รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพาะเลี้ยง mesenchyml stem cells เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

โดย

ผศ.ดร.อังกูรา สุโภคเวช และคณะ

กุมภาพันธ์ 2554

สัญญาเลขที่ MRG5080187

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการเพาะเลี้ยง mesenchyml stem cells เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. อังกูรา สุโภคเวช
ภาควิชา จุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ศ.นพ. สุรพล อิสรไกรศีล
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1.ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ในปัจจุบันสถานการณ์ความรุนแรงของโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยพบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นปัญหาการตายอันดับต้นๆ ของโลก รวมถึงในประเทศไทยด้วย และมีแนวโน้มสูงขึ้นในอนาคตเนื่องจากวิถีการดำเนินชีวิตที่เร่งรัดมากขึ้นและลักษณะการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป วิธีการรักษาปัจจุบันมีทั้งการได้รับยาเพื่อป้องกันการเกินก้อนเลือดหรือการขยายหลอดเลือด รวมถึงการรักษาโดยการผ่าตัด อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อหัวใจที่ได้รับการเสียหายยังคงไม่ได้รับการฟื้นฟู ในขณะเดียวกันเทคโนโลยีทางด้าน เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ซึ่งเป็นหนึ่งแนวความคิดของศาสตร์ทางด้าน regenerative medicine (1) ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติที่พิเศษกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ความสามารถในการแบ่งตัวเองออกมาได้อย่างต่อเนื่อง (self renewal) และมีความสามารถในการเจริญเติบโตกลายเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ (pluripotency) จากคุณสมบัติพิเศษเหล่านี้ ทำให้ตระหนักถึงคุณประโยชน์ของเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia), โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia), โรคเบาหวาน ที่มีความบกพร่องในการสร้างฮอร์โมน insulin รวมถึงโรคที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด อย่างเช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Ischemic heart disease), โรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) และโรคกล้ามเนื้อหัวใจเสียจากหลอดเลือดตีบตัน (coronary heart disease) เป็นต้น

ชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้นิยมนำมาศึกษาสามารถแบ่งตามที่มาของเซลล์ ได้เป็น 2 ชนิดหลักคือ embryonic stem cells (ES) และ adult stem cells เนื่องจากการศึกษาใน ES มีข้อจำกัดจากปัญหาทางด้านจริยธรรม ทำให้การศึกษาใน adult stem cell ได้รับความนิยมมากขึ้น อย่างไรก็ดีเชื่อกันว่า adult stem cell มีข้อจำกัดกล่าวคือความสามารถในการเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะจำเพาะนั้นน้อยกว่า (multipotency) เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จาก embryo แต่เนื่องจากการได้มาซึ่ง adult stem cell นั้นสามารถทำได้หลายวิธีและมีหลายชนิดด้วยกัน ทำให้มีการศึกษาวิจัยใน adult stem cell มากขึ้น ปกติแล้ว adult stem cell จะอยู่ตามบริเวณอวัยวะต่าง ๆ เพื่อคงสภาพและซ่อมแซมเมื่อมีการบาดเจ็บเกิดขึ้นต่ออวัยวะนั้น นอกจากนี้ adult stem cell ชนิดที่ให้กำเนิดเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) นั้นสามารถแยกได้จากเลือดหรือไขกระดูก และในไขกระดูกเองยังมี adult stem cell อีกชนิดหนึ่งคือ mesenchymal stem cell (MSC, bone marrow stem cell) ซึ่งได้รับความสนใจในวงกว้างในความสามารถที่จะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์เป้าหมายไม่ว่าจะเป็นเซลล์กระดูก (2, 3) เซลล์กระดูกอ่อน (3,4) เซลล์ไขมัน (3,5) และอื่น ๆ (3)

แนวโน้มการรักษาโดยใช้เซลล์ (cell therapy) กลายเป็นที่สนใจและศึกษากันอย่างแพร่หลาย ชนิดของเซลล์ที่พบว่าสามารถนำมาฟื้นฟูศักยภาพของกล้ามเนื้อหัวใจได้แก่ Cardiac stem cells (6) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในหัวใจโดยจะทำหน้าที่ในการซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจเมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น หรือเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocyte) (7) ซึ่งปกติเชื่อว่าเป็นเซลล์ที่จะไม่เจริญเติบโตอีกแล้วแต่ปัจจุบันแนวคิดนี้กำลังจะเปลี่ยนไป โด ยได้ให้ความสนใจต่อแนวทางในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจให้สามารถเพิ่มจำนวนได้

เมื่อได้รับสารกระตุ้นบางอย่างเพื่อมาทำหน้าที่แทนเซลล์ที่สูญเสียหน้าที่ไป ส่วนเซลล์ชนิดสุดท้ายที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากคือ เซลล์ต้นกำเนิด ทั้งจาก embryonic stem cell (8, 9) และ adult stem cell (6, 10) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง adult stem cells ที่ได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลายคือ mesenchymal stem cells (MSCs) จากไขกระดูก โดยมีผู้วิจัยหลายคณะให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง mesenchymal stem cell เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ไม่ว่าเป็นการศึกษาจาก *in vivo* (11, 12) และใน *in vitro* เช่นในงานของ Xu W. และคณะ (10) ได้ทำการเพาะเลี้ยง MSCs จากไขกระดูกของหนู และใส่สาร 5-azacytidine หลังจากนั้นทำการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่า MSCs สามารถแสดงคุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทั้งทางด้านรูปร่างและการแสดงออกของ gene อย่างไรก็ดี การศึกษาการพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจยังคงมีค่อนข้างน้อยรวมทั้งส่วนใหญ่เป็นการทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่อาจจะมีความแตกต่างจากมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาความสามารถของ MSCs จากไขกระดูกมนุษย์ในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

2.วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.ศึกษาความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์จากไขกระดูกในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

3.วิธีดำเนินการวิจัย แผนการดำเนินการและกิจกรรมวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์จากไขกระดูกจนได้ประมาณ passage ที่ 3-5 ทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ โดย Cell surface marker และ differentiation assay นำมาลงการทดลองภายใต้สารกระตุ้นที่เหมาะสมคือ5-azacytidine ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทั้งทางด้าน morphology, immunofluorescent, การแสดงออก gene (RT-PCR)

4.แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

การดำเนินการ	เดือน					
	1 - 4	5-8	9-12	13-16	17 -20	21-24
ทำการเพาะเลี้ยง mesenchymal stem cell	→					
ทำการทดสอบผลของสารกระตุ้นต่อ mesenchymal stem เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจรวมทั้งทำการทดลองซ้ำ	→	→	→	→		
นำผลการทดลองมาทดสอบด้วยเทคนิคทาง Reverse transcriptase and Real			→	→	→	

time PCR รวมถึง immunofluorescent สำหรับ cardiac muscle marker						
วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง						→

