นิพนธ์ต้นฉบับ ▪ Original Article

การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากแอมเนียนและคอเรียนของเยื่อหุ้มทารก

ศศิประภา ทองบพิตร, ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์, พุทธชาติ โภคาธิกรณ์, ทัศนีย์ เพิ่มไทย*
หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

Comparative Study of Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Amnion and Chorion of Fetal Membrane

Sasiprapa Thongbopit, Suparat Wichitwiengrat, Puttachart Pokathikorn, Tatsanee Phermthai*
Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10700, Thailand

Received: 10 July 2019
Accepted: 12 May 2020

หลักการและวัตถุประสงค์: เยื่อหุ้มทารก ประกอบด้วยชั้นแอมเนียนและคอเรียนซึ่งเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตาม การศึกษาคุณสมบัติ MSCs ที่ได้จากแอมเนียนและคอเรียนยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการคัดแยกและเปรียบเทียบ MSCs จากแอมเนียน (amniotic MSC; AMSC) และ คอเรียน (chorionic MSC; CMSC)
วิธีการศึกษา: เยื่อหุ้มทารก จำนวน 5 ตัวอย่าง ถูกนำมาแยก AMSC และ CMSC และศึกษาคุณสมบัติ โดยตรวจสอบรูปร่างเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ ระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวน (population doubling time; PDT) และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์อื่น รวมทั้งตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตหลังจากเก็บในสภาวะแช่แข็ง
ผลการศึกษา: AMSC และ CMSC ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติทั่วไปทั้งรูปร่าง การแสดงออกของ CD44, CD73 และ CD105 ไม่พบการแสดงออกของ CD34 บนผิวเซลล์ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับที่คล้ายคลึงกัน AMSC มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า CMSC เล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังจากเก็บรักษาเซลล์ในสภาวะแช่แข็งเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าทั้ง AMSC และ CMSC มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90
สรุป: จากการศึกษานี้พบว่า AMSC และ CMSC มีคุณสมบัติทั่วไปและความสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์อื่นใกล้เคียงกัน ดังนั้นทั้งแอมเนียนและคอเรียน อาจจะเป็นทางเลือกสำหรับการผลิต MSCs เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคได้

คำสำคัญ: เยื่อหุ้มทารก, เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์

Background and Objective: The fetal membranes, amnion and chorion, are the attractive sources of mesenchymal stem cells (MSCs). However, the comparative study between the amnion and chorion-derived MSCs are still unclear. This study aimed to isolate and compare the properties of the amniotic mesenchymal stem cell (AMSC) and chorionic mesenchymal stem cell (CMSC).
Methods: AMSC and CMSC were isolated from the fetal membranes (n=5). The morphologies, population doubling times (PDT), MSC surface markers, and multilineage differentiation potentials of AMSC and CMSC were compared. Moreover, the viability of both MSCs were investigated after cryopreservation.
Results: AMSC and CMSC exhibited similar morphologies. Both expressed CD44, CD73, CD105 but not CD34 on the cell surfaces and could be differentiated into adipogenic, osteogenic, and hepatogenic cells. As for PDT, AMSC proliferated faster than CMSC, but this was not reached statistically significant. After the cryopreservation for 1 month, more than 90% of AMSC and CMSC were viable.
Conclusions: The results of this study demonstrated that AMSC and CMSC had similar characteristics and differentiation potential. Therefore, both amnion and

*Corresponding author : Tatsanee Phermthai, Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10700, Thailand. E-mail: bsuteevun_1@yahoo.com, stemcells_siriraj@yahoo.com

chorion are the alternative sources of MSCs, which might be useful for therapeutic applications.

Keyword: fetal membrane, mesenchymal stem cells, amnion, chorion

ศรีนครินทร์เวชสาร 2563; 35(4): 418-424. ● Srinagarind Med J 2020; 35(4): 418-424.

