

ผลการวิจัย

การเก็บแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

ระยะเหมาะสมที่ทำให้การเก็บเลือดได้มีประสิทธิภาพคือระยะที่ตัวอ่อนมีพัฒนาการอยู่ในช่วง 13-15 HH ซึ่งจะมีการเจริญของเส้นเลือดดี (ภาพที่ 1a) สามารถเจาะเก็บเลือดจาก vitelline vein หรือ sinus terminalis (ภาพที่ 1b) ได้ และได้จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดมากที่สุด ถ้าตัวอ่อนมีพัฒนาการที่ต่ำกว่านี้ พบว่าพัฒนาการของเส้นเลือดยังไม่สมบูรณ์ การเก็บเลือดทำได้ยาก ส่วนถ้าเก็บเลือดในระยะหลังจากระยะที่ 15 HH พบว่าแม้ว่าเส้นเลือดจะมีขนาดใหญ่ปริมาณเลือดมาก แต่มักดูดเก็บเลือดได้ไม่หมดเนื่องจากมีเลือด จำนวนหนึ่งค้างอยู่ในเส้นเลือดในตัวอ่อน ขณะเดียวกันพบว่าเซลล์ไข่แตกได้ง่ายขึ้นจากการที่ไข่มีความหนืด ชื้นน้อยลง

ภาพที่ 1 ตัวอ่อนของไก่และการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด a) แสดงตัวอ่อนของไก่ที่อยู่ในตู้ฟักเป็นเวลา 54 ชั่วโมง มีพัฒนาการอยู่ในระยะที่ 14 HH, b) การเจาะเลือดด้วย glass capillary pipette ในตำแหน่งเส้นเลือด Sinus terminalis

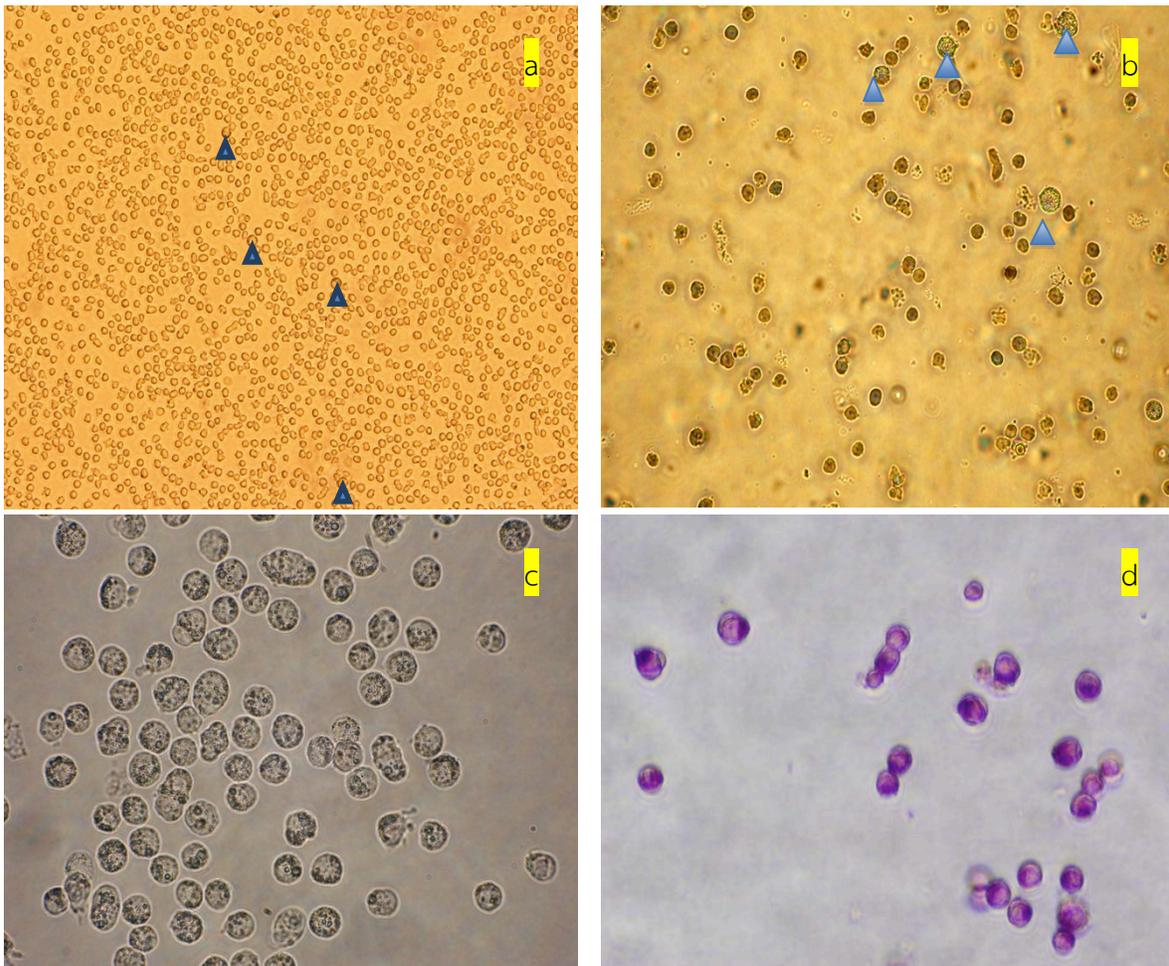
การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

