเจลลีมีการเจริญเพิ่มจำนวนเกือบเต็มจานทดลอง (80% confluence) จึงทำการลอกเซลล์ออกจากจานทดลองด้วยทริปซิน (trypsinization) ล้างเซลล์และเพาะเลี้ยงด้วย α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 10% FBS แล้วทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์วาร์ตันเจลลี จากการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 1) พบว่าลักษณะของเซลล์มีลักษณะเป็นแฉกคล้ายรูปดาวคล้ายกระสวย (spindle and stellate shape) เห็นไซโตพลาสมเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous cytoplasm) ซึ่งมีรูปแบบสัมพันธ์คล้ายกับเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast-like cell)

การศึกษาผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์วาร์ตันเจลลี ด้วยวิธีการประเมินประสิทธิภาพ (assessing potential mitogenic effect) ซึ่งได้จากการสังเกตผลการทดลองในอดีตของคณะวิจัยพบว่าหลังจากทำการปลูกถ่าย DBM ลงในหนู (nude mice) มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ตั้งต้นของกระดูก (osteoprogenitors) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบผลของ DBM ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนในระดับเซลล์ทดลอง (*in vitro*) โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น α-MEM ที่มีส่วนผสมของ 2% FBS กับยาปฏิชีวนะ โดยมีเซลล์วาร์ตันเจลลีจำนวน 5.0×10^5 เซลล์/T-25 flask ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ได้รับ DBM จำนวน 5 mg กับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DBM เป็นเวลา 7 วัน ทำการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 3, 5, และ 7 ด้วย hemocytometer ดังที่แสดงในรูปที่ 2 จะเห็นว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นเป็น 8×10^6 เซลล์/T-25 flask ในขณะที่จำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ DBM มีจำนวนเซลล์ประมาณ 4.0×10^6 เซลล์/T-25 flask

การศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoinductive ability) ของ DBM ต่อกระบวนการชักนำในเซลล์วาร์ตันเจลลี ทำโดยวิธี alkaline phosphatase staining assay เพื่อประเมินผลของ DBM ต่อการชักนำเซลล์วาร์ตันเจลลี ด้วยการเติม DBM ลงในเซลล์กลุ่มทดลอง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมไม่ได้รับ DBM หลังจากทำการ incubation เป็นเวลา 7 วัน ทำการสังเกตรูปร่างลักษณะของเซลล์และการทดสอบด้วยวิธี alkaline phosphatase staining assay พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) ดังแสดงในรูปที่ 3A ในทางตรงกันข้าม กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ DBM ปรากฏว่ามีรูปร่างสั้น (shortened) และแบน (flattened) คล้ายลูกเต๋า (cuboidal shape) ในรูป 3B นอกจากนี้เซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งติดสีน้ำเงิน บ่งชี้ถึงระดับ alkaline phosphatase activity ที่ต่ำ ขณะที่กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ DBM จะติดสีม่วงแดง (red purple) แสดงว่ามีระดับ alkaline phosphatase activity สูงมาก (รูปที่ 4)

การอภิปราย (Disscussion)

Demineralized bone matrix (DBM) เป็นวัสดุที่มีประสิทธิภาพ สำหรับนำมาใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทั้งในด้านโครงสร้างและหน้าที่กับกระดูกของผู้ป่วยเอง (autologous) demineralized bone grafts ซึ่งได้จากกระดูกส่วน cortical bone และ cancellous bone สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในทางคลินิก เช่น ซ่อมแซมอาการบาดเจ็บของกระดูก ความผิดปกติชนิดต่างๆ รวมทั้งกระดูกหักที่ไม่เชื่อมติดกัน (nonunion fracture) เนื้องอกในกระดูก (bone cyst) และการทำศัลยกรรมใบหน้าและขากรรไกร (craniomaxillofacial reconstruction) [8-11] DBM เป็นวัสดุโครงร่าง (scaffold) ที่มีประสิทธิภาพสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีความสามารถในการค้ำจุนและชักนำให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) ใน matrix-incorporated osteoprogenitor สาร bone morphogenetic protein (BMP) ที่สกัดได้จาก DBM สามารถชักนำให้มีการสร้างกระดูกใหม่ได้ (osteoinductivity)[12,13] เซลล์ตั้งต้นของกระดูก (osteoprogenitor cells) จากไขกระดูกเมื่อรวมตัวกับ DBM สามารถส่งเสริมให้เกิดกระบวนการสร้างกระดูกได้ดีภายในบริเวณที่แหว่งหายไป (defect site) เมื่อเปรียบเทียบการให้ DBM เพียงอย่างเดียว[14,15] นอกจากนี้การศึกษาในแหล่งของ osteogenic cells อื่นๆ เช่น bone marrow stromal cells แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ DBM ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดขบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis) ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ภายในบริเวณที่มีความผิดปกติของกระดูก (osseous defect)