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells; MSCs) เป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูง มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนโดยคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) และมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายได้หลายชนิดทั้งกลุ่ม mesoderm, ectoderm และ endoderm นอกจากนี้ MSCs ยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) และสามารถปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายโดยไม่เกิด graft versus host disease (GVHD) ดังนั้น MSCs จึงน่าจะสามารถนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ ที่รวมถึงการนำมาใช้ในเวชศาสตร์ชะลอวัยและการฟื้นฟูสุขภาพได้

เป็นที่ทราบกันดีว่าไขกระดูก (bone marrow) เป็นแหล่ง MSCs ที่ได้รับความนิยมและถูกนำมาศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม ในการประยุกต์ใช้ทางคลินิกพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (bone marrow stem cell; BMSC) มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ผู้บริจาคจะได้รับความเจ็บปวดจากกระบวนการเก็บไขกระดูกและต้องอาศัยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ อีกทั้งคุณภาพของ BMSC ที่ได้ขึ้นอยู่กับอายุของผู้บริจาค ซึ่งความสามารถในการเจริญเติบโตของ BMSC จะลดลงในผู้บริจาคที่มีอายุมาก[1] จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหา MSCs จากแหล่งอื่นทดแทน ดังนั้น เยื่อหุ้มทารก (fetal membrane) ซึ่งได้มาหลังจากทารกคลอด จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของ MSCs ที่เก็บได้ง่ายโดยไม่มีปัญหาความขัดแย้งทางจริยธรรม[2,3] รวมถึง MSCs ที่ได้มีคุณสมบัติและศักยภาพดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้รักษาโรคไม่ต่างจาก BMSC[2-7]

Fetal membrane ประกอบด้วยชั้นแอมเนียน (amnion) และคอเรียน (chorion) ซึ่งเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชั้นอยู่ติดกันและมีต้นกำเนิดจากตัวอ่อนระยะแรก โดยแอมเนียนเป็นเยื่อบางด้านในทำหน้าที่ห่อหุ้มป้องกันทารกในครรภ์ที่กำลังพัฒนา โดยมีน้ำคร่ำคั่นระหว่างแอมเนียนและตัวอ่อน แอมเนียนประกอบด้วยเนื้อเยื่อสามชั้น ได้แก่ ชั้นเซลล์เยื่อบุ (epithelial layer) ชั้น basement membrane และชั้น stroma ซึ่งชั้น stroma เป็นแหล่งที่อยู่ของ MSCs[2-4] ส่วนคอเรียนเป็นเยื่อหุ้มชั้นนอกที่ติดกับผนังมดลูก ในช่วงสามเดือนแรก คอเรียนจะเจริญอย่างรวดเร็วและแทรกเข้าไปในผนังเยื่อบุมดลูกของแม่ มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ เรียกว่า chorionic villi ซึ่งจะมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เป็นทางแลกเปลี่ยนสารระหว่างทารกและมารดา สามารถพบ MSCs ได้ ทั้งในเยื่อคอเรียน และ chorionic villi[4,5] เนื่องจากความแตกต่างของการพัฒนาแอมเนียนและคอเรียน จึงเป็นที่น่าสนใจว่า MSCs ที่ได้จาก 2 แหล่งนี้ มีความแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไรก็ดีปัจจุบันยังมีการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของ MSCs ที่ได้จากแอมเนียนและคอเรียนน้อย

การศึกษานี้จึงได้ทำการคัดแยกและเปรียบเทียบคุณสมบัติของ AMSC และ CMSC โดยตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ ได้แก่ เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูก และเซลล์ตับ รวมทั้งศึกษาอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาเซลล์ในสภาวะแช่แข็ง

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเยื่อหุ้มทารก จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้รับบริจาคจากมารดาที่มีสุขภาพดี โดยผู้บริจาคทั้งหมดจะได้รับคำอธิบายรายละเอียดของโครงการวิจัยจากผู้วิจัยโดยละเอียด ก่อนลงนามยินยอมเข้าร่วมวิจัย การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ 533/2554)