การเตรียมเซลล์ที่เลี้ยง พบว่าสามารถใช้ KAv-1 โดยไม่ต้องเติม Rho-kinase inhibitor Y-27632 ได้

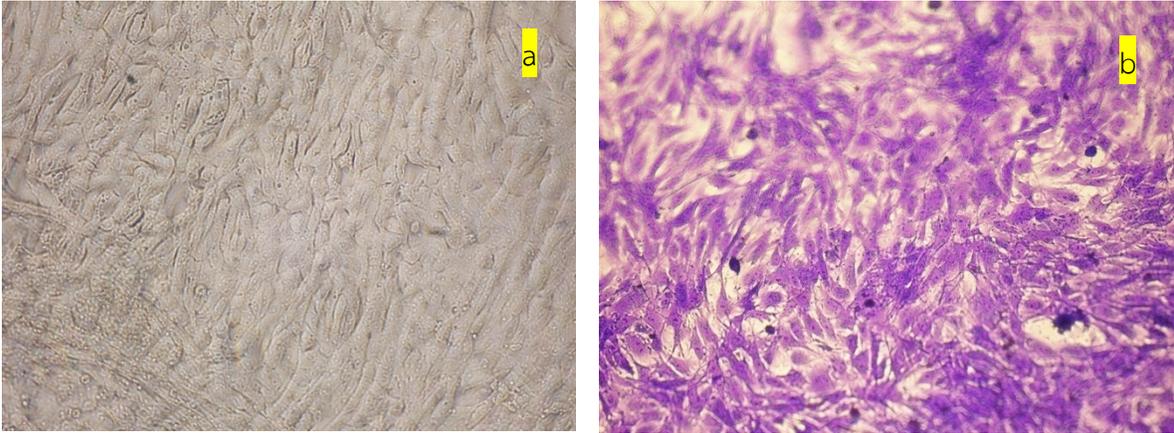
เซลล์ใน passage แรกๆ จะมีกลุ่มเซลล์รูปร่างต่างๆ กัน และมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ แต่เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงไประยะเวลาหนึ่งจะเป็นการคัดเลือกให้ได้เซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างกันน้อยลงเรื่อยๆ จนได้ ประชากรเซลล์ที่มีลักษณะภายนอกแบบเดียวกันและเรียงตัวเป็นระเบียบ โดยประมาณจะเป็น passage ที่ 10 ขึ้นไป จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงที่ดี และมีอัตราการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนคงที่ได้เป็นระยะเวลานานเกิน 20 passages ขึ้นไป จะมีรูปร่างเป็น fibroblast รูปร่างคล้ายเส้น (fibroblast-like cells) ที่ไม่มีปลายเรียวแหลมยื่นยาว (ภาพที่ 3 a, b) ซึ่ง fibroblast ที่เป็นกระสวยผสม ปลายเรียวแหลมยาวนี้จะพบใน passage แรกๆ เซลล์จะมีการแบ่งตัวไม่คงที่ในแต่ละ passage และเรียงตัว ไม่เป็นระเบียบ นอกจากนั้นยังมีแนวโน้มที่จะมีอายุสั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่เป็นกระสวยสั้น

