

วิธีการทดลอง และ ผลการทดลอง

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไต

ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนู(mouse Embryonic Stem Cell, mESC) ไปเป็นเซลล์ของหน่วยไตที่ดีที่สุด คือการใช้ BMP7 ร่วมกับ Activin A และ Retinoic acid ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูที่มีการเพาะเลี้ยงแบบ Embryoid body(EB)เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไต (Nephron progenitor) แต่เซลล์ที่ได้ก็ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์หน่วยไตได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อทำการศึกษาลำดับที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ (growth factor) ชนิดอื่นที่สามารถเหนี่ยวนำให้mESCsสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตได้ดีขึ้น ซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาหา growth factor ชนิดอื่นๆ โดยจะเลือกจาก growth factor ที่มีเกี่ยวข้องกับการเกิดการวิวัฒนาการของตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ของหน่วยไตได้แก่ BMP2 , FGF , VEGF และ GDNF ซึ่งจะทำการศึกษาถึงผลของ Growth factor แต่ละชนิดในการเหนี่ยวนำร่วมกับ Activin A และ Retinoic acid โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาปริมาณของ growth factor ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งในการทดลองจะมีการเลี้ยง mESCให้เกิดการสร้าง Embryoid body (EB) โดย

1. เลี้ยง Mouse ES cell และเพิ่มจำนวนโดยใช้การเลี้ยงบน0.1% gelatin coated tissue culture plateมีการใช้สารพิเศษที่ใช้เพิ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ mLIF และ GSK3 inhibitor หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไป incubate เป็นระยะเวลา ประมาณ 2-4 วัน

2.เลี้ยงโดย ไม่มี rLIF ใน bacteriological dish โดยวิธี hanging drop ให้เป็น Embryoid body ประมาณ 2 วัน

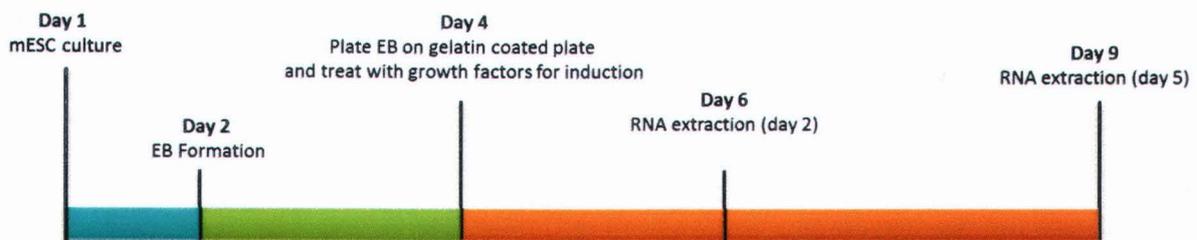
3. แล้วนำ EB มาเลี้ยงบน 6 wellplate ที่ coat ด้วย gelatin (ใช้ 0.1% gelatin coated tissue culture plate incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน) ใน media ของ EB แล้วเติมสารต่างๆ ดังนี้

- EB media no growth factor
- EB media+BMP7 50ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1µM
- EB media+BMP2 2ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1µM
- EB media+BMP2 25ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1µM
- EB media+BMP2 50ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1µM
- EB media+FGF 10ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1µM



- EB media+FGF 50ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+FGF 100ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+VEGF 2ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+VEGF 10ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+VEGF 50ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+GDNF 2ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+GDNF 10ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M
- EB media+GDNF 50ng/ml+ActivinA 10 ng/ml+RA 0.1 μ M

ซึ่งจะใช้เวลาเหนี่ยวนำด้วย BMP7 เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยเลี้ยงต่อไปประมาณ 5 วัน โดยจะทำการสกัด RNA ของ EB ที่มีการเติมสารต่างๆ ในวันที่ 2 และวันที่ 5 เพื่อนำไปทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time PCR (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงระยะเวลา และขั้นตอนในการเหนี่ยวนำให้ mESCเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไต

ขั้นตอนการทำ Reverse Transcriptase-PCR analysis

นำ Embryoid body ที่เลี้ยงจนมีปริมาณมากพอที่จะนำมาสกัด RNA นำมาสกัด RNA โดยใช้ Tri Reagent

นำ RNA ที่ได้มาวัด ค่า OD เพื่อใช้ในการคำนวณ

ทำ PCR-RT เพื่อเปลี่ยน mRNA ที่ได้เป็น cDNA

ทำ Taq DNA Pol ด้วย PCR ymerase

เลือก ที่จะใช้ทั้งหมด primer 5 primer คือ

Pax-2

Forward primer 5' GGCATCTGCGATAATGACACA 3'

Reverse primer 5' GGTGGAAAGGCTGCTGAACTT 3'

Wnt4

Forward primer 5' CATCTCTTCAGCAGGTGTGG 3'

Reverse primer 5' GGACGTCCACAAAGGACTGT 3'

Oct-4

Forward primer 5' AGCTGCTGAAGCAGAAGAGG 3'

Reverse primer 5' GGTTCTCATTGTTGTCGGCT 3'

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Forward primer 5' TCCGCCCTTCTGCCGATG 3'

Reverse primer 5' CACGGAAGGCCATGCCAGTGA 3'

GDNF

Forward primer 5' CGCTGACCAGTGA CTCCAAT 3'

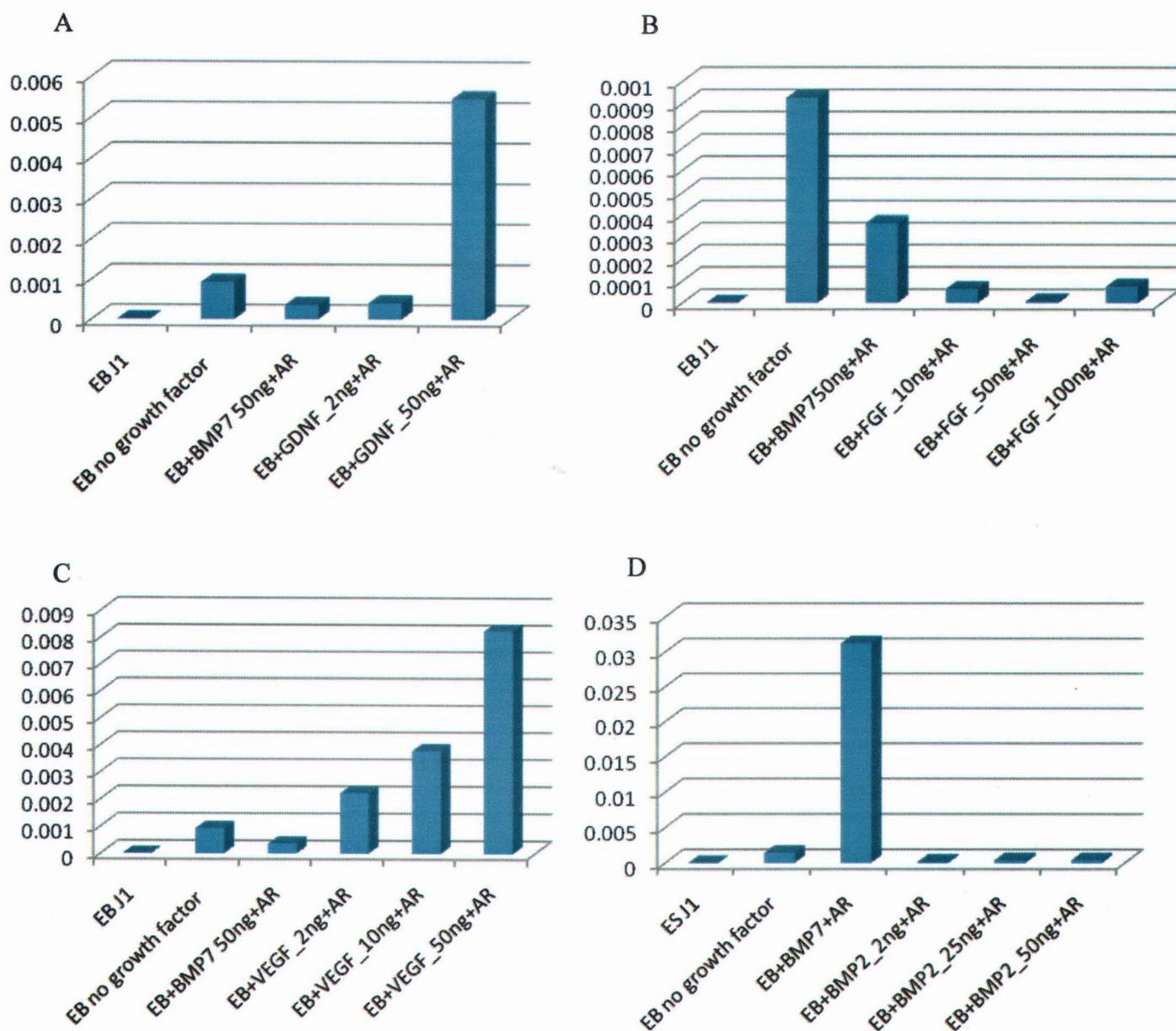
Reverse primer 5' GCCGCTTGTTTATCTGGTGA 3'