การแยกและเพาเลี้ยง AMSC และ CMSC

เยื่อหุ้มทารกจะถูกนำมาแยกชั้นแอมเนียนและคอเรียนออกจากกัน จากนั้นตัวอย่างแอมเนียนหรือ คอเรียนจะถูกล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ จนไม่มีเลือดปน จากนั้นชิ้นเนื้อจะถูกนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แล้วปั่นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) ที่ความเร็ว 2,100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกวางลงบนภาชนะเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ alpha minimum essential medium (α-MEM) 10% fetal bovine serum (FBS) 100 IU/ml penicillin G sodium และ 100 mg/ml streptomycin sulfate และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C รูปร่างของเซลล์จะได้รับการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนใหม่ทุก 3 วัน จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่นร้อยละ 80-90 ของพื้นที่ จึงทำการ subculture ด้วยวิธี trypsinization จากนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์รุ่นถัดไป (passage) จะเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ความหนาแน่น 3,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่ และตรวจสอบค่า population doubling time (PDT) ในทุก passage ที่เพาะเลี้ยง จนกระทั่งได้เซลล์ที่ passage 4-5 จึงนำไปตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ และเก็บรักษาเซลล์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน ก่อนที่จะนำมาละลายและทำการเพาะเลี้ยงอีกครั้ง

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค Flow cytometry

เซลล์ AMSC และ CMSC ที่ passage 4-5 จะถูกตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD34 CD44 CD73 และ CD105 โดยนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS จากนั้นย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนต่างๆ บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นล้างด้วย PBS จากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% para-formaldehyde แล้วจึงนำไปวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่อง FACS Calibur™ (Becton Dickinson, USA) และวิเคราะห์ข้อมูลโดย Cell Quest Software

การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับ

วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับ และอาหารเหนี่ยวที่ใช้ในการศึกษานี้ดำเนินการตามวิธีของ Julavijitphong และ คณะ (2014)[8] โดยเลี้ยงเซลล์ AMSC หรือ CMSC ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร จนกระทั่งได้เซลล์หนาแน่นร้อยละ 50-60 จากนั้นเลี้ยงในอาหารเฉพาะ ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถเหนี่ยวนำ MSCs เป็นเซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูก โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ 5% CO_2 และอุณหภูมิ 37 °C และทำการเปลี่ยนอาหารเฉพาะทุก ๆ 3 วัน จนกระทั่งครบเวลา

อาหารสำหรับเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ไขมัน ประกอบด้วย α-MEM, 10% FBS, 1 mM dexamethasone, 5 mg/mL insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine และ 60 mM indomethacin เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบการสร้างเม็ดไขมัน (lipid droplet) ด้วยการย้อมสี oil red

อาหารเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์กระดูก ประกอบด้วย α-MEM, 10% FBS, 0.1 μM dexamethasone, 10 mM glycerol-2-phosphate disodium salt hydrate และ 50 μM ascorbic acid เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แล้วทำการย้อมสี alkaline phosphatase จากนั้นนำไปสังเกตการติดสีน้ำตาลเข้มภายใน cytoplasm ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหักลับ

สำหรับการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ตับ เลี้ยง AMSC และ CMSC ให้มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70 จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยง serum depletion medium ซึ่งประกอบด้วย Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and 10 ng/mL of basic fibroblast growth factor (bFGF) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยง inducing differentiation medium ซึ่งประกอบด้วย IMDM, 20 ng/mL human hepatocyte growth factor (HGF), 10 ng/mL bFGF และ 0.1% DMSO เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และตรวจสอบการแสดงออกของยีน HNF4α ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยมี β-actin เป็น internal control

การทดสอบทางสถิติ

ในการศึกษานี้ข้อมูลจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) โดยในแต่ละการทดลองทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง

ผลการศึกษา

ผลการคัดแยกเซลล์และเพาะเลี้ยง AMSC และ CMSC

ผลการศึกษา พบว่าสามารถแยก AMSC และ CMSC ด้วยวิธี explant method ได้ประสบผลสำเร็จจากทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยจะเริ่มเห็นกลุ่มเซลล์แยกออกมาจากชิ้นเนื้อประมาณวันที่ 5-7 ของการเพาะเลี้ยง กลุ่มเซลล์ที่ได้มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวคล้ายไฟโบรบลาส (fibroblast-like cell) และมีคุณสมบัติในการยึดเกาะพื้นผิวภาชนะเลี้ยงได้ (รูปที่ 1A, 1B) รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนจนเต็มภาชนะ สำหรับการเพาะเลี้ยง AMSC ในช่วงแรกเริ่ม (primary culture) อาจพบเซลล์กลุ่ม epithelial (รูปที่ 1C) ปะปนในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งจะต้องทำการกำจัดโดยการขูดออกด้วย sterile tip ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยไม่พบเซลล์กลุ่มนี้ปะปนในจานเพาะเลี้ยง CMSC จากนั้นรอจนเซลล์เพิ่มจำนวนจนเต็มภาชนะ พบว่า AMSC ใช้เวลา 11.2±0.84 วัน (อยู่ในช่วงระยะเวลา 10-12 วัน) และ CMSC ใช้เวลา 11.75±0.96 วัน (อยู่ในช่วงระยะเวลา 11-13 วัน) ลักษณะรูปร่างเซลล์ถูกสังเกตตลอดระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงจนถึง passage 5 (รูปที่ 1D, 1E)

จากการศึกษา พบว่า AMSC และ CMSC ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวน (PDT) ในแต่ละ passage ได้ในเวลาใกล้เคียงกัน และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย CMSC ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนมากกว่า AMSC เล็กน้อย มีค่า PDT เฉลี่ย (5 passages) เท่ากับ 2.13±0.22 วัน ในขณะที่ AMSC ใช้เวลา 1.99±0.41 วัน (รูปที่ 2)

การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์

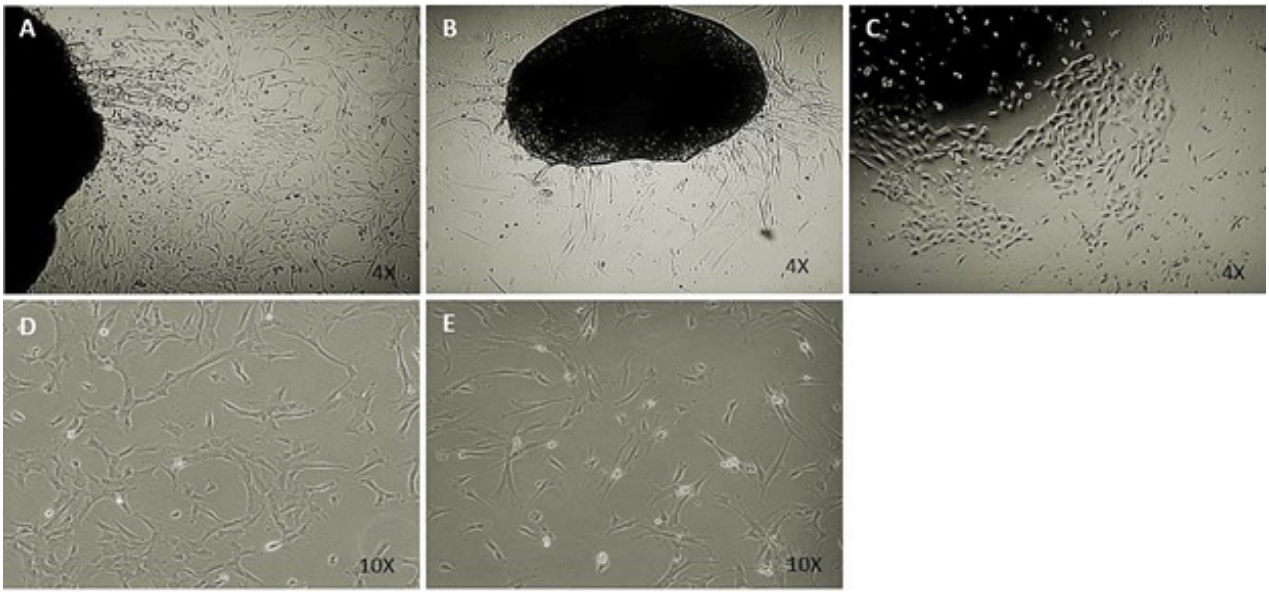
เมื่อนำเซลล์ AMSC และ CMSC passage 4 หรือ 5 มาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่า AMSC มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD44, CD73 และ CD105 คิดเป็นร้อยละ 97.17 ± 2.27, 97.93 ± 2.12 และ 95.77 ± 3.46 ตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของ CD34 ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (ร้อยละ 0.86 ± 0.90) ค่าการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะไม่แตกต่างจาก CMSC ที่มีการแสดงออกของ CD44, CD73 และ CD105 ร้อยละ 99.14 ± 0.38, 98.93 ± 1.19 และ 99.26 ± 0.36 ตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของ CD34 (ร้อยละ 0.82±0.91) (รูปที่ 3)

ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับ

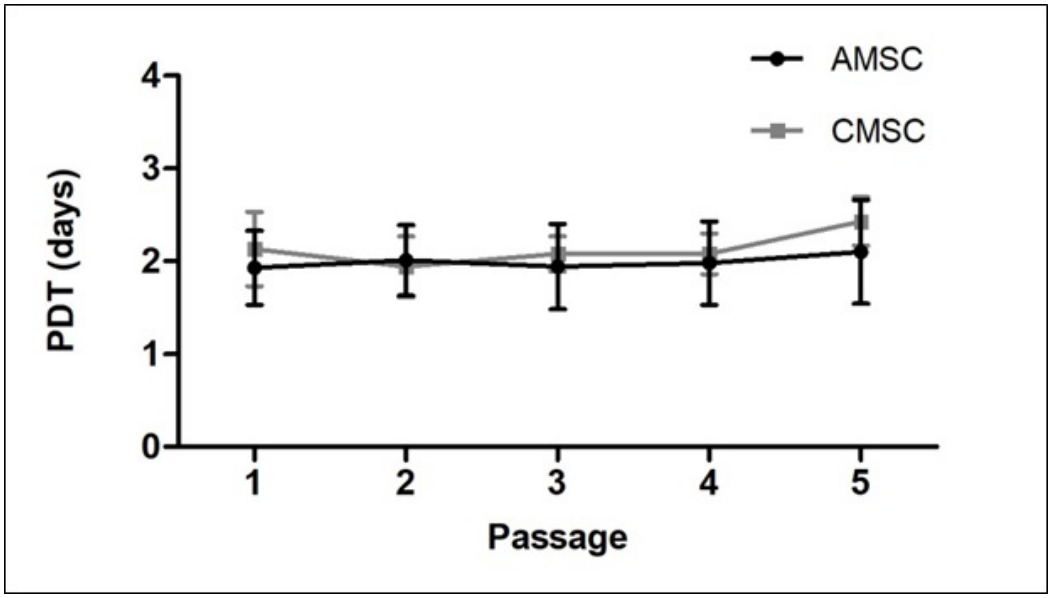
การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะอื่น ๆ ในร่างกาย เป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของ MSCs ซึ่งพบว่าทั้ง AMSC และ CMSC มีความสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับ ได้เมื่อถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหนี่ยวนำ (รูปที่ 4)

การรอดชีวิตของ AMSC และ CMSC ภายหลังการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็ง