ปัจจัยที่สำคัญต่อการได้ fibroblast-like cells เจริญแบ่งตัวออกจากชั้นเนื้อเยื่อที่พบในการศึกษานี้ คือ ความหนาแน่นของชั้นเนื้อเยื่อต่อพื้นที่เพาะเลี้ยง ถ้ามีสัดส่วนเนื้อเยื่อต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงน้อย หรือปริมาณ เนื้อเยื่อน้อยในภาชนะขนาดใหญ่จะมีผลให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อน้อย และเซลล์ ส่วนใหญ่จะเริ่มตาย

เซลล์ที่เลี้ยงที่เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวสามารถนำกลับมาใช้เลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บแช่แข็งเซลล์ที่เลี้ยง ภายหลังจากยับยั้งการแบ่งเซลล์ด้วย mitomycin C แล้ว ซึ่งเซลล์เหล่านี้ก็จะพร้อมใช้งานได้เลยหลังจากการ thaw ที่เหมาะสม ระยะเวลาการยับยั้งด้วย mitomycin C ที่เหมาะสม คือ 3.5 ชั่วโมง ในการทดลองใช้ระยะ 4 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จำนวนหนึ่งตายและหลุดจากพื้นผิว ภาวะเพียง 1 วันหลังจากเลี้ยงเซลล์ ขณะที่การทดลองใช้เวลา 2 และ 3 ชั่วโมง มีเซลล์บางส่วนที่ยังมีการ แบ่งตัวเพิ่มจำนวน ทำให้หลุดร่อนออกจากพื้นผิวภาชนะ เลี้ยงเซลล์ในอาทิตย์ต่อมา



ภาพที่ 2 เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในกระแสเลือดของตัวอ่อนไก่อายุ 56 ชั่วโมง a) ภาพ phase contrast แสดงตัวอย่างเซลล์ในกระแสเลือดซึ่งมีเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (ตำแหน่งปลายหัวลูกศร) มีลักษณะกลมขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือด นิวเคลียสมีขนาดเกือบเต็มเซลล์ b) ภายหลังจากแยกเซลล์เม็ดเลือดส่วนใหญ่ ออกด้วย Nycodenz Density separation c) ภายหลังจากแยกบริสุทธิ์ด้วยการใช้ Glass capillary pipette ดูดเก็บที่ละเซลล์ d) ย้อมด้วย Periodic Acid Schiff



ภาพที่ 3 เซลล์ที่เลี้ยงที่เตรียมจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา มีรูปร่างเป็น fibroblast-like cells a) ภาพ phase contrast b) ย้อมด้วย Crystal violet