5. งบประมาณโครงการ

เป็นเวลาประมาณ 24 เดือน

ปีที่	หมวดค่าตอบแทน - ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	หมวดค่าวัสดุ - สารเคมีและอุปกรณ์	หมวดค่าใช้สอย - ค่าถ่ายเอกสารและอื่น ๆ	รวมงบประมาณโครงการ
1	120,000	110,000	7,000	237,000
2	120,000	110,000	7,000	237,000
รวมทั้งสิ้น	240,000	220,000	14,000	474,000

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์ (Mesenchymal stem cells, MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายเนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์เอง มีการค้นพบ MSCs เป็นครั้งแรกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูกด้วย Friedenstein AJ และคณะ (11) MSCs จากไขกระดูกมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะเหมือนเซลล์ตั้งต้น (self renew) และสามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะจำเพาะได้หลายชนิด (multipotent differentiation) พบว่ามีการนำ MSCs จากไขกระดูกไปศึกษาทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก (3, 12) โดยเชื่อว่า MSCs จากไขกระดูกสามารถในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ได้ในอนาคต เช่น การทำ tissue engineering และ regenerative medicine (13, 14) หัวใจ (Heart) เป็นอวัยวะที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยงหัวใจ และกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) ที่สามารถหดตัวเป็นจังหวะเพื่อทำหน้าที่ในการบีบรัดตัวไล่เลือดออกจากห้องหัวใจผ่านหลอดเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย ปัจจุบันวิถีชีวิตที่เปลี่ยนไปปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ความอ้วน ความเครียด ฯลฯ มีผลทำให้ผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก โรค acute myocardial infarction เป็นโรคที่ เกิดความผิดปกติต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและหน้าที่ของหัวใจ สามารถพบได้บ่อยและนำไปสู่การสูญเสียชีวิตได้สูงมาก เนื่องจากสามารถพัฒนาให้เกิดภาวะหัวใจวายได้ง่าย (15) แนวทางในการรักษามีหลากหลายวิธี แต่ ณ ปัจจุบันต้องยอมรับว่าการรักษาโดยการใช้เซลล์กำลังได้รับความสนใจอย่างสูง (cell therapy) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ต้นกำเนิด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลัก ๆ คือ cardiac stem cells (CSCs) และ non-cardiac stem cell CSCs คือเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ในหัวใจโดยจะทำหน้าที่สร้างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพื่อทดแทนเซลล์ที่สึกหรอไป ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยหลายคณะให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง mesenchymal stem cell เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ไม่ว่าเป็นการศึกษาจาก *in vivo* (10, 16, 17) และใน *in vitro* เช่นในงานของ Xu W. และคณะ (18) ได้ทำการเพาะเลี้ยง MSCs จากไขกระดูกของหนู และใส่สาร 5-azacytidine หลังจากนั้นทำการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่า MSCs สามารถแสดงคุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทั้งทางด้านรูปร่างและการแสดงออกของ gene อย่างไรก็ดีการศึกษาการพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจยังคงมีค่อนข้างน้อยรวมทั้งส่วนใหญ่เป็นการทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่อาจจะมีความแตกต่างจากมนุษย์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทำการศึกษาความสามารถของ MSCs จากไขกระดูกในการพัฒนาไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มี คุณลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

3. วิธีวิจัย

1. การทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

การวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาทางด้านจริยธรรมโดย SIRD SUBMISSION FORM from Siriraj Institution Review Board ตัวอย่างไขกระดูกได้จากการทำ bone marrow aspiration จากผู้บริจาคเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ผสมกับสารกันเลือดแข็งชนิด 5,000 i.u of of sodium heparin ในอัตราส่วน 30 unit ต่อเลือด 1 มล. จากนั้นเจือจางด้วย phosphate buffer saline ในอัตราส่วน 1:1 และนำมาทำการแยก mononuclear cells โดยการปั่นแยกด้วยน้ำยา ficoll-hypaque ที่ความแรง 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกเซลล์จากชั้นของ interphase และนำไปปั่นล้างเป็นจำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้งหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5-7 วัน และเลี้ยงเซลล์ที่ยังคงเกาะพื้นผิวที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°c ต่อเพื่อเพิ่มจำนวนและนำเซลล์จาก passage ที่ 3 -5 มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

2. MSCs characterization

MSCs ที่จะนำมาใช้ศึกษาต้องผ่านการทดสอบคุณลักษณะความเป็น MSCs ดังต่อไปนี้

2.1 MSC surface marker: ทำการตรวจสอบ cell surface markers ของ MSCs ด้วยแอนติบอดีที่ติดสลากด้วยสารเรืองแสงดังต่อไปนี้ CD34-PE (BD Pharmingen), CD45-FITC (BD Pharmingen), CD73-PE (BD Pharmingen), CD90-FITC (AbD SeroTec), CD105-FITC (AbD SeroTec) และCD106-PE, (AbD SeroTec) MSCs ในช่วง passage ที่ 2-5 ถูกทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.5% trypsin-EDTA นำเซลล์ MSCs จำนวน 5x 10^5 เซลล์มาย้อมด้วย antibody โดยทำการเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นจำนวน 2 ครั้งก่อนทำการตรึงเซลล์ด้วย 1% paraformaldehyde ปริมาตร 300 µl แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง FACS Calibur (Becton Dickinson) และวิเคราะห์ด้วย Cell Quest Software.

2.2 Osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs : MSCs จาก passage ที่ 2-5 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาจำเพาะสำหรับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน ได้แก่ OsteoDiff Medium (AdvanceSTEM osteogenic differentiation Medium; HyClone และ AdipoDiff medium (Advance STEM Adipogenic differentiation medium; HyClone) ตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MSCs ในจำนวน 1x10^5 เซลล์/มล. และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันด้วยเทคนิค cytochemistry โดยการย้อม alkaline phosphatase และ oil red O (Sigma-Aldrich).

3. *In vitro* treatment with 5'-azacytidine

นำเซลล์ MSCs passage ที่ 3-5 มาทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงใน complete medium ที่มี 5'Azacytidine (Sigma) ความเข้มข้น 10 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเปลี่ยนเป็นเลี้ยงใน complete

medium เพียงอย่างเดียวและทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 อาทิตย์ และระหว่างการทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและการเจริญเติบโตของเซลล์.

4. RNA preparation and Real-time PCR

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 3 สัปดาห์ทำการสกัด RNA จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ทุก 1 สัปดาห์ ด้วยน้ำยา Trizol reagent (Invitrogen) นำ RNA ปริมาณ 2 ไมโครกรัมไปทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยน้ำยา first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาทำการเพิ่มจำนวน gene ที่สนใจ และ วัดปริมาณโดยวิธี Real-time PCR โดยใช้เครื่อง ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystem) จำนวน 40 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นตอนการ annealing ใช้อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 วินาทีและ ขั้นตอนการ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 40 วินาที แต่ละปฏิกิริยาใช้ primer ดังตารางข้างล่าง หลังจากนั้นข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบสัมพันธ์กับ GAPDH ของตัวอย่างนั้น ๆ ก่อนนำไปเทียบกับกลุ่มควบคุม.

