รายงานการวิจัย

การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์ด้านรก และการควบคุมให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ตับ

Establishment of human amniotic membrane derived stem cell and control differentiation into hepatocytes

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. น.พ. สุพัชญ์ สีนะวัฒน์

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาล คณะแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย
หัวหน้าโครงการ
มกราคม 2554

โครงการวิจัยเรื่อง ภาษาไทย การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์ด้านรกและการควบคุมให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ตับ

ภาษาอังกฤษ Establishment of human amniotic membrane derived stem cell and control differentiation into hepatocytes

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2552 **จำนวนเงิน** 1,000,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **เริ่มทำการวิจัยเมื่อ**วันที่ 23 เมษายน 2552

รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย ครั้งที่ 2 ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2552 ถึงเดือน มีนาคม 2553

รายนามคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ นายรังสรรค์ พาลพ่าย
   คุณวุฒิ ปริญญาเอกสาขาวิชา Animal Reproduction (Kyoto University)
   ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
   สถานที่ทำงาน ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด
   สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี
   อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ 044-224 234 โทรสาร 044-224 154
   E-mail: rangsun@g.sut.ac.th
2. ผู้ร่วมงานวิจัย นายสุพัชญ์ สีนะวัฒน์
   คุณวุฒิ แพทยศาสตร์บัณฑิต, Dip. Thai Sub-Board in Reproductive Medicine,
   Dip. Thai Board in Family Medicine
   ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
   สถานที่ทำงาน ภาควิชาสรีรวิทยา
   คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
   อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
   E-mail : sisupat@kku.ac.th

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำสามารถแสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดได้หลายประการ จึงทำให้เซลล์ดังกล่าวได้รับการมองถึงในฐานะเซลล์ต้นกำเนิดทางเลือกแทนที่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนซึ่งมีข้องจำกัดทางจริยธรรมอยู่มาก การทำการศึกษาในครั้งนี้จึงพิจารณาเลือกใช้เซลล์ชนิดนี้ เพื่อเหนี่ยวนำไปเป็น เซลล์ตับโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ไปเป็นเซลล์ตับที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากความรู้ ที่ว่าเซลล์ที่บุผนังถุงน้ำคร่ำนั้นมีการแยกตัวออกมาจากส่วนของ epiblast นานก่อนที่จะมี กระบวนการแบ่งตัวในขั้นตอนการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ออกเป็นเนื้อเยื่อ 3 ชั้นเพื่อสร้างอวัยวะเกิดขึ้น ทำให้เชื่อว่า เซลล์ดังกล่าวจะยังคงคุณสมบัติ pluripotency ของ epiblast เอาไว้ ในการทดลองนี้จะทำการเก็บ เนื้อเยื่อถุงน้ำคร่ำมาจากการผ่าคลอดแล้วนำเนื้อเยื่อกลับสู่ห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง ทำการแยกเซลล์ ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำด้วยการใช้เอนไซม์ย่อย ก่อนทำการเพาะเลี้ยงต่อไป เซลล์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ สามารถแสดงผลบวกต่อโปรตีนที่บ่งคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดบางชนิด และอัลบูมินได้ ขั้นตอนการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตับที่ใช้ได้รับการปรับปรุงมาจากวิธีที่ใช้กับ Mesenchymal stem cell (MSC) โดยเพิ่มระยะเวลาในระยะแรก ให้ยาวขึ้น ภายหลังการเหนี่ยวนำ เซลล์ที่ได้สามารถแสดงคุณสมบัติของเซลล์ตับบางประการได้ โดยเฉพาะยีน หรือโปรตีนสำคัญเช่น alpha-fetoprotein (AFP) และ albumin (ALB) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตลอดระยะเวลาการเหนี่ยวนำ รวมถึงเซลล์สามารถผลิต และหลั่ง albumin ออกมาในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่าสามารถสร้างและหลั่ง albumin ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างน้อย 30 เท่า ซึ่งทำให้อนุมานได้ว่า เซลล์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำมีการเปลี่ยนแปลงไปจากคุณสมบัติของไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติของเซลล์ตับมากขึ้น ในการนี้สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากการทดลองไปประยุกต์ใช้ หรือศึกษาต่อยอด เพื่อการใช้เป็นการรักษาทางเลือกในรายผู้ป่วยโรคตับในอนาคตได้

คำสำคัญ : เซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำ เซลล์ตับ เซลล์ต้นกำเนิด การเหนี่ยวนำ การตรวจสอบคุณสมบัติ