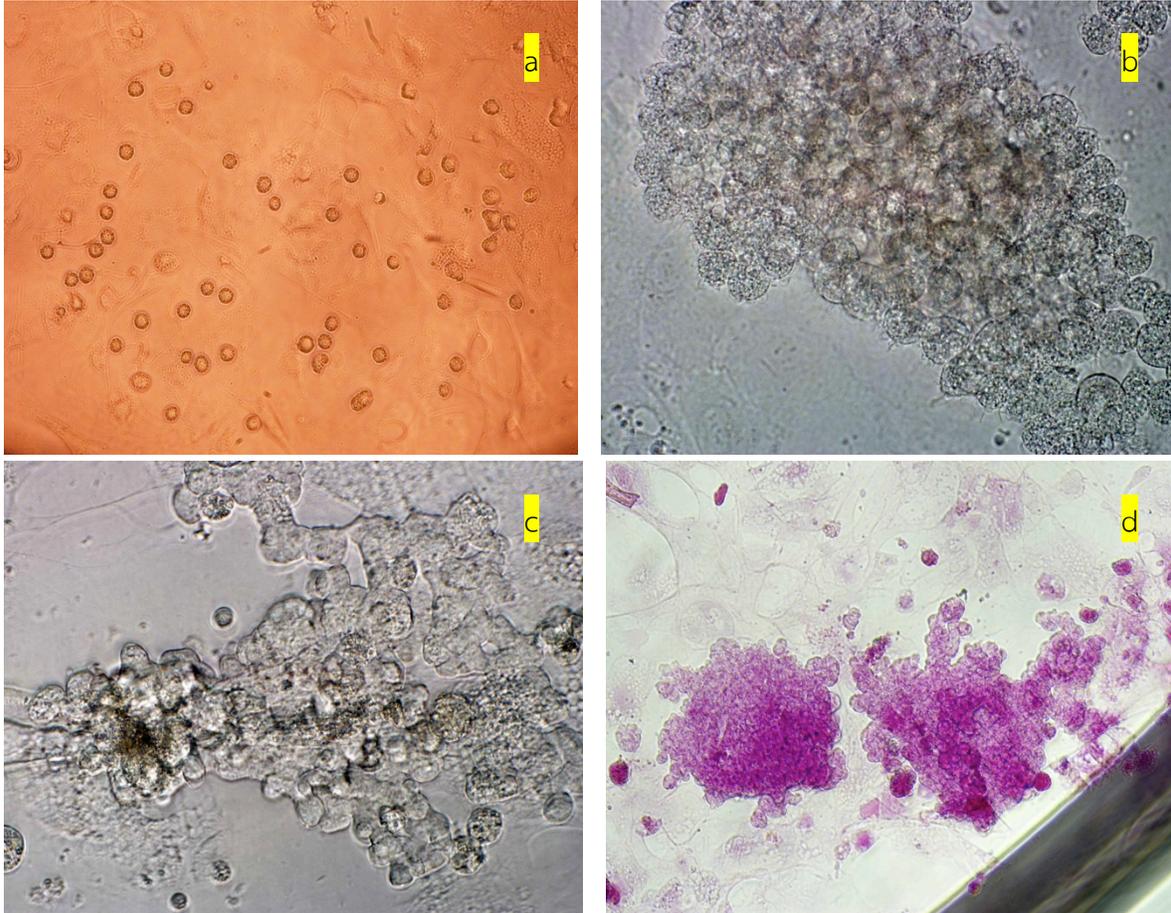
ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสปีชีส์อื่นนอกจากไก่ และไก่ป่า (*Gallus gallus gallus*) พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงที่เตรียมจากตัวอ่อนนกกระทาและอาหารเลี้ยงเซลล์ KAV1 ที่มี 5% FCS และ Chicken serum สามารถสนับสนุนการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของ ไก่ฟ้า พญาล่อ ไก่ฟ้าหลังขาว และ ไก่ฟ้าหลังเทา ได้เช่นเดียวกัน ในระยะเริ่มแรกที่ย้ายเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดลงเลี้ยง บนเซลล์ที่เลี้ยง เซลล์จะกระจายเป็นเซลล์เดี่ยว (ภาพที่ 4 a) และจะยังไม่เกาะกับเซลล์ที่เลี้ยง หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงไว้มีการเกาะกลุ่มกันประมาณ 2-3 เซลล์ และเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 4-5 เซลล์ หลังจาก 1 สัปดาห์ และจะเห็นเป็นกลุ่มชัดเจนมากขึ้นหลังจากเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 4 b, c) และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้นี้ให้ผลการย้อมสี PAS ติดสีชมพู ขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงไม่ติดสี

จากการทดลองทำซ้ำหลายๆ ตัวอย่าง พบว่าเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดบางตัวอย่างสามารถเจริญเติบโต ได้ดี และสามารถเลี้ยงได้ยาวนานถึง 3 เดือน หรือ passage ที่ 6 ขณะที่บางตัวอย่างมีการเติบโต เพิ่มจำนวนช้าและเลี้ยงได้เพียง 2-3 passages และบางตัวอย่างไม่มีการเพิ่มจำนวนและตายไปในที่สุด ความผันแปรนี้ไม่คงที่ คือเกิดแบบสุ่มในทุกสปีชีส์ที่ทดลอง