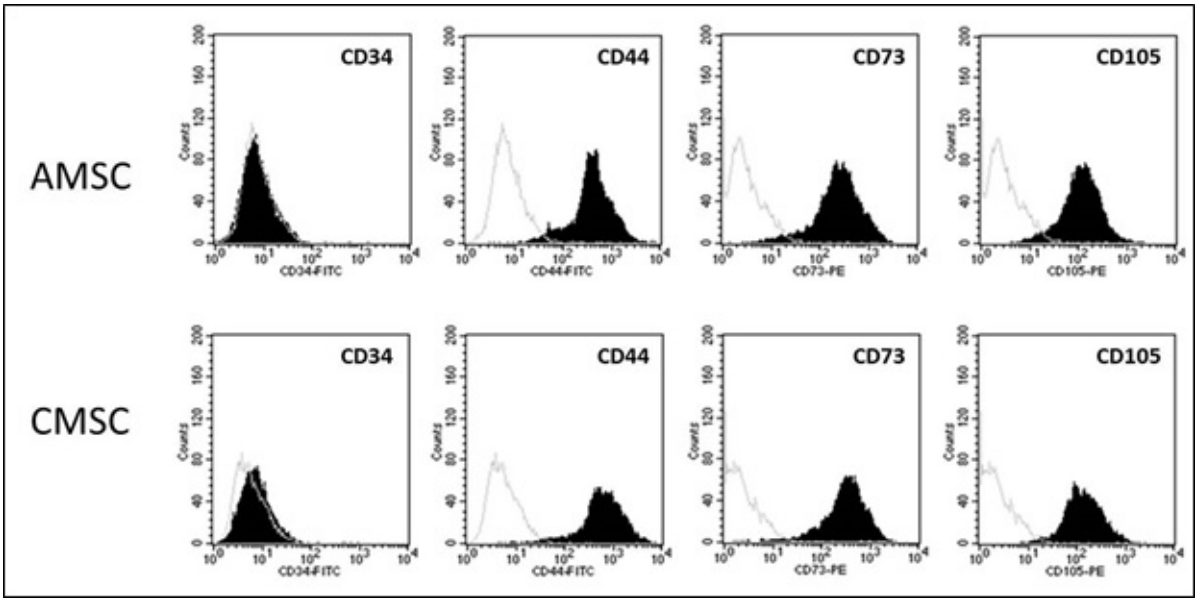
การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง ตรวจสอบโดยใช้ AMSC หรือ CMSC ที่ passage 5 และเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน ก่อนที่จะนำมาละลายและทำการเพาะเลี้ยงอีกครั้ง ผลการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยเทคนิค trypan blue dye exclusion assay พบว่า AMSC และ CMSC มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 90.88±5.59 และ 90.35±5.61 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถคงคุณสมบัติในการยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงและลักษณะรูปร่างเซลล์ รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากเซลล์ก่อนแช่แข็ง (ไม่ได้แสดงผล)



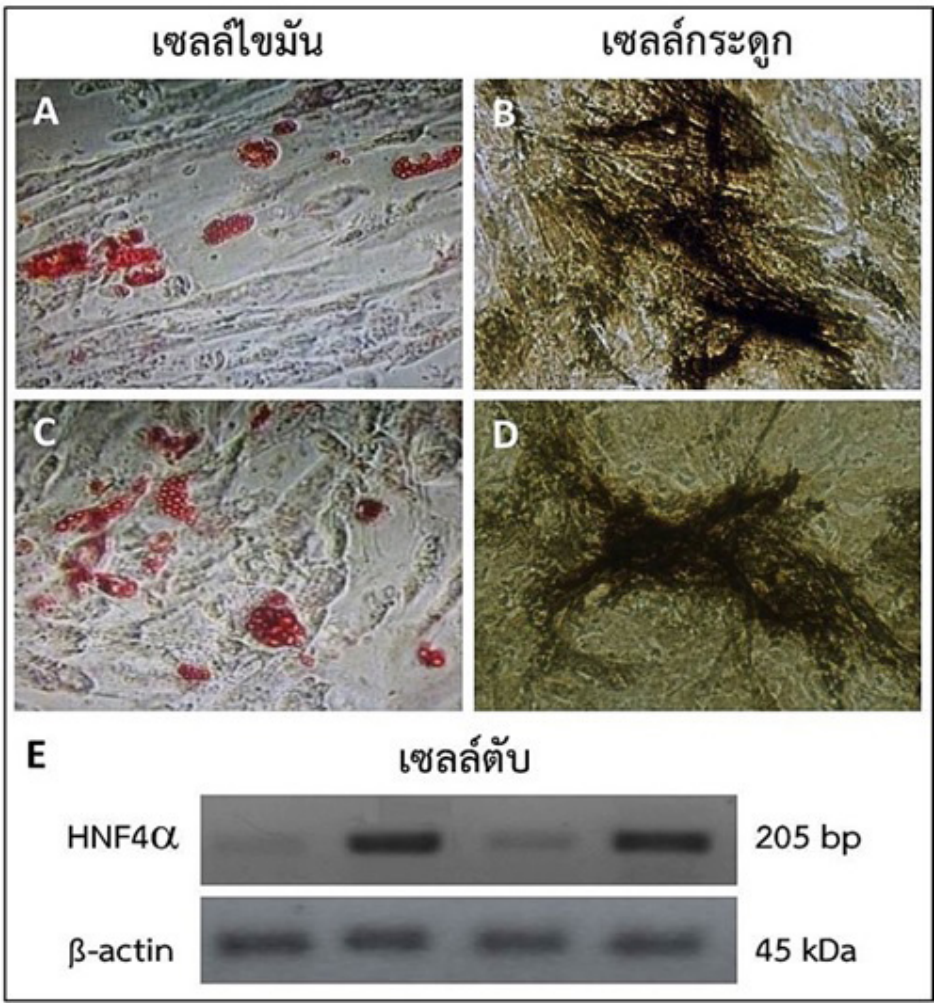
รูปที่ 1 แสดงเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสเคลื่อนออกจากชิ้นเยื่อหุ้มทารกชั้นแอมเนียน (A) คอเรียน (B) และเซลล์กลุ่ม epithelial ที่พบปะปนในจานเพาะเลี้ยง AMSC ที่ passage 0 (C) รูปร่างเซลล์ AMSC และ CMSC ที่ passage 5 (D, E)