Gene	Primer	Nucleotides	Product size
α-cardiac actin	FW	5'-TCTATGAGGGCTACGCTTTG -3'	260 bps
	RW	5'-GCCAATAGTGATGACTTGGC -3'	
Troponin T	FW	5'- AGAGCGGAAAAGTGGGAAGA-3'	225 bps
	RW	5'-CTGGTTATCGTTGATCCTGT-3'	
GAPDH	FW	5'-GTCAACGGATTTGGTCGTATTG-3'	139 bps
	RW	5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'	

5. Immunofluorescent staining

นำ MSCs ในช่วง passage ที่ 3-5 มาทำการเพาะเลี้ยงใน 4 wells chamber slide (LabTek, Nunc) โดยใส่เซลล์จำนวน $1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม และทำการเพาะเลี้ยงใน complete medium ที่ผสมกับ 5'-azacytidine ความเข้มข้น 5, 10, 15 μM ตามลำดับ และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนเปลี่ยนเป็น complete medium ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 7 วัน ตัวอย่างในวันที่ 3 ถูกนำมาทำการติดฉลากเรืองแสงด้วยเทคนิค immunofluorescece มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วย PBS ก่อนนำไปตรึงด้วย 4% paraformaldehyde in PBS ในที่เย็น 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำขั้นตอน non-specific binding blocking ด้วยการเติมน้ำยา 4% BSA ตามด้วยการเติม primary antibody คือ goat polyclonal Troponin-T primary antibody (Santacruz biotechnology,Inc.) และ mouse monoclonal GATA4 primary antibody (Santacruz biotechnology,Inc.) จากนั้นล้างเซลล์เป็นจำนวน 2 ครั้งด้วย PBS แล้วจึงเติม secondary antibody คือ rabbit anti-mouse FITC-conjugated secondary antibody (Millipore) และ donkey anti-goat PE- conjugated secondary antibody (Santacruz biotechnology, Inc.) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ

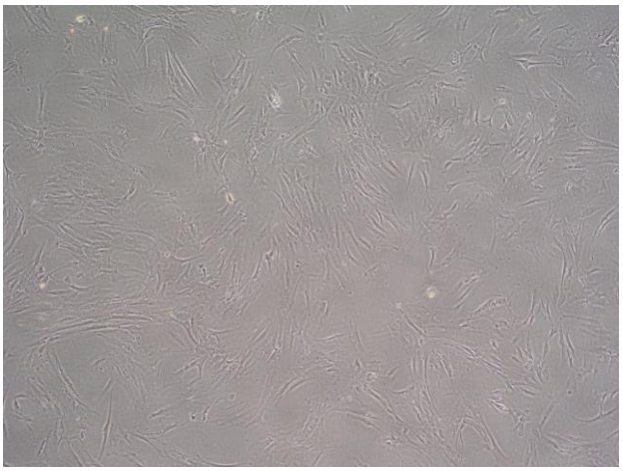
4°C เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำมาล้างด้วย PBS และย้อมด้วยน้ำยา DAPI จากนั้นหยด ProLong Gold Antifade (Invitrogen) เพื่อทำการ mounting และจึงนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง Fluorescent microscope (Olympus).

4. ผลการวิจัย

4.1 MSC culture and characterization

4.1.1 MSC culture แยกเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme และทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์มีความเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้ ระยะแรกของการเพาะเลี้ยงจะยังคงมีการปนเปื้อนของ non-adherent cells เป็นจำนวนมากแต่หลังจากทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ตามเวลา ทำให้ได้ กลุ่ม adherent cells จำนวนมากขึ้นซึ่งมีลักษณะ spindle shape และเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะเช่นเดียวกัน (รูปที่ 1A) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเซลล์จะมีจำนวนขึ้นในประมาณ วันที่ 7-10 (รูปที่ 1B) ขึ้นกับจำนวนของเซลล์เริ่มต้น จนสามารถทำการ subpassage เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยงให้เซลล์อยู่ในช่วง passage ที่ 2-5 ซึ่งจะเหมาะสมกับการทดสอบคุณลักษณะของ mesenchymal stem cell ในขณะเดียวกันจะได้จำนวนเซลล์ที่มากเพียงพอสำหรับทำการทดลองต่อไป

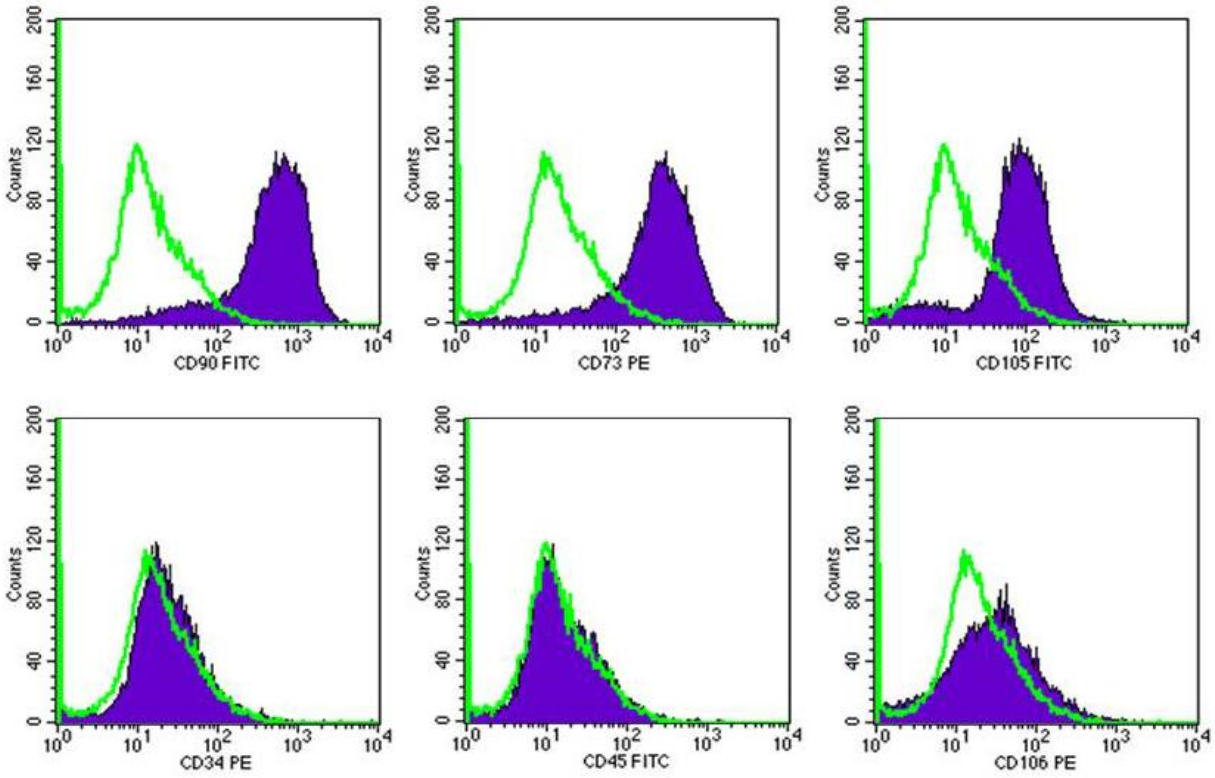
รูปที่ 1 A แสดงลักษณะของ mesenchymal stem cells จากการเพาะเลี้ยงในระยะแรก เซลล์ยังคงมีจำนวนค่อนข้างน้อย และมีลักษณะ spindle shape



