รหัสโครงการ TRG5080007

ชื่อโครงการ การศึกษารูปแบบ epigenetics ของ mesenchymal stem cell ใน passage ต่างๆภายหลังการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ชื่อนักวิจัย ดร.ทัศนีย์ เพิ่มไทย
หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อรักษาทางการแพทย์
ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address bsuteevun_1 @ yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงของกลไก epigenetics ซึ่งเป็นกลไกใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิด

วิธีการทดลอง : น้ำคร่ำจากสตรีตั้งครรภ์ 14-16 สัปดาห์จำนวน 10 ตัวอย่างที่ได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรถูกนำมาแยกเก็บเซลล์ต้นกำเนิด (AFS) และเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์ AFS ของแต่ละตัวอย่าง ทำการศึกษาโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ ได้แก่ SSEA4, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 และ CD133 ใน passage ต่างๆ นำเซลล์ AFS มาสกัด DNA และ RNA เพื่อใช้วิเคราะห์ระดับ global DNA methylation ซึ่ง DNA จะถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะเพื่อให้ได้นิวคลีโอไซด์เดี่ยว เพื่อวัดความเข้มข้นของ 5-methyl cytidine โดยคำนวณค่าเทียบกับกราฟมาตรฐาน และทำการศึกษาการแสดงออกของยีนฝังจำด้วยการสร้าง cDNA เพื่อตรวจหาระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ 3 ชนิด ได้แก่ IGF2, MEST และ SNRPN ด้วยเทคนิค real-time PCR

ผลการทดลอง : พบว่าเซลล์ AFS ที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงของระดับ global DNA methylation และการแสดงออกของยีนฝังจำ ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกันในระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการแสดงออกของยีนฝังจำทั้ง 3 ชนิดนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่สูงขึ้น และที่น่าสนใจ คือ พบว่าการแสดงออกของ IGF2 มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ

สรุปผลการทดลอง : ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้พบว่า IGF2 อาจถูกพัฒนาไปใช้เป็นตัวทำนายคุณภาพของคุณสมบัติ self-renewal ของ AFS ได้ ซึ่งจะทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้สำหรับการรักษาผู้ป่วยในอนาคตได้

230904

Project Code TRG5080007

Project Title Epigenetics of mesenchymal stem cell in *in vitro* culture at different passage

Investigator Tatsanee Phermthai (Ph.D)

Embryonic stem cell research and Development unit

Department of Obstetrics and Gynecology

Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

E-mail Address bsuteevun_1 @ yahoo.com

Project Period 2 years

Introduction : To explore epigenetic pattern of amniotic fluid stem cell during *in vitro* prolonged culture.

Materials and Methods : Ten sample of amniotic fluid from 14-16 weeks pregnant women were derived by routinely withdrawal for prenatal diagnosis. The using of human sample was approved by the Ethics Committee of Mahidol University and all participants gave informed consent. The stem cells were isolated from AF samples and made a clonal AFS line culture to passage 15 in each sample. The AFS at passages 8, 12 and a last passage were characterized for specific surface markers, SSEA4, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 and CD133 by flow cytometer. The AFS samples were extracted for DNA and RNA using phenol-chloroform. For global DNA methylation analysis, DNA was enzymatic treated to obtain single nucleoside for the 5-methyl Cytidine concentrations observation. In observation of imprinted gene expression, the cDNA was made and used for finding the expression levels of three imprinting genes, including IGF2, MEST and SNRPN using real time-PCR with selective DNA primers.

Results : Our results explore the variable patterns of global DNA methylation and three imprinted genes expression during the *in vitro* extended AFS. Three imprinted genes show the instability of the expression by gradually decreasing pattern over subculturing passages. Interestingly, we found the association between the IGF2 expression pattern and the maintenance of self-renewal characteristics in AFS.

Conclusion: Our results suggest that the expression of IGF2 may be modified to use as a predictor for self-renewal capacity of each AFS line. It can make high value for AFS line selection for future therapy.