รูปที่ 2 แสดงระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวน (PDT) ที่ passage ต่างๆ ของ AMSC และ CMSC (n=5)



รูปที่ 3 รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ของ AMSC และ CMSC



รูปที่ 4 ภาพแสดงผลการย้อมติดสีภายหลังการถูกเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกของ AMSC (A-B) และ CMSC (C-D) ที่กำลังขยาย 200 เท่า ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน HNF4α ด้วยเทคนิค RT-PCR (E) โดย lane 1 คือ AMSC กลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงปกติ, lane 2 คือ AMSC ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ตับ, lane 3 คือ CMSC กลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงปกติ และ lane 4 คือ CMSC ภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ตับ

วิจารณ์

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากแอมเนียนและคอเรียน ได้รับความสนใจและถูกใช้ในวงกว้างสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ เนื่องด้วยศักยภาพของเซลล์ รวมถึงเป็นแหล่งที่เข้าถึงได้ง่ายและเป็นชีววัสดุเหลือทิ้งหลังการคลอด จึงทำให้ไม่มีปัญหาด้านจริยธรรม จากการศึกษานี้ พบว่าสามารถแยก MSCs จากแอมเนียนและคอเรียน ด้วยวิธี explant method ในช่วง primary culture ของ AMSC พบว่ามีการปะปนของเซลล์กลุ่ม epithelial ซึ่งอาจมาจาก epithelial layer ที่ไม่ได้ทำการกำจัดออกในขั้นตอนการแยก อย่างไรก็ตามเซลล์กลุ่มนี้มักเจริญเติบโตได้ช้ากว่า MSCs ดังนั้นในช่วงที่เซลล์มีการเคลื่อนที่ออกจากชิ้นเนื้อ ประมาณวันที่ 5-7 ของการเพาะเลี้ยง จึงสามารถตรวจสอบกลุ่มเซลล์โดยดูลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกำจัดเซลล์ epithelial ออกให้หมด ในบางรายงานนำเสนอวิธีการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ (enzyme digestion) เพื่อลดการปะปนของเซลล์ epithelial ออกก่อน เพื่อที่จะแยกหรือเพาะเลี้ยง MSCs จากแอมเนียน แต่จากรายงานของ Bačenková และคณะ[5] พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ยังคงมีการปะปนของ epithelial อยู่ และมีข้อควรระวังคือการที่เซลล์ถูกบ่มในเอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปหรือระยะเวลาบ่มนานเกินไปอาจส่งผลต่อคุณภาพของเซลล์ที่ได้ต่ำลง ซึ่งจากงานวิจัยของ Bortolotti และคณะ[9] ได้แสดงให้เห็นว่าศักยภาพของ MSCs ไม่ได้ขึ้นอยู่กับเฉพาะแหล่งที่มาเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้แยกเซลล์ด้วย ดังนั้นการใช้วิธีคัดแยกเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพสูงจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยคัดแยกเซลล์ด้วยวิธี explant method ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน รวมถึงไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในการคัดแยกเซลล์