ความก้าวหน้าทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถนำชีววัสดุ (biomaterial) มาประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาทางคลินิกในการซ่อมแซมกระดูกโดยการรวมเข้าด้วยกัน (incorporation) ของ osteogenic cells และโครงร่าง (scaffold) [17] จึงต้องทำการศึกษาการกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic differentiation) ในระดับเซลล์ทดลองก่อนเข้าสู่ขั้นการศึกษาโดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง [18] การนำเซลล์เข้ามารวมกับวัสดุโครงร่างมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการรักษาภาวะผิดปกติทางกระดูกเนื่องจากมีโครงร่างให้เซลล์ได้เกาะและเจริญอยู่ภายใน และเมื่อทำการใส่ลงในบริเวณ defect site สามารถเกิดการสร้างกระดูกใหม่ได้ (new bone formation) [19] ผลเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก(osteogenic differentiation) ของเซลล์ใน biomaterial แล้วเซลล์กระดูกสามารถเจริญเต็มที่และมีกระบวนการสร้างกระดูกที่รวดเร็ว (rapid bone formation) DBM เป็นชีววัสดุธรรมชาติโดยเป็นโครงร่างให้การค้ำจุนและส่งเสริมให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก จึงสามารถเกิดการพัฒนาของเซลล์กระดูก (osteoblastic phenotype) และเกิดการสะสมของเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ (new bone matrix) [20]

การศึกษานี้ได้แสดงแนวทางเลือกหนึ่งในการแยกเซลล์วาร์ตันเจลลีจากสายสะดือรกได้อย่างรวดเร็ว จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DBM เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (morphological transformation) จากรูปร่างคล้ายกระสวยแบบยาว (long spindle-like cells) มาเป็นแบบสี่เหลี่ยม (cuboidal-like cells) ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า DBM มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์วาร์ตันเจลลี ซึ่งพอสันนิษฐานได้โดยการชักนำให้เกิดกระบวนการ differentiation ของเซลล์วาร์ตันเจลลีในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) และยืนยันผลการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) ได้ด้วยวิธี alkaline phosphatase assay

กล่าวโดยสรุป สายสะดือรกเป็นอวัยวะที่น่าสนใจและเป็นความหวังในการนำแหล่งของเซลล์เหล่านี้สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาวิธีการรักษาด้วยเซลล์ (cell-based therapy) และการนำประยุกต์ใช้ในทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ผลการทดลองนี้สนับสนุนศักยภาพในการสร้างกระดูกในเซลล์ทดลอง (*in vitro*) ที่ได้จากสายสะดือและความสามารถของ DBM ในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์วาร์ตันเจลลี ซึ่งอาจนำมาซึ่งความรู้ใหม่ในการรักษาโรคกระดูก (bone reconstruction therapy) และเป็นรูปแบบการทดลองสำหรับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในการศึกษาขั้นตอนการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenic pathway) ในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง *(in vitro)* ได้เป็นอย่างดี

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังเป็นเป็นการศึกษาในขั้นต้นที่ยังต้องมีทดลองยืนว่าเซลล์ในกลุ่มทดลองเมื่อได้รับ DBM สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) โดยการศึกษาถึง osteoblastic marker ตัวอื่นเพิ่มเติมอีก เช่น osteopontin, osteocalcin, collagen type I ซึ่งวัดได้โดยการทำเทคนิค immunohistochemistry รวมถึงการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ osteogenesis ในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR (reverse transcription–polymerase chain reaction) หรือในระดับโปรตีน เช่น การทำเทคนิค westhern blot hybridization หรือเทคนิค immunohistochemistry เป็นต้น