ทำ PCR โดยมี condition ดังนี้

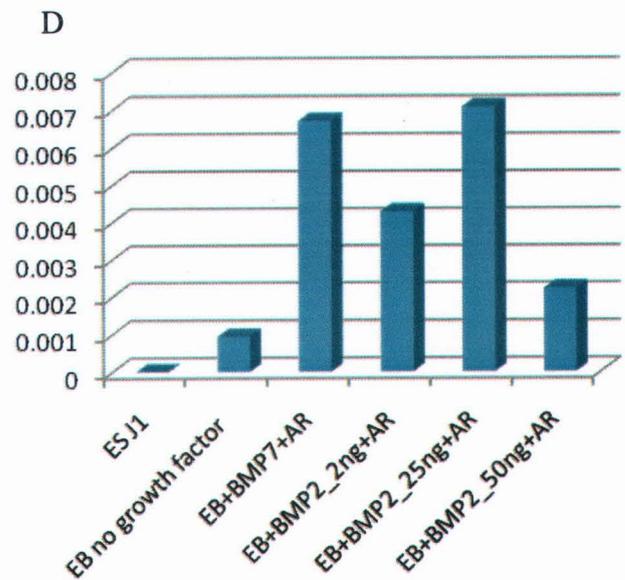
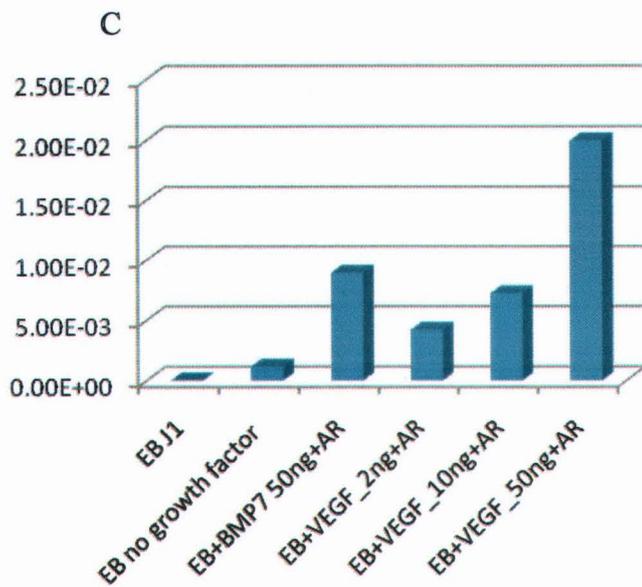
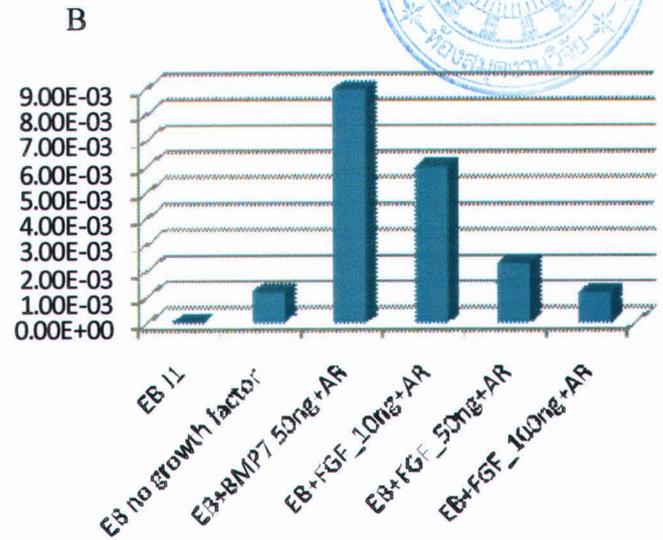
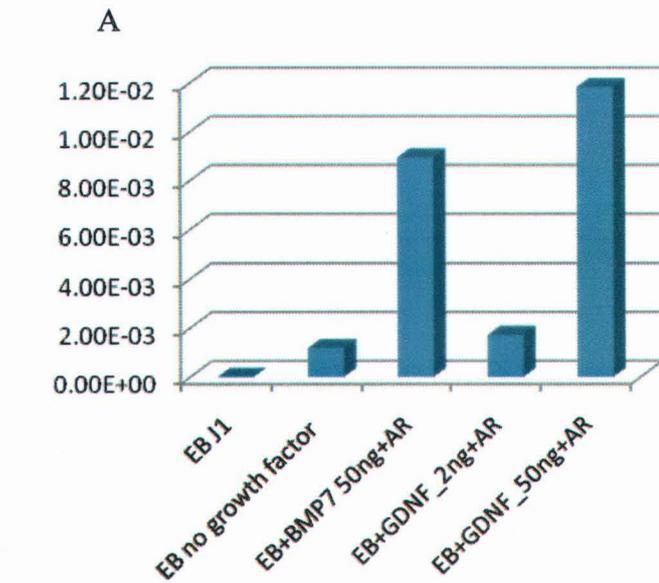
Condition