การศึกษานี้ AMSC และ CMSC ที่แยกได้มีลักษณะรูปร่างเป็น fibroblast-like cell คล้ายกัน และมีลักษณะเป็น homogeneous population หลังจากเพาะเลี้ยงไป 2-3 passages และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนได้มากกว่า 5 passages จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าบาง cell line ของ CMSC มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่า AMSC และเจริญเติบโตช้าลงเมื่อเพาะเลี้ยงใน passage ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า PDT ของ CMSC ที่มีแนวโน้มยาวนานขึ้นใน passage 4 และ 5 อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง PDT แต่ละ passage ของ AMSC และ CMSC ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ MSCs ที่แยกได้จากทั้งแอมเนียนและ คอเรียน มีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD44, CD90, CD105 และ CD34 รวมถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กลุ่ม mesoderm (เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูก) และกลุ่ม endoderm (เซลล์ตับ) เมื่อเหนี่ยวนำในน้ำยาที่เหมาะสม คล้ายกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้[3,5-7]

สรุป

การศึกษานี้พบว่า AMSC และ CMSC มีคุณลักษณะและคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์ต้นกำเนิด โดยพบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ MSCs และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เป็นระยะเวลานาน ตลอดจนมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายชนิดอื่น นอกจากนี้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการแล้ว ยังสามารถเก็บรักษาเซลล์ในสภาวะแช่แข็งโดยที่เซลล์ยังมีชีวิตเมื่อนำออกมาเพาะเลี้ยงใหม่ และยังคงมีลักษณะรูปร่าง รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากก่อนแช่แข็ง แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บ MSCs ไว้ใช้ได้ เพื่อการศึกษาวิจัยและการนำไปประยุกต์ใช้ในรักษาโรคต่อไปในอนาคต ดังนั้นจึงสรุปว่าแอมเนียน และคอเรียน เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่ง MSCs ที่อาจนำไปใช้เพื่อการรักษาโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ วช. (หมายเลขทุน 2555-121)

เอกสารอ้างอิง

1. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. J Cell Biochem 2006; 97: 744–54.

2. Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. Cell Mol Biol Let. 2011; 16: 493-514.

3. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M,et al. Concise review: isolaton and characterizaton of cells from human term placenta: outcome of the frst internatonal Workshop on Placenta Derived Stem Cells. Stem Cells. 2008; 26: 300-11.

4. Akiva J Marcus, Dale Woodbury. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J Cell Mol Med 2008; 12: 730-42.

5. Darina Bacenkova, Ján Rosocha, Timea Tóthová, Ladislav Rosocha, Marek Šarisský. Isolation and Basic Characterization of Human Term Amnion and Chorion Mesenchymal Stromal Cells. Cytotherapy 2011; 13: 1047-56.

6. Phermthai T, Thongbopit S, Pokathikorn P, Wichitwiengrat S, Julavijitphong S, Tirawanchai N. Carcinogenicity, efficiency and biosafety analysis in xeno-free human amniotic stem cells for regenerative medical therapies. Cytotherapy 2017; 19: 990-1001.

7. Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. World J Stem Cells 2012; 4: 53-61.

8. Julavijitphong S, Wichitwiengrat S, Tirawanchai N, Ruangvutilert P, Vantanasiri, C, Phermthai T. A xeno-free culture method that enhances Wharton's jelly mesenchymal stromal cell culture efficiency over traditional animal serum–supplemented cultures. Cytotherapy 2014; 16: 683-91.

9. Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozi G, Pelos B, et al. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. Stem Cell Rep 2015; 4: 332–3.

SMJ