Figures and table legends

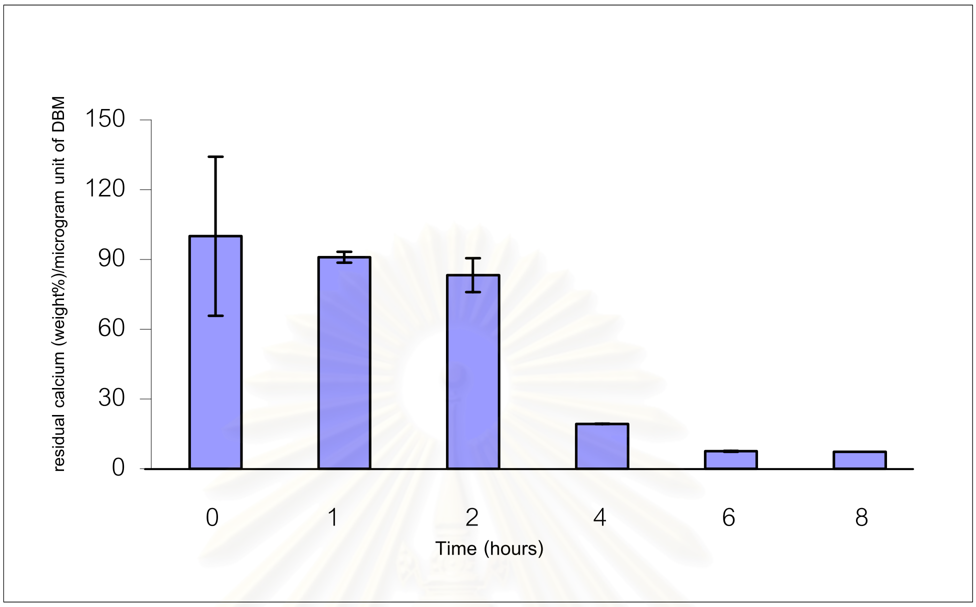
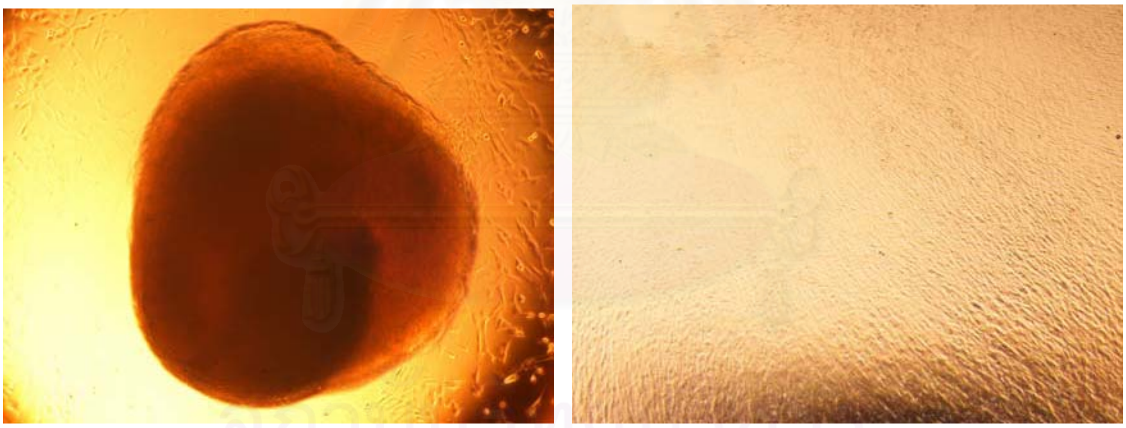


Table 1. Change in residual calcium of DBM at different demineralization time.



(A) (B)

Fig. 1 Primary culture from human umbilical cord (x 10)

(J) Explant and early stage outgrowth about 7 days after explantation.

(K) Outgrowth after removal of explant, about 14 days after explantation.

From this figure displayed the morphologic pattern of Wharton's jelly cells in cell culture. The cells exhibited spindle and stellate shapes with fine homogenous cytoplasm, typically associated with fibroblast-like cells. The most individualizing characteristic of the cell line is the long processes and is aligned in orderly manner.