รูปที่ 1B แสดงลักษณะของ mesenchymal stem cells หลังจากการเพาะเลี้ยงประมาณ 7-10 วันเซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากรูปเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 60%

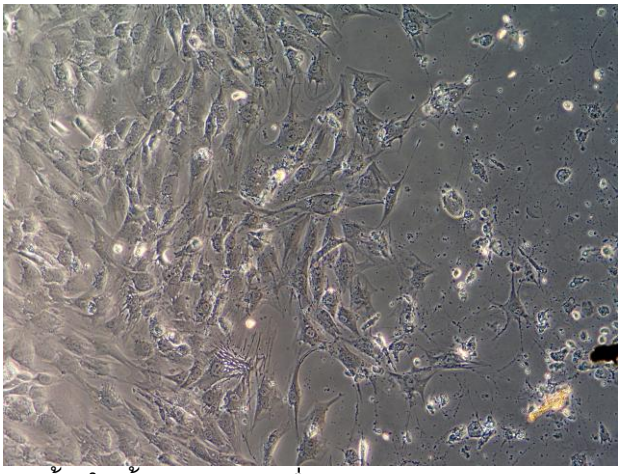
4.1.2 MSC characterization

- Cell surface marker ทำการศึกษาคุณลักษณะของ immunophenotype ของ mesenchymal stem cells โดยใช้ CD105, CD 106, CD90, CD 34, CD 146 พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ (80-90%) ให้ผลบวกต่อ CD 105, CD 90, CD 146 และให้ผลลบต่อ CD 34, CD 106 (รูปที่ 2)

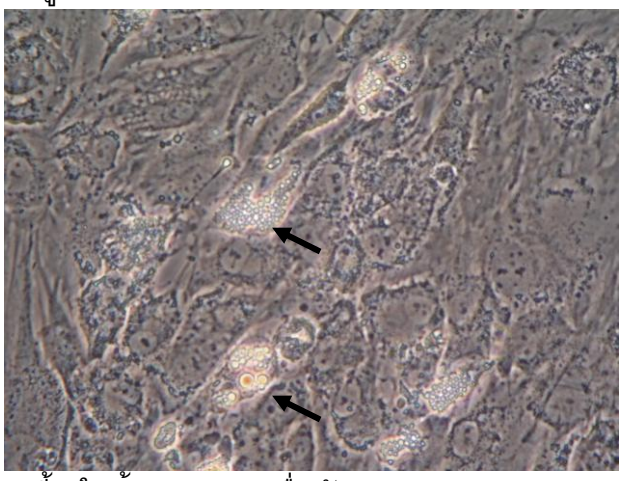


รูปที่ 2 ผล cell surface marker ของ MSCs ให้ผลบวกต่อ CD 105, CD 90, CD 146 และให้ผลลบต่อ CD 34, CD 45

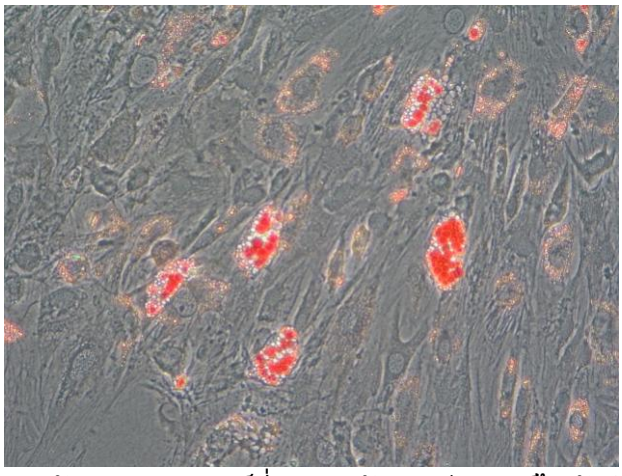
- Osteogenic and adipogenic differentiation ทำการศึกษาคุณลักษณะของ mesenchymal stem cell ด้านความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันพบว่าเซลล์สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกได้ในระยะเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 14 วันได้นำเซลล์มาศึกษาโดยวิธี oil red O staining เพื่อทดสอบความเป็นเซลล์ไขมัน และ วิธี Alkaline phosphatase staining เพื่อทดสอบความเป็นเซลล์กระดูกพบว่าเซลล์ให้ผลการทดลองเป็นบวก (รูปที่ 3, 4)



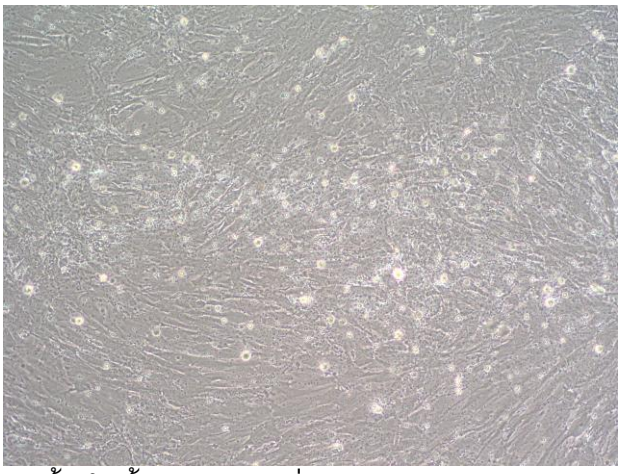
รูปที่ 3 A หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาจำเพาะเพื่อพัฒนา mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ไขมันประมาณ 2-4 วันเซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น polygonal shape



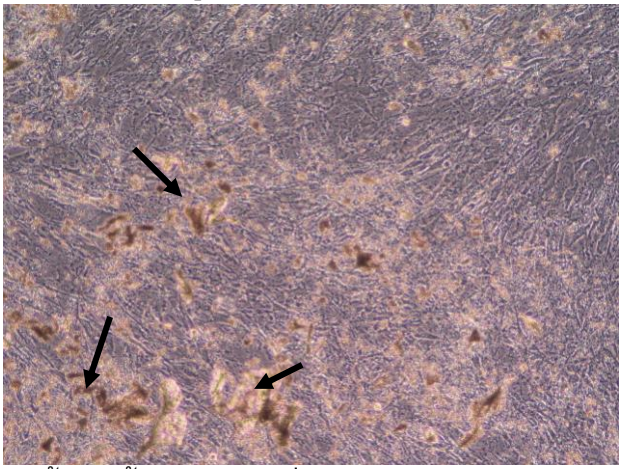
รูปที่ 3 B หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาจำเพาะเพื่อพัฒนา mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ไขมันเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์จะเริ่มมีการสร้างไขมันภายใน cytoplasm (arrow)