95 °c	3 min	
95 °c	15 sec	} 30 cycle
60 °c	30 sec	
72 °c	30 sec	
72 °c	5 min	

จากผลการทดลองพบว่า VEGF ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml สามารถเหนี่ยวนำให้ mESC เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตได้ดีที่สุดโดยเซลล์ที่ได้จะมีการแสดงออกของ PAX2 และ Six2 ในระดับที่สูงกว่าการเหนี่ยวนำด้วยสารชนิดอื่นเมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Realtime PCR (ภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3)



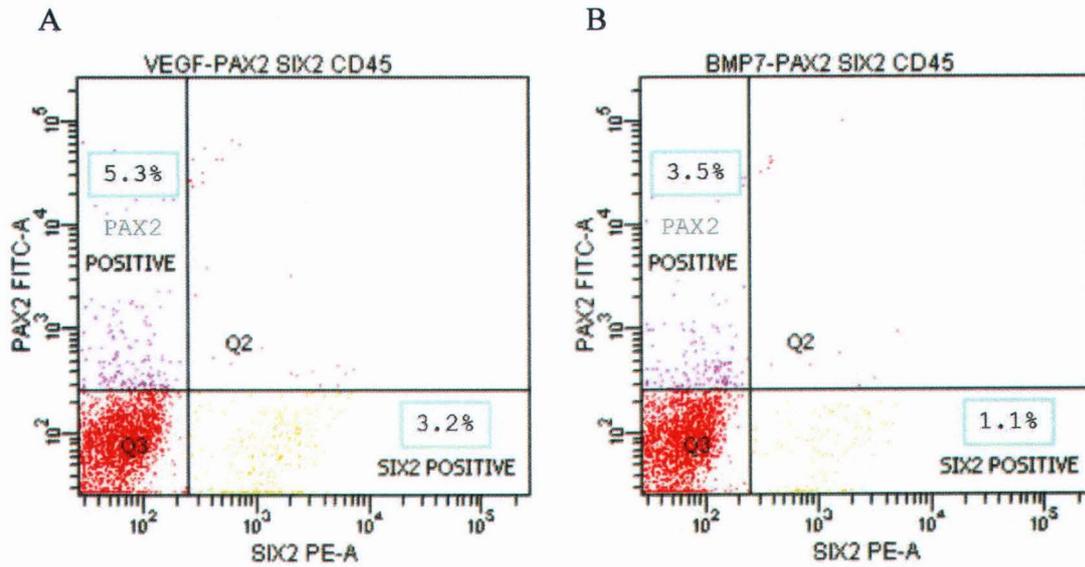
ภาพที่ 2 แสดงผลการแสดงออกของยีน PAX2 ที่ได้จาก mESC ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย GDNF (A), FGF (B), VEGF (C) และ BMP2 (D) ที่ความเข้มข้นต่างๆเปรียบเทียบกับ BMP 7