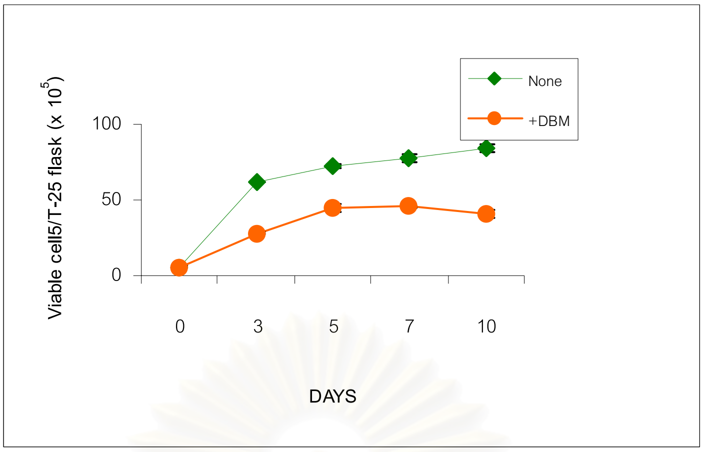
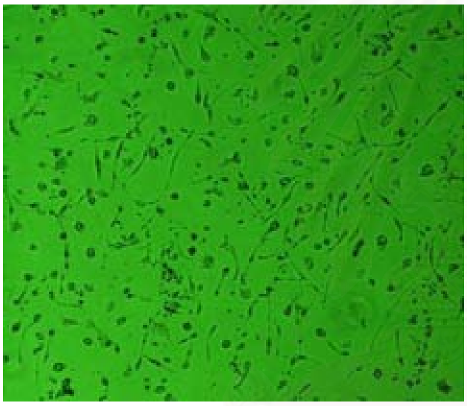


Fig. 2 Proliferation curves of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the absence or presence of DBM. Data are expressed as means with error bars representing SEM. Figure demonstrated the cell numbers in control cultures increased to approximately 8 x 10^6 cells/ T-25 flask. However, the cell numbers in DBM treated culture fluctuated around 4.0 x 10^6 cells/ T-25 flask.

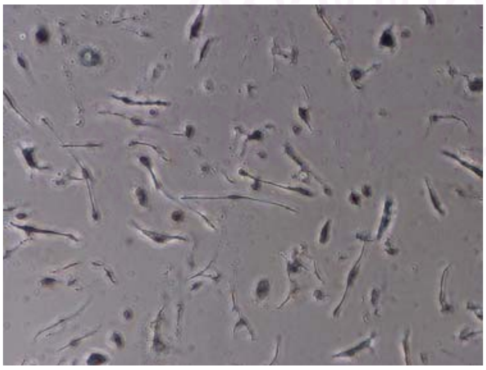


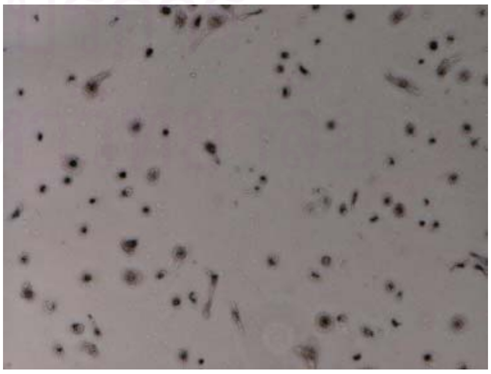
(A) None **(B) +DBM**

Fig. 3 Morphology study of Wharton's jelly cells (x 10) after 7 days of incubation.

(A) Wharton's jelly cells without DBM addition appeared a spindle shape, and there were very little extracellular matrix.

(B) Wharton's jelly cells with DBM addition appeared shortened and flattened, and they were surrounded by extracellular matrix.





(A) None **(B) +DBM**

Fig. 4 Alkaline phosphatase staining assay of Wharton's jelly cells (x 10).

(A) Wharton's jelly cells without DBM addition were stained blue, indicating low levels of alkaline phosphatase activities.

(B) Wharton's jelly cells with DBM addition were stained red purple, suggesting very high alkaline phosphatase activities.