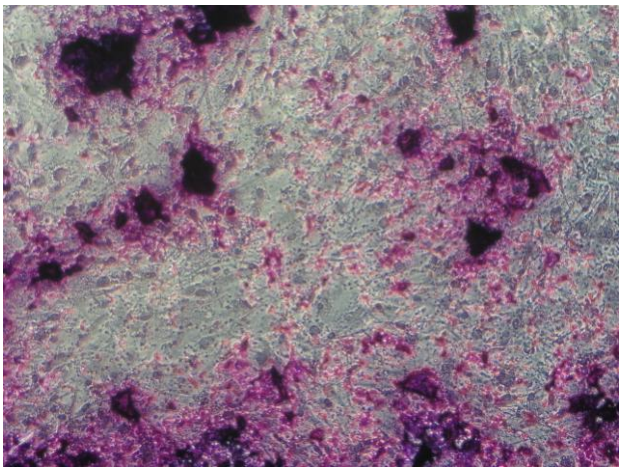
รูปที่ 3 C เมื่อทำการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ที่ทำการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันด้วยเทคนิค Oil red O staining พบเซลล์ย้อมติดสีส้มแดงจาก fat ใน cytoplasm



รูปที่ 4 A หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาจำเพาะเพื่อพัฒนา mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์กระดูก ประมาณ 2-4 วัน เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีการหลั่ง substance ในจานเพาะเลี้ยง



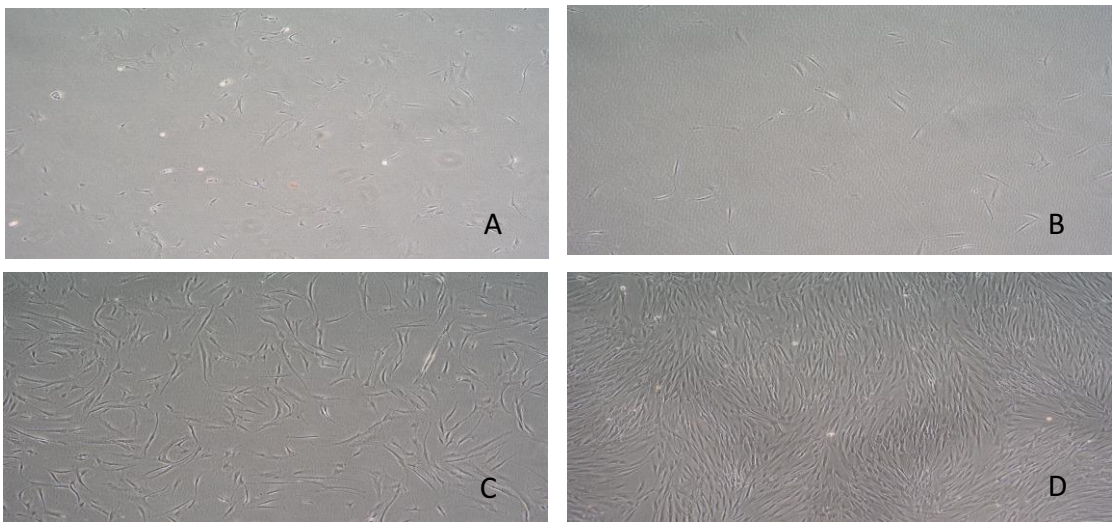
รูปที่ 4 B หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาจำเพาะเพื่อพัฒนา mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ กระดูก ประมาณ 2 สัปดาห์ เซลล์จะมีการหลั่ง substance ในจานเพาะเลี้ยงมากขึ้น (arrow)



รูปที่ 4 C เมื่อทดสอบคุณลักษณะของเซลล์กระดูกด้วย alkaline phosphatase staining พบว่าให้ผลเป็นบวก

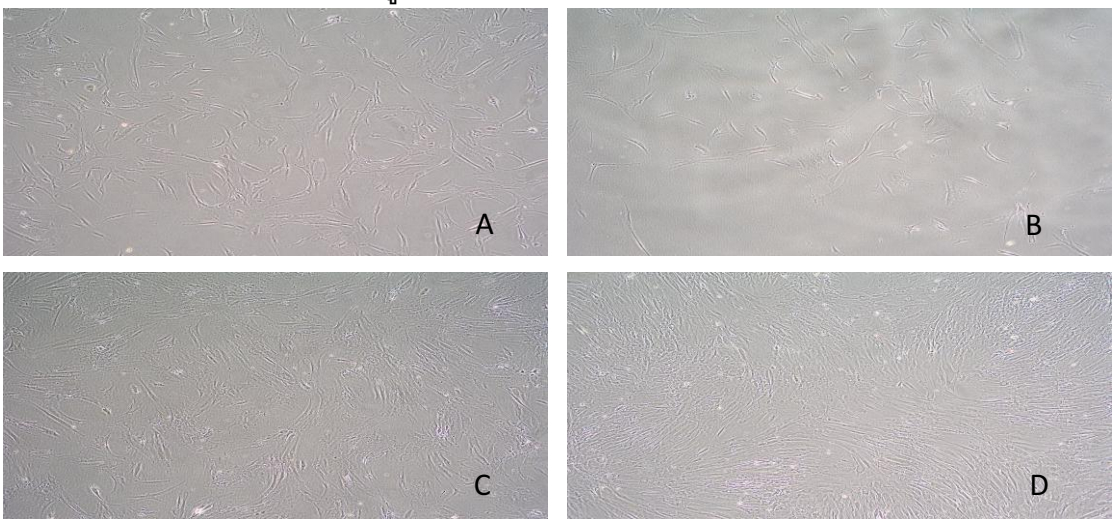
4.2 นำเซลล์จากไขกระดูกที่ประมาณ passage ที่ 3-5 มาทำการเพาะเลี้ยงด้วย

1) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จนได้จำนวนที่เพียงพอ ทำการนับเซลล์และใส่ลงไปในภาชนะเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกันตั้งแต่ $1x10^4$, $1x10^5$, $5x10^5$ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจะทำเป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ถึง 1 เดือนเพื่อค้นหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงด้วยสาร ต่อจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สาร 5-Azacytidine ที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็น DMEM ผสม Fetal Bovine Serum 10% เหมือนกับ control (seeding density $1x10^4$) จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างพบว่าเซลล์เริ่มต้นที่ $1x10^4$ จะให้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมโดยไม่ทำให้เซลล์หนาแน่นมากกเกินไปเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน พบว่าเมื่อวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น $1x10^4$ ทั้งเซลล์ที่ใส่ 10 μM 5-azacytidine และ control ให้ผลคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 5 A, B)