การศึกษา proteome และ secretome ของเซลล์ที่เลี้ยง

ผลการศึกษาดังภาพที่ 5 พบว่ามีโปรตีนในเซลล์เซลล์ที่เลี้ยง 42 ชนิด ที่พบมีการแสดงออก (proteome) ในระดับต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงจากตัวอ่อนนกกระทา ไก่ฟ้าหลังขาว และไก่ฟ้าพญาล่อ ขณะที่การตรวจโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากใช้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีโปรตีน 213 ชนิดที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่

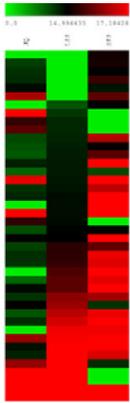
เลี้ยงทั้งสามชนิด (ภาพที่ 5) และเมื่อนำมาวิเคราะห์แยกกลุ่มโปรตีนตามการปรากฏร่วมกันระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงแต่ละชนิดพบว่า มีโปรตีน 1 ชนิดที่มีการแสดงออกในไก่ฟ้าพญาลอโดยไม่ปรากฏในเซลล์ของนกกระทาและไก่ฟ้าหลังขาว (ภาพที่ 6) แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนดังกล่าวไม่มีข้อมูลเชื่อมโยงกับสิ่งที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการ เพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด



ภาพที่ 4 เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด แสดงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงบนเซลล์ ที่เลี้ยงที่เตรียมจากตัวอ่อนนกกระทา a) เซลล์ที่เลี้ยงเรียงตัวเป็นชั้นเดียวแบนเรียบและใส ไม่รบกวนการมอง เห็นเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่เกาะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อยู่ด้านบน b) ภาพ phase contrast ของเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดของไก่ฟ้าพญาลอที่เจริญเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ c) ภาพ phase contrast ของโคโลนีของ เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่เนื้อ d) โคโลนีของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่ย้อมด้วยสี PAS ติดสีชมพูใน ไฮโดรพลาสซึม