บรรณานุกรม

1. Sobolewski K, Bankowski E, Chyczewski L et al, "Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly," ***Biology of the neonate 1997***;71:11-21.
2. Mc Elreavey KD, Irvine AI, Ennis KT et al, "Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord," ***Biochemical Society transactions 1991***;19:29S.
3. Parry EW, "Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord," ***The American journal of anatomy 1970***;107:505-18.
4. Purchio AF, Naughton BA, Roman JS, "Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly," ***U.S. patent no. 5,919,702, 1999***.
5. Wang HS, Hung SC, Peng ST et al., "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord," ***Stem Cells 2004***;22: 1330-7.
6. Eblenkamp M, Aigner J, Hintermair J et al., "Umbilical cord stromal cells (UCSC). Cells featuring osteogenic differentiation potential," ***Der Orthopäde 2004***;33:1338-45.
7. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE, "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors," ***Stem Cells 2005***;23:200-9.
8. Delloye C, De Nayer P, Malghem J, Noel H, "Induced healing of aneurysmal bone cysts by demineralized bone particles. A report of two cases," ***Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 1996***;115:141-5.
9. Rosenthal RK, Folkman J, Glowacki J, "Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cytes, and fibrous lesions," ***Clinical orthopaedics and related research 1999***;364:61-9.
10. Kubler N, Michel C, Zoller J, et al, "Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants," ***Journal of cranio-maxillo-facial surgery 1995***;23:337-46.
11. Mulliken JB, Glowacki J, Kaban LB, Folkman J, Murray JE, "Use of demineralized allogrneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities," ***Annals of surgery 1981***;194:366-72
12. Honsawek S, Powers RM, Wolfinbarger L, "Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model," ***Cell and tissue banking 2005***;6:13-23.
13. Honsawek S, Dhitiseith D, "Content of bone morphogenetic protein-4 in human demineralized bone: relationship to donor age and ability to induce new bone formation," ***Journal of the Medical Association of Thailand 2005***;88S4:S260-5.
14. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF, "The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects," ***Orthopedics 1995***;18:1153-8.
15. Rougraff BT, Kling TJ, "Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow," ***The Journal of bone and joint surgery. American volume 2002***;84A:921-9.
16. Andrades JA, Santamaria JA, Nimni ME, Becerra J., "Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1 : an in vitro and in vivo study," ***The International journal of developmental biology 2001***;45:689-93.
17. Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al., "Tissue-engineered bone regeneration," ***Nature biotechnology 2000***;18:959-63.
18. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, et al., "Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells," ***Plastic and reconstructive surgery 1998***;101:567-74.
19. Bruder SP, Fox BS, "Tissue engineering of bone: Cell based strategies," ***Clinical orthopaedics and related research 1999***;367S:S68-83.
20. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, et al., "Bone formation by three-dimentional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds," ***Journal of biomedical materials research 1997***;36:17-28.

ภาคผนวก ซ.

แสดงรายละเอียดของ GEArray Q Series Human Osteogenesis Gene Array (HS-026)

ALPL 1	ANXA5 2	ARSE 3	BGLAP 4	BGN 5	BMP1 6	BMP2 7	BMP3 8
BMP4 9	BMP5 10	BMP6 11	BMP7 12	BMP8B 13	BMPR1A 14	CASR 15	CD36 16
SCARB1 17	RSL1D1 18	COL10A1 19	COL11A1 20	COL12A1 21	COL14A1 22	COL15A1 23	COL16A1 24
COL17A1 25	COL18A1 26	COL19A1 27	COL1A1 28	COL2A1 29	COL3A1 30	COL4A3 31	COL4A4 32
COL4A5 33	COL5A1 34	COL7A1 35	COL9A2 36	CSF2 37	CSF3 38	CTSK 39	DCN 40
EGF 41	EGFR 42	FGF1 43	FGF2 44	FGF3 45	FGFR1 46	FGFR2 47	FGFR3 48
FLT1 49	FN1 50	GDF10 51	ICAM1 52	IGF1 53	IGF1R 54	IGF2 55	ITGA1 56
ITGA2 57	ITGA3 58	ITGAM 59	ITGAV 60	ITGB1 61	SMAD1 62	SMAD2 63	SMAD3 64
SMAD4 65	SMAD5 66	SMAD6 67	SMAD7 68	SMAD9 69	MMP10 70	MMP13 71	MMP2 72
MMP8 73	MMP9 74	MSX1 75	MSX2 76	NFKB1 77	PDGFA 78	RUNX2 79	SERPINH1 80
SERPINH1 81	SOX9 82	SPARC 83	SPP1 84	TGFB1 85	TGFB2 86	TGFB3 87	TGFBR1 88
TGFBR2 89	TNF 90	TWIST1 91	VCAM1 92	VDR 93	VEGF 94	VEGFB 95	VEGFC 96
PUC18 97	PUC18 98	PUC18 99	Blank 100	Blank 101	Blank 102	GAPDH 103	GAPDH 104
PPIA 105	PPIA 106	PPIA 107	PPIA 108	RPL13A 109	RPL13A 110	ACTB 111	ACTB 112