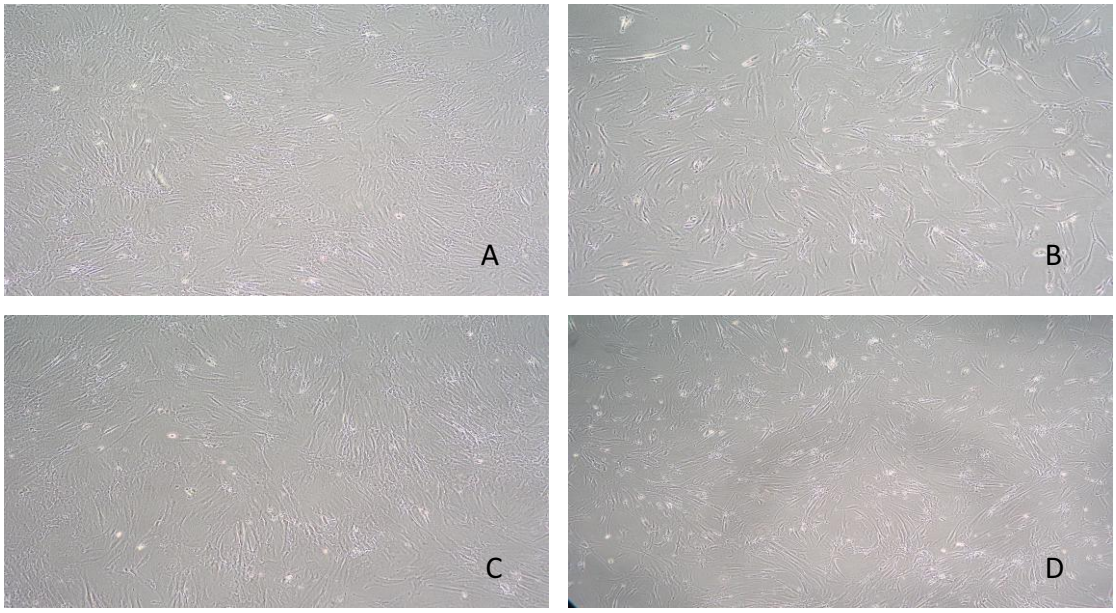
รูปที่ 5 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน A, control; B-D เป็น mesenchymal stem cell ที่ได้รับการใส่สาร 10μM 5-Azacytidine ที่มี seeding density ที่แตกต่างกันตั้งแต่ $1x10^4$, $5x10^4$, $1x10^5$ ตามลำดับ

แต่เมื่อเลี้ยงไปจนถึงวันที่ 6 จะพบว่าความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในกลุ่ม control ($1x10^4$) (รูปที่ 6 A) จะมีปริมาณเซลล์มากกว่าในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยสาร 5-Azacytidine ที่มี seeding density เท่ากัน ($1x10^4$) (รูปที่ 6 B) แต่จะมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยสาร 5-Azacytidine ที่มี seeding density เท่ากับ $5x10^4$ (รูปที่ 6 C)



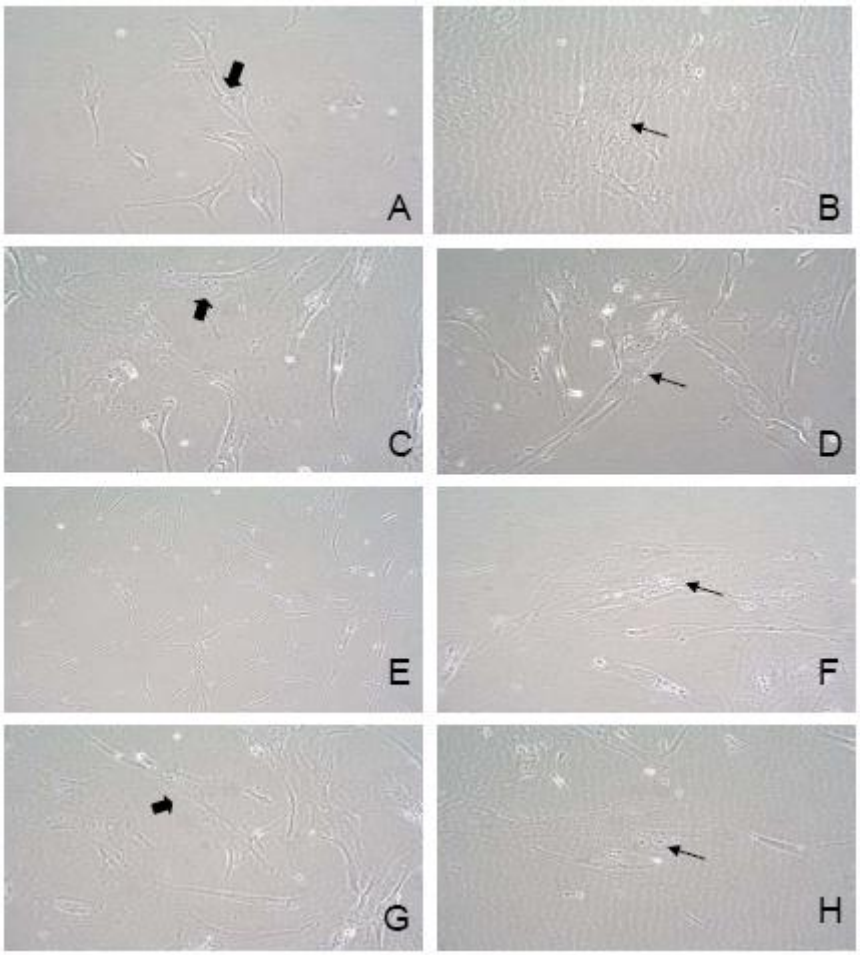
รูปที่ 6 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน A, control; B-D เป็น mesenchymal stem cell ที่ได้รับการใส่สาร 10μM 5-Azacytidine ที่มี seeding density ที่แตกต่างกันตั้งแต่ $1x10^4$, $5x10^4$, $1x10^5$ ตามลำดับ

และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงและสังเกตในสัปดาห์ที่ 2 จะพบว่าใน control เซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยงที่ประมาณวันที่ 13 ขณะที่ เซลล์ที่ความเข้มข้น $1x10^4$ ที่เพาะเลี้ยงด้วยสาร 10 μM 5-Azacytidine จะเจริญเติบโตจนเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยงที่ประมาณวันที่ 15



รูปที่ 7 A, C คือ control หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13, 15 วันตามลำดับ. B, D เป็น mesenchymal stem cell ที่ได้รับการใส่สาร 10 μM 5-Azacytidine ที่มี seeding density $1x10^4$หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13, 15 วันตามลำดับ

และเมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างของเซลล์ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสาร 10 μM 5-Azacytidine พบว่าเริ่มมีความแตกต่างตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากการได้รับสารโดยเซลล์ในกลุ่มควบคุมจะมีลักษณะเป็น fibroblast like (รูปที่ 8 A) แต่กลุ่มที่ใส่สารจะมีขนาดแผ่ออกกว้างและมีเม็ดแกรนูลภายใน cytoplasm เด่นชัด (รูปที่ 8 B) ความแตกต่างนี้จะชัดเจนขึ้นในวันที่ 6 (รูปที่ 8 C-D) วันที่ 7 (รูปที่ 8 E-F) และ วันที่ 8 (รูปที่ 8 G-H) และจะค่อยๆ หายไปในสัปดาห์ที่ 2