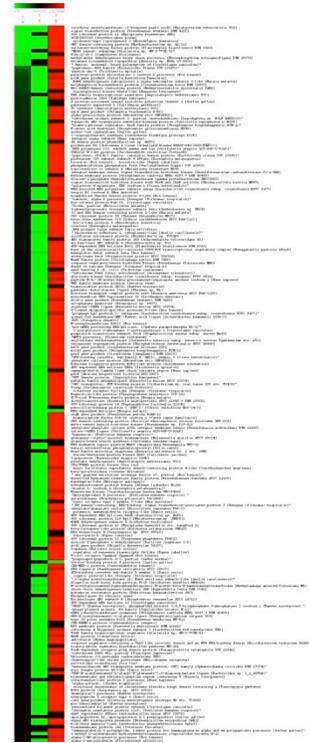
Proteome

Secretome



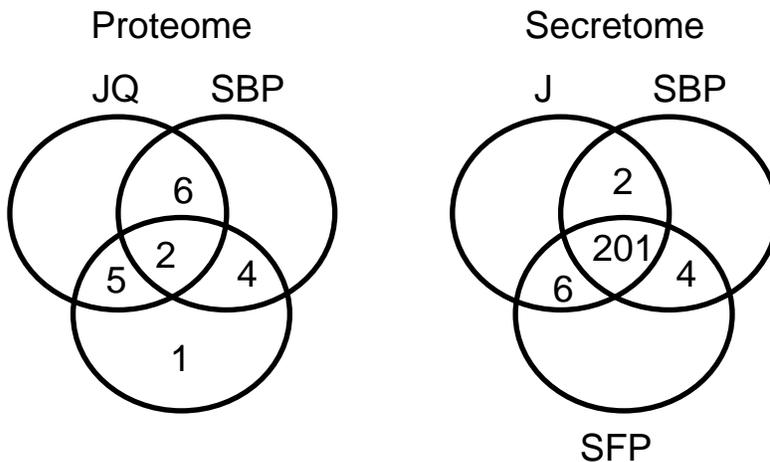
"cysteine T420-dependent S1.210-methylase tetrahydroxymethyltransferase (Microbacterium terraeum Jc1807)"
 ubiquitin-protein domain-containing protein (Halpingera sp. ATCC 50018)
 interactor beta 1 (Marrispus rugosus)
 glycerol kinase (Escherichia coli)
 IHC class II beta chain (Salinus salinus)
 pectinase (Acetivibrio acidiarum)
 peptidase N-glycanase spagase (Aedes aegypti)
 thymidine dehydrogenase (Coryliobolus wickerhamii DSM)
 tumor-dependent receptor family protein (Brevundimonas dimorpha ATCC 33450)
 DNA topoisomerase IV (Haloplasma contractile SFP-178)
 type I collagen alpha 2 (Falalichthys olivaceus)
 eIF-1A subunit (Lactobacillus reuteri DSM)
 chitinase sulfotransferase XAT (Dumetia munda)
 TPA-like NDC129C (Drosophila melanogaster)
 nucleolar fraction protein NFE1 homolog 5 (Mus musculus)
 ABC transporter permease (Desulfobacca acetoxidans DSM 11109)
 FadL family transmembrane lipoprotein (Heterobacterium hydrogenifigens DSM 15370)
 antibiotic transposon multiple antibiotic resistance-like protein (Bacteroides salinarum CFBP-697)
 myosin regulatory light chain c, smooth muscle major isoform (Salix glauca)
 homodimer protein (Dorobacterium bozemanii ATCC 4912)
 zinc finger protein, C2H2-like (Monodictyon domesticum)
 cobalamin-specific enzyme subunit (Fluorectidion botulinum F str. Langeland)
 telomerase catalytic subunit (Heterococcus amarus)
 chaperone DnaD (Lactobacillus reuteri JF-001)
 penicillin-binding protein 2 (Salix glauca)
 myosin III-like (Drosophila melanogaster)
 "GTP-binding protein eta, noncatalytic (Pellicularia homopus carpatica)"
 "proteasome subunit papain-like protease III; L-Thr-L-Val component (Paenibacillus spingus pv. glycinus str. race 8)"
 transmembrane growth factor beta receptor precursor (Ciona intestinalis)
 e3 ubiquitin-protein ligase NEMO1 (Monodictyon domesticum)
 Fc gamma R1b.4 (Carnobacterium flagellum)
 myosin-C (Homo sapiens)
 TSP 14-3-3 protein small transmembrane protein (Halomonas elongata DSM 2501)
 "immunoglobulin heavy chain VDJ region, partial (Mus musculus)"
 glutamate synthase alpha subunit (Serratia flagra ATCC 25750)
 "E1A-like protein 1, partial (Epinephelus tilapia)"
 "myosin VI transmembrane (Microbacterium terraeum ATCC 50018)"
 T420-dependent S1.210-methylase subunit 2 (Halobacillus salinarum Jc18046)
 hsp70-like (Drosophila pseudoobscura pseudoobscura)
 "high density lipoprotein (HDL) binding protein, isoform CRA_3 (Mus musculus)"
 Transcription elongation factor 2 (Epinephelus spilargenteus DSM-2)
 aminoglycoside phosphoryltransferase (Polymorphus gilvum Jc002-12a1)

42 differential expressed proteins



213 differential expressed proteins

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบชนิดโปรตีนที่มีการแสดงออกต่างกัน แสดงชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกต่างกัน ระหว่าง feeder ที่เตรียมจากตัวอ่อนนกกกระทา (Japanese quail, JQ) ไก่ฟ้าหลังขาว (Silverback pheasant, JBP) และไก่ฟ้าพญาลอ (Siamese Fireback pheasant, SFP)



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกัน แสดงการเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกันระหว่างเซลล์ฟีเลี้ยง ที่เตรียมจาก ตัวอ่อน นกกระทา (Japanese quail, JQ) ไก่ฟ้าหลังขาว (Silverback pheasant, JBP) และไก่ฟ้าพญาลอ (Siamese Fireback pheasant, SFP)