Abstract

Amniotic epithelial (AE) cell expressed some embryonic stem cell markers suggesting that it might be a useful source of stem or progenitor cells with less ethical concern comparing to embryonic stem cell. The objective of this study is to find the effective differentiation protocol for human AE (hAE) cell differentiation towards hepatic lineage into mature hepatocyte. The AE cell shift directly from the epiblast long before the gastrulation takes place so the pluripotency still remain. In this study, we collected the fresh amnion directly from the Cesarean section case and the tissues were sent to the laboratory within 4 hours. The AE was collected using mild enzymes and cultured under the proper environment. Most of the cell lines expressed several ES cell markers and albumin. The diffentiation protocol used was adapted from the standard Mesenchymal stem cell (MSC) to hepatocyte protocol with some extended period in the early step. The results showed some improvement in differentiated target cells since more markers have been expressed with the adapted protocol. Eventhough, not all the markers or genes were expressed. The major hepatic markers such as alpha-fetoprotein (AFP) and albumin (ALB) were constantly expressed and differentiated cells were also able to produce and secrete albumin into the culture media at least 30 folds when compare to control group. Therefore it could be assumed that, after diffentiation, AE cells tend to gain more hepatic charactor than the fibroblast characteristic. In conclusion, we could differentiate the AE cell into hepatocyte-like cell. This could be provided for the treatment of choice for hepatic diseases. Further study would be suited for the cell propagation in order for use in practical purpose.

Keyword : Amniotic epithelial cell, hepatocyte, stem cell, differntiation, characterization

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ…… ก
บทคัดย่อ…… ข
สารบัญเรื่อง…… ง
สารบัญตาราง…… จ
สารบัญภาพ…… ฉ

1.บทนำ…… 1
2.การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง…… 1
3.ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์……2
3.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยวิธี
Immunocytochemistry analysis……3
3.3 การเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์เจริญ
เป็นเซลล์ตับ……..4
3.4 การตรวจคุณลักษณะของเซลล์เซลล์ตับที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์
ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำ……5
3.4.1 RT-PCR…… 5
3.4.2 การตรวจโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ตับ
ด้วย Immunocytochemistry analysis……5
3.4.3 การตรวจ albumin ด้วยวิธี ELISA……5

4.ผลการวิจัย
1.เซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำมนุษย์แสดงคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ
เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนบางประการ……..6
2.การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์เป็นเซลล์
ที่มีคุณลักษณะคล้ายเซลล์ตับ……...11
3.การตรวจคุณลักษณะของเซลล์เซลล์ตับที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์
ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)……18

4.เซลล์ที่มีคุณลักษณะคล้ายเซลล์ตับสามารถสร้างอัลบูมิน (albumin)……..19
5.อภิปราย และวิจารณ์ผล……21
6.สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……22
7.บรรณานุกรม……23
8.ประวัติผู้วิจัย……..25

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การแสดงออกของเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ด้วยวิธี immunocytochemistry…… 7

ตารางที่ 2 การแสดงออกต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตับของเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE2 ด้วยวิธี immunocytochemistry……..12

ตารางที่ 3 การแสดงออกต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตับของเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE3 ด้วยวิธี immunocytochemistry……..12

ตารางที่ 4 สรุปรูปแบบการแสดงออกต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตับของเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์ ทั้ง 3 สายพันธุ์ (AE4, AE7 และ AE8) ด้วยวิธี immunocytochemistry……..15

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนการทดลองการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำเป็นเซลล์ตับ..... 4

รูปที่ 2 การตรวจคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE2 และ AE3 ด้วยวิธี immunocytochemistry กำลังขยาย 200 x..... 8

รูปที่ 3 การตรวจคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE4 ด้วยวิธี immunocytochemistry กำลังขยาย 200 x..... 9

รูปที่ 4 การตรวจคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE5, AE6 และ AE7 ด้วยวิธี immunocytochemistry กำลังขยาย 200 x.....10

รูปที่ 5 การตรวจคุณสมบัตเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE8 ด้วยวิธี immunocytochemistry กำลังขยาย 200 x.....11

รูปที่ 6 การแสดงออกของ alpha-fetoprotein (AFP) และ albumin (ALB) ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE2 เป็นเซลล์ตับ กำลังขยาย 100 x.....13

รูปที่ 7 การแสดงออกของ alpha-fetoprotein (AFP) และ albumin (ALB) ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE3 เป็นเซลล์ตับ กำลังขยาย 200 x.....14

รูปที่ 8 การแสดงออกของ alpha-fetoprotein (AFP), albumin (ALB), cytokeratin18 (CK18) และ CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPA) ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE4 เป็นเซลล์ตับ กำลังขยาย 100 x.....17

รูปที่ 9 การแสดงออกของ alpha-fetoprotein (AFP), albumin (ALB), cytokeratin18 (CK18) และ CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPA) ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE7 เป็นเซลล์ตับ กำลังขยาย 100 x.....17

หน้า

รูปที่10 การแสดงออกของ alpha-fetoprotein (AFP), albumin (ALB), cytokeratin18 (CK18) และ CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPA) ภายหลังการเหนี่ยวนำเซลล์อิพิทีเลี่ยมของถุงน้ำคร่ำสายพันธุ์ AE8 เป็นเซลล์ตับ กำลังขยาย 100 x……18

รูปที่11 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์เป้าหมาย (d21) จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำมนุษย์ไปเป็นเซลล์ตับ ต่อยีนที่สำคัญของเซลล์ตับด้วยวิธี RT-PCR…….19

รูปที่12 ปริมาณ Albumin ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ตับที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำ (1) ……..20

รูปที่13 ปริมาณ Albumin ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ตับที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากผนังถุงน้ำคร่ำ (2)……..20