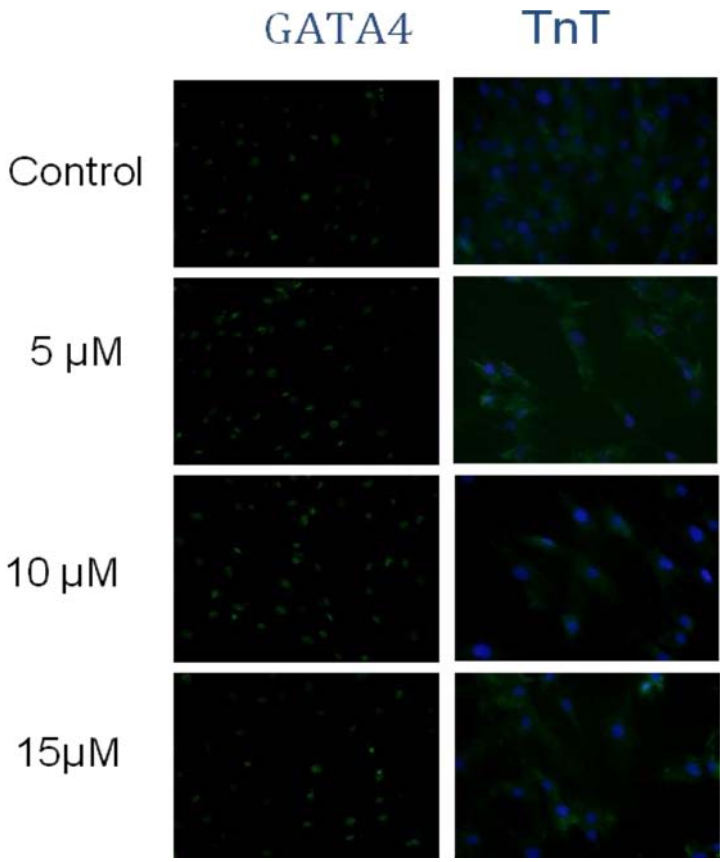


รูปที่ 8 ศึกษาความแตกต่างทางด้านรูปร่าง ของเซลล์ระหว่าง control (A, C, E, G) กับ เซลล์ที่ได้รับสาร 5-Azacytidine (B, D, F, H) ที่วันที่ 2, 6, 7, 8 ตามลำดับ ลูกศรหนาแสดงถึง mesenchymal stem cell ในกลุ่ม control ที่มีรูปร่างเหมือน fibroblast ขณะที่เซลล์ที่ได้รับสาร 5-Azacytidine (ลูกศรบาง) จะมีรูปร่างค่อนข้างยาวและแผ่ออกด้านข้างรวมทั้งมีแกรนูลเป็นจำนวนอยู่บริเวณรอบนิวเคลียส

และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของสาร 5-azacytidine ที่ 5, 10, 15 μM ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของ mesenchymal stem cells ไปเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะคล้ายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ 5-azacytidine ไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของรูปร่างของเซลล์

4.3 .Immunofluorescent staining

เซลล์ MSCs จาก passage ที่ 3 นำมาเลี้ยงใน 5-Azacytidine ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM เป็นเวลา 24 ชม และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาติดฉลากด้วยแอนติบอดี้สำหรับ GATA4 และ Troponin T และติดสารเรืองแสงสีเขียว เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้อง immunofluorescent พบว่าเซลล์ที่ใส่ 5-Azacytidine จะให้ความเข้มของสารเรืองแสง มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 15 μM (รูปที่ 9)

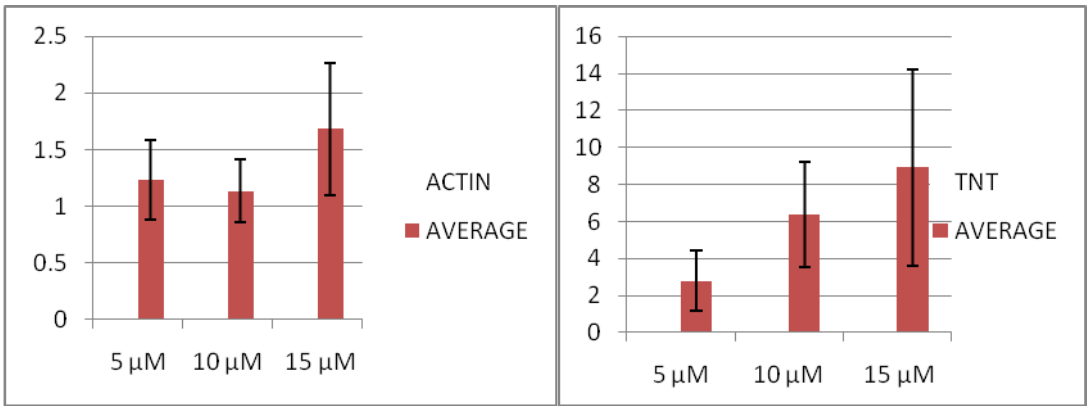


รูปที่ 9 เซลล์ MSCs จาก passage ที่ 3 นำมาเลี้ยงใน 5-Azacytidine ความเข้มข้น 5, 10, 15 μM และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน นำมาติดฉลากด้วยแอนติบอดี้สำหรับ GATA4 และ Troponin T และติดสารเรืองแสงสีเขียว เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้อง immunofluorescent พบว่าเซลล์ที่ใส่สาร 5-Azacytidine จะให้ความเข้มของสารเรืองแสง มากกว่ากลุ่มควบคุม

4.4 Real time PCR

เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA สำหรับ cardiomyocyte α-actin และ troponin T ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะสำหรับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยวิธี Realtime PCR และทำการเปรียบการแสดงออกของยีนดังกล่าวใน MSCs จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยา 5-Azacytidine ความเข้มข้น 5, 10, 15 μM หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่ามีการแสดงออกของ cardiomyocyte α-actin และ

troponin T ในกลุ่มที่ได้รับยามากกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 10) และกลุ่มที่ได้รับยาขนาด 15 μM ให้ค่า การแสดงออกสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาขนาด 5 และ10 μM



รูปที่ 10 การแสดงออกของ mRNA สำหรับ cardiomyocyte α-actin และ troponin T ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะสำหรับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยวิธี Realtime PCR และทำการเปรียบการแสดงออกของยีนดังกล่าวใน MSCs 5' azacytidine พบว่ามีการแสดงออกของ cardiomyocyte α-actin, troponin T (TnT) ในกลุ่มที่ได้รับยามากกว่า โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับยาขนาด 15 μM

วิจารณ์และสรุป

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ (MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณลักษณะ Multipotent เนื่องจากมีคุณลักษณะของ self renewal และยังสามารถเจริญพัฒนา (differentiation) เป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะจำเพาะได้หลายชนิด เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูก (BMMSCs) โดยเชื่อว่าน่าจะเป็นเซลล์ที่มีประโยชน์มากสามารถนำมาใช้ในการรักษาและยังสามารถเป็น autologous donor ได้ BMMSCs สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะจำเพาะได้หลายชนิดได้แก่ เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน (19) และเซลล์กล้ามเนื้อ (20) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถของ BMMSCs ในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะเหมือนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยใช้สารกระตุ้นคือ 5-azacytidine

5-azacytidine เป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์โดยพบว่ามีคุณสมบัติที่เป็น cytotoxic ต่อเซลล์มะเร็ง โดยยานี้มีคุณสมบัติคือเป็น hypomethylating agent ในปัจจุบันเชื่อว่าการเกิด DNA methylation เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์ โดย 5-azacytidine สามารถยั้งยั้งการเกิด methylation โดยจับกับ DNA-methyltransferase 1 enzyme และทำให้เกิด hypomethylation ของ DNA โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว ยานี้ได้ถูกนำมาทำการศึกษาเพื่อกระต้นการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดโดยกลไกดังกล่าว โดยส่วนใหญ่จะทำการกระตุ้นในช่วงเวลาสั้นได้แก่ 24-48 ชม. (21, 22)

ในการศึกษาครั้งนี้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์จากไขกระดูกได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงภายใต้ 5-azacytidine เป็นเวลา 24 ชม.และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียานี้เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ ทำการศึกษาคุณลักษณะของการเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 ตามลำดับ โดยเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์จะพบความแตกต่างในช่วงสัปดาห์ที่ 1 กล่าวคือ เซลล์ที่ได้รับยาจะมีการสร้าง granule ใน cytoplasm มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการศึกษาในช่วงเวลาต่อไป

จะไม่พบความแตกต่างและไม่มีความแตกต่างทางด้านรูปร่างของเซลล์เมื่อได้รับขนาดยาที่แตกต่างกัน จากนั้นได้ทำการศึกษาความสามารถในการแสดงออกของ gene ที่เป็น marker ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ได้แก่ α-cardiac actin และ troponin T พบว่าระดับของ การแสดงออกของgene ดังกล่าวจะสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์แรกและจะลดลงในช่วงสัปดาห์ถัดไปและขนาดยาที่ทำให้การแสดงออกสูงที่สุดคือ 15μM5-azacytidine ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทำ Immunofluorescent สำหรับ GATA4 และ troponin T

ผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า 5-azacytidine มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของ BMMSCs เป็นเซลล์ที่มีคุณลักณณะเหมือนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยกลไกยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดจากคุณสมบัติของยา hypomethylating agent อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่า BMMSCs ก็สามารถที่จะแสดงออกคุณลักษณะเหล่านี้อยู่แล้วโดยอาจมีการแสดงออกที่น้อยกว่าเมื่อถูกกระตุ้น จึงสรุปได้ว่าการกระตุ้นเซลล์โดยใช้ 5-azacytidine เป็นเพียงการส่งเสริมเท่านั้น และเนื่องจากการทำการทดลองครั้งนี้ทำการวัดปริมาณเปรียบเทียบเพี่ยง RNA เท่านั้นการทีจะบ่งบอกว่าเซลล์ต้นกำเนิดนั้นเจริญพัฒนาเป็นเซลล์หัวใจนั้นยังคงต้องการการเปรียบเทียบในระดับโปรตีนรวมทั้ง functional activity ซึ่งไม่ได้รวมอยู่ในการศึกษาครั้งนี้และยังคงต้องการการศึกษาต่อไป ขณะเดียวการใช้ยา 5-azacytidine ในการกระตุ้นอาจยังไม่ใช่สารที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากคุณสมบัติยาที่ออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะดังนั้นการค้นคว้าสารกระตุ้นชนิดอื่นที่เหมาะสมกว่าจัดได้ว่าเป็นความจำเป็น อย่างไรก็ตามประโยชน์ที่ได้รับของการศึกษาครั้งนี้พบว่า BMMSCs น่าจะเป็นตัวเลือกของเซลล์ต้นกำเนิดที่เหมาะสมในการนำไปใช้เพื่อรักษา Myocardial infarction โดยผู้ที่ต้องการรับการปลูกถ่ายเซลล์สามารถทำการคัดแยกเซลล์ของตัวเองแล้วทำการเพาะเลี้ยงคัดแยกเซลล์ดังกล่าวก่อนนำมาปลูกถ่าย โดยการที่กระตุ้นเซลล์ในหลอดทดลองให้มีคุณลักษณะเหมือนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจัดได้ว่าเป็นสิ่งจำเป็นเพราะเมื่อปลูกถ่ายเซลล์แล้วจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการ engraftment มากกว่าการใช้เซลล์ที่แยกมาเลย (23)

References

1. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 179–184.

2. Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 1997; 64: 295-312.

3. Pittenger MF, Mackay A, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.

4. Johnstone B, Hering T, Caplan AI, Goldberg VM, Ju Y. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1998; 238: 265-272.

5. Bianco P, Costantini. M, Dearden LC, Bonucci E. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. Br J Haematol 1988; 68: 401-403.

6. Beltrami, A.P. et al. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 114, 763–776.
7. Germani A, Rocco GD, Limana F, et al. Molecular mechanisms of cardiomyocyte regeneration and therapeutic outlook. Trends Mol Med 2007; 13: 125-133.
8. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 1525-1539.
9. Capi O, Gepstein L. Myocardial regeneration strategies using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J of control release 2006; 116: 211-218.
10. Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac environment. J Mol Cell Cardiol 2007; 42: 295-303.
11. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplantation 1974; 17: 331-40.
12. Morigi M, Introna,M, Imberti B, et al. Human bone marrow-mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. Stem Cells 2008; 26: 2075–2082.
13. Wu Y J, Chen LW, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem Cells 2007; 25: 2648–2659.
14. Stephen MR, Judith AH, Reza M, et al. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine Opportunities and Challenges for Articular Cartilage and Intervertebral Disc Tissue Engineering. J Cell Physiol 2010; 222: 23–32.
15. Xiaobing Fu, Haihong Li. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. Cell Tissue Res 2009; 335: 317–321.
16. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105:93–98.
17. Rangappa S, Reddy VG, Bongso A, Lee EH, Sim EKW. Transformation of the adult human mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells in vivo. Cardiovasc Eng 2002; 2:7–14.
18. XU W, ZHANG X, QIAN H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. Exp Biol Med 2004; 229:623–631.
19. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem 2006; 98(5): 1076-84.
20. Winitsky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, et al. Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes *in vitro*. PLoS Biol 2005; 3:e87
21. Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. Trends Cell Biol 2010; 20: 609-17.

22. Finelli C, Bosi C, Martinelli G, Baccarani M. Azacytidine: first therapeutic opportunity for myelodysplastic syndromes. haematologica reports 2006; 2:57-59.
23. Haider HKh, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. J Mol Cell Cardiol 2008; 45: 554-66.