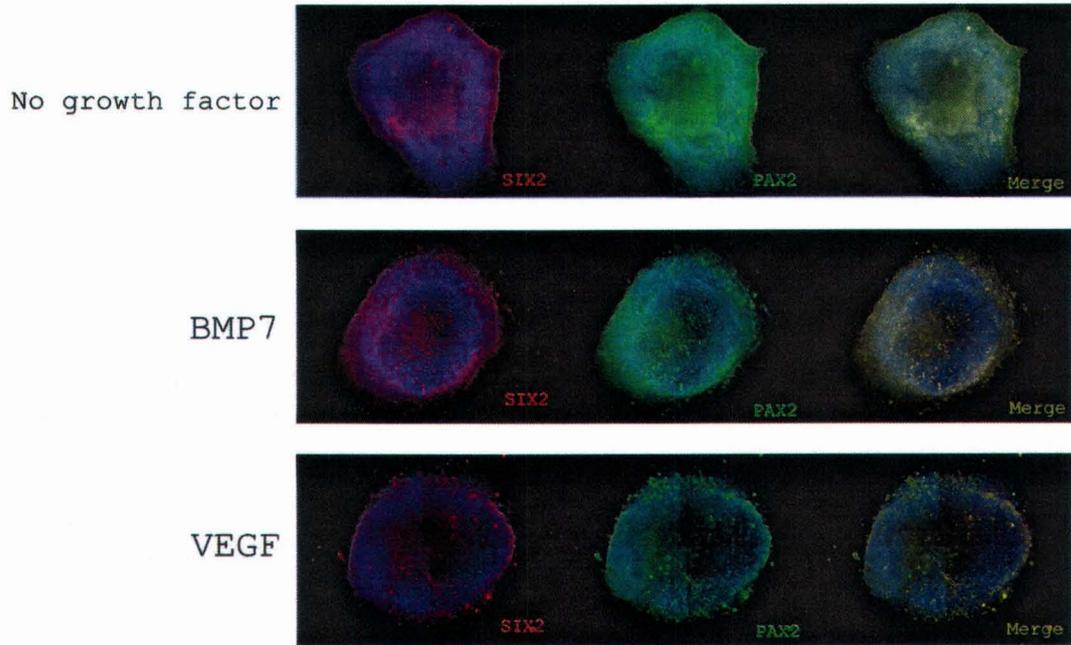
ภาพที่ 3แสดงผลการแสดงออกของยีน SIX2ที่ได้จาก mESCที่มีการเหนี่ยวนำด้วย GDNF (A), FGF (B), VEGF (C) และ BMP2 (D) ที่ความเข้มข้นต่างๆเปรียบเทียบกับ BMP 7

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่..... 2 กรกฎาคม 2555
 เลขทะเบียน..... 245900
 เลขเรียกหนังสือ.....

และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของ PAX2 และ Six2 positive cell ด้วยเทคนิค Flow cytometer และ Immunofluorescence staining ใน EB ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตด้วย VEGF เปรียบเทียบกับการใช้ BMP 7 พบว่าปริมาณ PAX2 และ Six2 positive cell ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย VEGF ให้จำนวนของ PAX2 และ Six2 positive cell มากกว่าการเหนี่ยวนำด้วย BMP7 (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5)ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วย Real time PCR

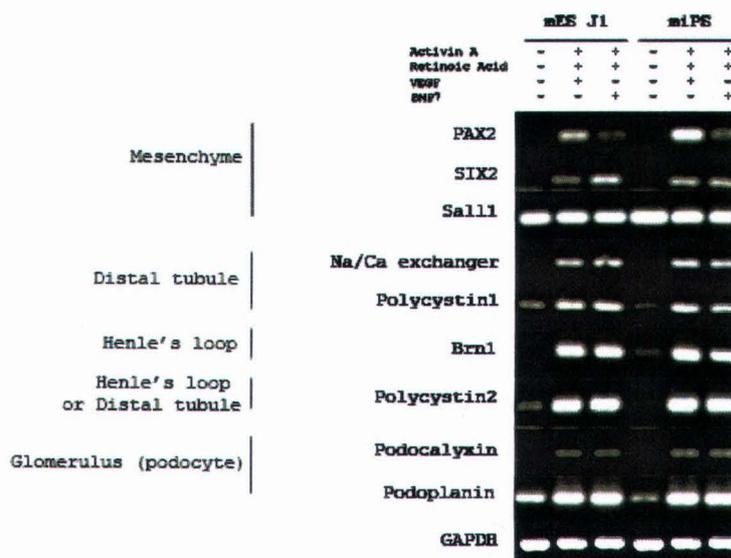


ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณ PAX2 และ Six2 positive cell โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Flow cytometer ,(A) 10 ng/ml activin A, 0.1 μ M retinoic acid, 50ng/ml VEGF; (B) 10 ng/ml activin A, 0.1 μ M retinoic acid, 50 ng/ml BMP7



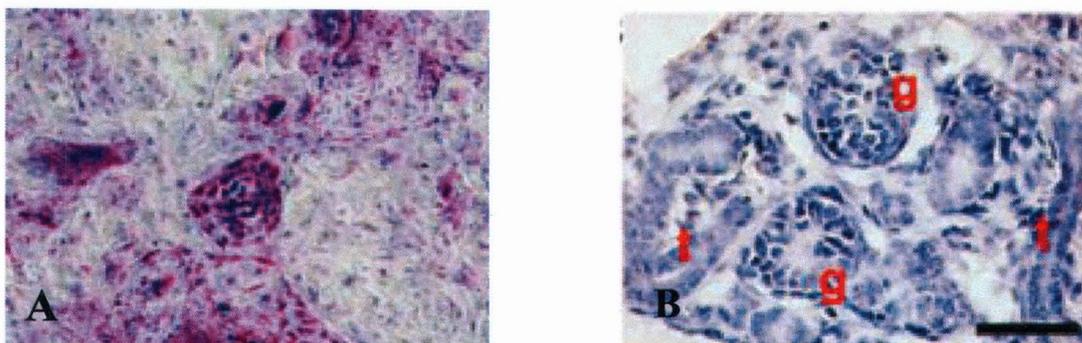
ภาพที่ 5 Immunofluorescence staining ของ EB ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 10 ng/ml activin A, 0.1 μ M retinoic acid , 50 ng/ml BMP7 เปรียบเทียบกับ EB ที่มีการเหนี่ยวนำด้วย 10 ng/ml activin A, 0.1 μ M retinoic acid, 50ng/ml VEGF และใช้ EB ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วยสารใด (no growth) เป็นตัวควบคุม

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ mESC และ mouse induced pluripotent stem cell (miPS) ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตจากการเหนี่ยวนำด้วย VEGF และ BMP7 โดยทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตด้วยเทคนิค PCR พบว่าเซลล์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย VEGF และ BMP7 มีการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์หน่วยไตจริง (ภาพที่ 6) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ VEGF สามารถเหนี่ยวนำให้ mESCเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตได้จริง และได้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีเดิมที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นการบรรลุวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้



ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์หน่วยไต เมื่อทำการเหนี่ยวนำ mESC และ miPS ด้วย VEGF และ BMP7

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยยังมีความสนใจศึกษาความสามารถในการสร้าง glomerulus-like structure จาก renal progenitor ที่ได้จากการเหนี่ยวนำ mESC ด้วย 10 ng/ml activin A, 0.1 μM retinoic acid, 50 ng/ml VEGF เป็นเวลา 5 วัน นำมาทำการ dissociate แล้วนำไปเลี้ยงต่อบน Feeder 3T3-BMP4 พบว่าลักษณะรูปร่างของเซลล์มีลักษณะคล้ายกับ glomerulus-like structure ดังแสดงในภาพ 4(A)



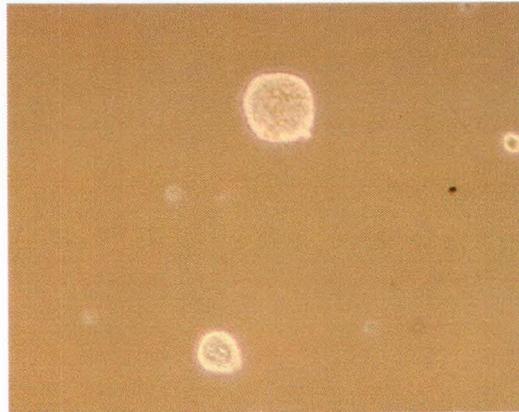
ภาพที่ 7 (A) Renal progenitor ที่ทำการเหนี่ยวนำจาก mESC มีการสร้าง glomerulus-like structure เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบน 3T3-BMP4; ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับลักษณะของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง Sall1⁺ renal progenitor ที่แยกได้จาก metanephric mesoderm (Osafune, K., et al., 2005)

นอกจากนี้การเพื่อสร้างวิธีในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ของหน่วยไตอย่างจำเพาะผู้วิจัยได้สร้างเซลล์ 3T3 ที่มีการนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงให้มีการแสดงออกของ Wnt4 เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด glomerulus-like structure เมื่อนำ embryonic kidney มาทำการเพาะเลี้ยงบน 3T3 Wnt4 ซึ่งผู้วิจัยสนใจที่จะนำมาใช้ร่วมกับการใช้ Growth factor เพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ของหน่วยไตที่ต้องการอย่างสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยทำการสร้าง 3T3Wnt4 โดยการ infect 3T3cell โดยการใส่ Retro virus ที่สารพันธุกรรมมี DNA ที่ใช้ในการสร้าง Wnt4 แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Wnt4 อย่างถาวรโดยการคัดเลือกเซลล์ที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และมีการแสดงออกของ Wnt4 ในระดับที่สูงที่สุดด้วย(ภาพที่ 8) ซึ่งผู้วิจัยได้3T3Wnt4 มาใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนWnt4 ของ 3T3-Wnt4 และ 3T3

การศึกษาวิธีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไต เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตที่สามารถสร้างได้จากการเหนี่ยวนำด้วย Growth factor จำเพาะ โดยในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงในรูปแบบ Nephrosphereซึ่งสามารถเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวนของเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งต้นหน่วยไตในลักษณะ Nephrosphere โดยการแยก Embryonic Kidney ที่ Embryonic day11.5 (E11.5)มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ 0.05% Trypsin-EDTA แล้วทำการเพาะเลี้ยงใน Nephrosphere media พบว่าสามารถเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวนของ Nephrosphereได้จริง (ภาพที่ 8) ซึ่งผู้วิจัยจะนำวิธีนี้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนของเซลล์ตั้งต้นของหน่วยไตที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย growth factor จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณสำหรับพัฒนาสู่การนำไปใช้ในการรักษาต่อไป



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของ Nephroshere ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จาก mouse Embryonic kidney