ตารางแสดงรายละเอียดของยีนต่าง ๆ ใน array membrane

Position	GeneBank	Symbol	Description
1	NM_000478	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
2	NM_001154	ANXA5	Annexin A5
3	NM_000047	ARSE	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)
4	NM_199173	BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)
5	NM_001711	BGN	Biglycan
6	NM_006129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
7	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
8	NM_001201	BMP3	Bone morphogenetic protein 3 (osteogenic)
9	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
10	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5
11	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6
12	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
13	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)
14	NM_004329	BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
15	NM_000388	CASR	Calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism)
16	NM_000072	CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)
17	NM_005505	SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1
18	NM_015659	RSL1D1	Ribosomal L1 domain containing 1
19	NM_000493	COL10A1	Collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia)
20	NM_080629	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1
21	NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1
22	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)
23	NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1
24	NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1
25	NM_000494	COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1

Position	GeneBank	Symbol	Description
26	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
27	NM_001858	COL19A1	Collagen, type XIX, alpha 1
28	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
29	NM_001844	COL2A1	Collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia, congenital)
30	NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
31	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
32	NM_000092	COL4A4	Collagen, type IV, alpha 4
33	NM_033380	COL4A5	Collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
34	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
35	NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)
36	NM_001852	COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2
37	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
38	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
39	NM_000396	CTSK	Cathepsin K (pycnodysostosis)
40	NM_001920	DCN	Decorin
41	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
42	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
43	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
44	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
45	NM_005247	FGF3	Fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2) oncogene homolog)
46	NM_000604	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
47	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)
48	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
49	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
50	NM_002026	FN1	Fibronectin 1
51	NM_004962	GDF10	Growth differentiation factor 10

Position	GeneBank	Symbol	Description
52	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
53	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
54	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
55	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
56	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1
57	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
58	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
59	NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)
60	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
61	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
62	NM_005900	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)
63	NM_005901	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)
64	NM_005902	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
65	NM_005359	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)
66	NM_005903	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)
67	NM_005585	SMAD6	SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)
68	NM_005904	SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)
69	NM_005905	SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)
70	NM_002425	MMP10	Matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)
71	NM_002427	MMP13	Matrix metallopeptidase 13 (collagenase 3)
72	NM_004530	MMP2	Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
73	NM_002424	MMP8	Matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)
74	NM_004994	MMP9	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
75	NM_002448	MSX1	Msh homeobox homolog 1 (Drosophila)
76	NM_002449	MSX2	Msh homeobox homolog 2 (Drosophila)
77	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)

Position	GeneBank	Symbol	Description
78	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
79	NM_004348	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
80	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
81	NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
82	NM_000346	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)
83	NM_003118	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
84	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)
85	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
86	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
87	NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
88	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)
89	NM_003242	TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
90	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
91	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)
92	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
93	NM_000376	VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
94	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor
95	NM_003377	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
96	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
97	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
98	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
99	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
100			
101			
102			
103	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Position	GeneBank	Symbol	Description
104	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
105	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
106	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
107	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
108	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
109	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
110	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
111	NM_001101	ACTB	Actin, beta
112	NM_001101	ACTB	Actin, beta

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายฐากูร ฐิติเศรษฐ์ **เพศ** ชาย

อายุ 25 ปี **เกิด** 8 มกราคม 2525

สถานที่เกิด โรงพยาบาลกรุงเทพคริสเตียน กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน 40/195 หมู่บ้านสุชา 2 ถนนเลียบคลองทวีวัฒนา ตำบลหนองค้างพลู เขตหนองแขม กรุงเทพมหานคร 10160

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจิตวิทยาคลินิก จากคณะสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี 2547

ระดับปริญญาโท ศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2548

ผลงานตีพิมพ์

Honsawek S., **Dhitiseith D.**, Phupong V., Effects of Demineralized Bone Matrix on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord. **J Med Assoc Thai** 2006; 89 (Suppl 3): S189-195.

การนำเสนอผลงาน

นำเสนอผลงานในหัวข้อ “Demineralized Bone Promotes Osteoblastic Differentiation of Wharton’s Jelly Cells from Umbilical Cord Tissue” ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549 ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยด้วยวาจา ระดับดีมาก กลุ่มสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย