



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษารูปแบบ epigenetics ของ mesenchymal stem cell ใน passage
ต่างๆภายหลังการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

โดย ดร.ทัศนีย์ เพิ่มไทย

พฤษภาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษารูปแบบ epigenetics ของ mesenchymal stem cell ใน passage
ต่างๆภายหลังการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ดร.ทักษิณ เพิ่มไทย

Embryonic stem cell research center ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรี
เวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ศ.นพ. สุรพล อิศโรกรศีล

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ

1. หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับจัดหาตัวอย่างทดลองน้ำคร่ำ
2. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการตรวจวัดปริมาณ 5mC ด้วยเครื่อง HPLC
3. สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการตรวจวัด cell surface marker ด้วย Flow Cytometry

บทคัดย่อ

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 : นำคร่าจากสตรีตั้งครรภ์ 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 จะถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะเพื่อให้ได้นิวคลีโอไทด์เดี่ยว เพื่อวัดความเข้มข้นของ 5-methyl cytidine โดยคำนวณค่าเทียบกับกราฟมาตรฐาน และทำการศึกษาการแสดงออกของยีนฝ่งจำด้วยการสร้าง cDNA เพื่อตรวจหาระดับการแสดงออกของยีนฝ่งจำ 3 ชนิด ได้แก่ IGF2, MEST และ SNRPN ด้วยเทคนิค real-time PCR

ผลการทดลอง : พบว่าเซลล์ AFS ที่เพาะเลี้ยงภายนอกอวัยวะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับ global DNA methylation และการแสดงออกของยีนฝ่งจำ ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกันในระดับการแสดงออกของยีนฝ่งจำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการแสดงออกของยีนฝ่งจำทั้ง 3 ชนิดนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่สูงขึ้น และที่น่าสนใจ คือ พบว่าการแสดงออกของ IGF2 มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ

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

คำสำคัญ : เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ, เซลล์ต้นกำเนิด, การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายนอกอวัยวะ, การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ, ยีนฝ่งจำ

Abstract

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.

Keywords : amniotic fluid stem cell, stem cell, in vitro culture, DNA methylation, gene imprinting

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

แนวคิดในการใช้เทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาหรือซ่อมแซมภาวะพิการเรื้อรังและเสื่อมสลายถือเป็นความหวังใหม่ในวงการแพทย์ ได้มีการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้ในการทดลองรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเลือดบางชนิด โรคหัวใจ หรือการรักษาแผลจากโรคเบาหวาน เป็นต้น โดยในการศึกษาทดลองดังกล่าว อาศัยคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิด คือ ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกายชนิดต่างๆ ได้ตามการกระตุ้นของสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ดังนั้นเมื่อฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าไปในตำแหน่งหรืออวัยวะที่บาดเจ็บหรือเสื่อมสลายแล้ว เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์ของอวัยวะนั้นๆ เพื่อทำงานแทนเซลล์ที่เสียหายหรือตายไป ทำให้อวัยวะที่บาดเจ็บหรือเสื่อมสลายกลับมาทำงานได้อีกครั้ง

เซลล์ต้นกำเนิด ชนิด adult stem cell พบได้ในอวัยวะบางส่วนของร่างกาย โดยแหล่งใหญ่ที่จัดหาได้ง่ายคือ จากไขกระดูก (bone marrow) และ เลือดสายสะดือ (cord blood) ปัจจุบันได้มีการนำ adult stem cell ไปใช้รักษาอาการของโรคต่างๆ โดยการฉีดกลับไปให้อวัยวะที่มีอาการทุพพลภาพโดยตรง และพบว่าอวัยวะเหล่านั้นกลับมาทำงานได้ดีขึ้นในระยะแรก แต่ข้อจำกัดที่พบ ในการนำ adult stem cell ไปใช้ ได้แก่ จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากอวัยวะมีน้อยเกินไป ทำให้การรักษาไม่ประสบผลสำเร็จซึ่งพบได้บ่อยครั้ง ด้วยเหตุนี้จึงมีการพิจารณาหาเซลล์ต้นกำเนิดแหล่งใหม่ที่มีศักยภาพใกล้เคียง ซึ่งต่อมาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากลูกอ่อนในครรภ์มารดา (fetal stem cell) ที่น่าจะเป็นความหวังที่จะนำมาใช้เป็นหลักแหล่งใหม่ของเซลล์ต้นกำเนิดสำหรับการรักษาทางการแพทย์ เนื่องจากในปี 2003 มีรายงานว่าเซลล์ในน้ำคร่ำที่มีการแสดงออกของยีน oct-4 ในน้ำคร่ำ ซึ่งการแสดงออกนี้เป็นการบ่งบอกถึงศักยภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระดับ pluripotent state เนื่องจาก oct-4 เป็น transcription factor ที่พบได้ในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดที่มาจากตัวอ่อน (embryonic stem cell หรือ ES) เท่านั้น และจากการศึกษาต่อมาถึง marker บนผิวเซลล์ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำมีการแสดงออกของ marker ในบางส่วนคล้ายคลึงกับที่พบบนผิวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และ marker ที่พบบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย ชนิด mesenchymal stem cell จากผลการรายงานนี้ทำให้นักวิจัยบางกลุ่มเชื่อว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากน้ำคร่ำนี้น่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติอยู่ใน intermediate stage ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย ซึ่งน่าจะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีคุณสมบัติเหนือกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย และผลการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำไปทดสอบการเกิด *in vitro* differentiation พบว่าสามารถถูกเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ร่างกายชนิดต่างๆ ได้หลาย lineage ทั้งที่มาจาก ectoderm, mesoderm และ endoderm โดยมีรายงานการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocyte) เซลล์กล้ามเนื้อ(myocyte) เซลล์กระดูก(osteoblast) เซลล์ตับอ่อน (pancreatic cell) เซลล์ตับ

(hepatic cell) เซลล์สมอง (neuron cell) และเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้สำเร็จ และในการทดลอง *in vivo* differentiation โดยการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำเข้าไปในสัตว์ทดลองที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน (immunodeficiency mice) พบว่าไม่มีการเกิด teratoma formation ในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาถึง telomerase activity ในเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ สามารถตรวจพบการทำงานของ telomerase เอนไซม์เหมือนที่พบใน undifferentiated cell ทั่วไปรวมทั้งมีรายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดในน้ำคร่ำนี้มีระดับการแสดงออกของ cyclin A ในระดับสูง ซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถแบ่งตัวได้มากกว่า 250 population doubling ในการทำการทดลอง จากผลการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำนั้นไม่พบข้อจำกัดในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนดังที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัยและไม่มีปัญหาในด้านจริยธรรมการใช้ตัวอ่อนดังที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในการศึกษาปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ จากเหตุผลเหล่านี้จะเห็นได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำอาจจะเป็นกุญแจตัวสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาทางคลินิกได้จริงดังนั้นในครั้งนี้อจึงเลือกใช้เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำสำหรับทำการศึกษาวิจัย

แต่อย่างไรก็ตามการนำเซลล์ไปใช้ต้องทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงขยายจำนวนในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมาด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มี growth factor ต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกายเพื่อเพิ่มจำนวน (proliferation) โดยให้เซลล์ต้นกำเนิดยังคงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดและควรได้รับการศึกษาตรวจสอบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้ยังคงมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำกลับเข้าไปใช้ในร่างกายหรือไม่ เพราะการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณลักษณะผิดปกติไปอาจจะก่อโทษได้หากนำกลับเข้าไปในร่างกายอีกครั้ง เนื่องจากคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดจะทำให้เซลล์ที่ผิดปกติมีการเพิ่มจำนวนตามไปด้วย และอาจมีผลทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงการ differentiation ไปสู่เซลล์ที่ผิดปกติด้วย ดังจะเห็นตัวอย่างได้จากในสัตว์โคลนนิ่งที่มีเซลล์ตั้งต้นในระยะตัวอ่อนในสถานะ pluripotency คล้ายคลึงกับในเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความผิดปกติ ทำให้ขบวนการเปลี่ยนแปลง differentiation ในสัตว์โคลนนิ่งเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ จนเป็นสาเหตุให้พบความผิดปกติมากมายรวมถึงการเสียชีวิตของสัตว์โคลนนิ่ง ดังนั้นการศึกษาศึกษาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดภายหลังการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงภายนอกกาย จึงมีความจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้รักษาทางคลินิกต่อไป เพราะจะเป็นตัวบ่งชี้และคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดที่สมบูรณ์ไปใช้ต่อไป

เซลล์ต้นกำเนิด เป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษกว่าเซลล์ชนิดอื่น 2 ประการ ได้แก่ ความสามารถในการแบ่งตัวโดยที่ยังคงรักษาสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ และการมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกายชนิดต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญทั้งสองประการนี้ เป็นผลมาจากการแสดงออกพร้อมกันของยีนหลายยีนของกลุ่มยีน ที่เรียกว่า pluripotent genes และประกอบกับการหยุดทำงานของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเหนี่ยวนำ (Differentiation) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย โดย

เป็นที่เชื่อกันว่ามีกระบวนการที่ทำหน้าที่ควบคุมให้ยีนทั้งสองกลุ่มนี้สามารถทำงานได้อย่างถูกต้องและผสมผสานกันอย่างเหมาะสมทั้งปริมาณและเวลา คือ กระบวนการของระบบการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งระบบกลไกการควบคุมระบบหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ระบบกลไก Epigenetics ซึ่งระบบกลไก epigenetics เป็นกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงต่างๆของเซลล์โดยไม่เกี่ยวข้องกับการลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอตามกลไกการควบคุมทั่วไปที่ใช้ เช่น การรักษาสภาพเซลล์ต้นกำเนิดให้คงอยู่ในภาวะ pluripotency และกิจกรรมการทำงานต่างๆภายในเซลล์ รวมทั้งการ differentiation ด้วย โดยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เซลล์จะทำการควบคุมหรือเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation และ ปฏิกริยาต่างๆบนสายโปรตีนฮิสโตน ทำให้โครงสร้างของโครมาตินคงสภาพไว้ได้หรือมีการเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพในภาวะ pluripotency ของ stem cell สรุปรูปแบบที่จำเพาะของเซลล์ชนิดต่างๆ (1-5) อีกทั้งกลไก epigenetics ยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเติบโตของเซลล์ด้วย (6-7) โดยทั่วไปกระบวนการหลักในระบบ epigenetics ที่มีความสำคัญได้แก่ DNA methylation, histone methylation, histone acetylation และ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (chromatin remodeling) โดยกระบวนการย่อยเหล่านี้จะทำงานอย่างเกี่ยวเนื่องสัมพันธ์กัน

DNA methylation เป็นกลไกที่ใช้สำหรับห้ามการแสดงออกของยีนโดยมีการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิดรวมทั้งกลุ่ม methyl-CpG-binding proteins ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน MECP2, MBD1 และ MBD2 เป็นต้น(8) ในการทำงานของ DNA methylation โดยผ่าน pathway ของ MECP2 นั้น MECP2 จะรวมตัวกับ histone deacetyltransferase (HDAC) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม histone modification ในการควบคุมปฏิกริยาห้ามการแสดงออกของยีนบนสาย histone เพื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนร่วมกัน (9-10) ส่วนใน pathway ของ MBD2 พบว่า MBD2 จะทำการเติมกลุ่ม methyl ลงบนสายดีเอ็นเอโดยการรวมตัวกับกลุ่มโปรตีน Mi-2/NuRD ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการเปลี่ยนแปลง chromatin (chromatin remodeling) และ ทำงานร่วมกับโปรตีน HDACs ซึ่งอยู่ในกลุ่มควบคุม histone modification (11-12) ดังนั้นเพื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนจะเห็นได้ว่าการทำงานของกระบวนการย่อยในกลไก epigenetics มีความสัมพันธ์กันโดยสังเกตจากการเกิด complex ของ MECP2 - Mi-2/NuRD – HDACs ในการร่วมกันทำการควบคุมการแสดงออกของยีนนั่นเอง (8, 13-14)

ยีนฝึ้งจำ หรือ imprinted gene คือ กระบวนการฝึ้งจำรูปแบบการแสดงออกของยีนบน allele อันใดอันหนึ่งที่ได้จากพ่อหรือแม่ (15-16) เช่น insulin-like growth factor 2 และ H19 เป็นต้น (16-21) ซึ่งเป็นการควบคุมการทำงานของยีนภายใต้กลไก epigenetics แบบหนึ่ง โดยมีกระบวนการ DNA methylation เป็นพื้นฐานในการกำหนด gene imprinting โดย allele ที่ไม่มีการแสดงออกจะถูกเติมกลุ่ม methyl ลงไปทำให้ไม่สามารถแสดงออกได้ ยีนฝึ้งจำเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะมีความสำคัญและจำเป็นต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (16, 22-25) จากการศึกษาพบว่า ความผิดปกติของระดับการแสดงออก หรือ allele แสดงออกที่ผิดปกติของยีนเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (25-27) ดังตัวอย่างที่พบในสิ่งมีชีวิตโคลนนิ่งพบว่า

imprinting ยีนมีความผิดพลาด โดยเริ่มตั้งแต่ระยะตัวอ่อนซึ่งเซลล์อยู่ในสถานะเป็น pluripotency ทำให้สัตว์โคลนนิ่งมีการพัฒนาอวัยวะต่างๆอย่างไม่สมบูรณ์ และพบความผิดปกติต่างๆ เช่น โรค large calf syndrome ในวัว หรือแม้แต่ในมนุษย์ที่พบโรค Beckwith-Wiedemann syndrome ในคน ก็ถูกรายงานว่าเกิดจากความผิดพลาดของการแสดงออกของยีนฝังจำ (25, 28-32)

แต่อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจในศาสตร์ต่างๆของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำยังมีน้อยมากซึ่งต้องการการศึกษาเพิ่มเติม รวมทั้งในด้านการควบคุมรักษาสภาวะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดให้คงที่ด้วย ดังนั้นการศึกษานี้จะทำการศึกษาถึงรูปแบบ epigenetics บางกลไก ได้แก่ กลไก DNA methylation และกลไกยีนฝังจำของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำแล้วทำการการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติและศึกษาถึงลักษณะการดำเนินไปของกลไกเหล่านี้เมื่อเซลล์ต้นกำเนิดถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดภายนอกในร่างกาย

2. วิธีการทดลอง

2.1. การแยกและเพาะเลี้ยง mesenchymal stem cell

การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำด้วยเทคนิค Magnetic Cell Sorting

มีขั้นตอนการคัดแยก ดังนี้

นำเลือดสายสะดือจากตัวอย่างการศึกษา 30 ตัวอย่าง มา dilute กับสารละลาย Hanks' balance salt ในอัตราส่วน 1:1 และปั่นแยกเอา mononuclear cell โดยใช้ ficoll solution จากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง mesenchymal stem cell (MEM) ที่มี 20% fetal bovine serum, 100 mg/ml streptomycin, 100 unit/ml penicillin และ 2 mM L-glutamine จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงต่อไปเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ in air เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ที่ไม่เกาะกับพื้น tissue culture dish ออกด้วย phosphate buffer saline ก่อนเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งได้เซลล์เต็มพื้นที่ โดยต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงทุกๆ 3-4 วัน เซลล์ที่ได้ถือเป็น passage ที่ 0 จะทำการแบ่งเซลล์ใน passage 0 ที่ได้นี้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งจะถูกนำไปศึกษาในข้อ 2, 3 และ 4 ต่อไป ส่วนอีกกลุ่มจำนวน 10 ตัวอย่างการศึกษา จะถูกนำไป subculture โดย trypsinization ด้วย 0.25% Trypsin/EDTA และ เพาะเลี้ยงต่อใน passage ต่อไป โดยเซลล์ใน passage ที่ 3, 5, 7, 10, 15 และ 20 จะถูกแบ่งจำนวนเซลล์ออกเป็น 3 ส่วน โดยเซลล์ส่วนที่ 1 จะถูกนำไปใช้ในข้อ 2, 3 และ 4 เซลล์ส่วนที่ 2 จะถูกนำไปใช้สำหรับการ culture ใน passage ต่อๆไป และเซลล์ส่วนที่ 3 จะถูกเก็บไว้เพื่อการศึกษาต่อๆไป

2.2. การตรวจสอบคุณสมบัติของ เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ

1. ตรวจสอบโปรตีนที่จำเพาะของเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

- โปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัยชนิด mesenchyme ได้แก่ CD73 (BD Pharmingen, cat.no. 550257,) , CD90 (eBioscience, cat.no.11-0909), CD105 (eBioscience, cat.no.12-1057)
- โปรตีนจำเพาะต่อ hyaluronan receptor ได้แก่ CD29 (eBioscience, cat.no.12-0299) และ CD44 (eBioscience, cat.no.11-0441)
- โปรตีนจำเพาะต่อการเจริญเติบโตเป็นเซลล์เม็ดเลือด ได้แก่ CD34 (BD Pharmingen, cat.no 555821) และ CD45 (BD Pharmingen, cat.no 555483)
- โปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดสมอง ได้แก่ CD133 (eBioscience, cat.no.12-1338)
- โปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน หรือ pluripotent stem cell ได้แก่ Oct-4 (Chemicon, cat. no. MAB-4305) และ stage-specific embryonic antigen type 4 (SSEA-4; BD Pharmingen, cat. no 560128)
- Isotype control-PE (BD Pharmingen, cat.no 550617)
- Isotype control-FITC (BD Pharmingen, cat.no 550616)

2. ตรวจสอบโปรตีนที่จำเพาะของเซลล์ด้วยเทคนิค fluorescence microscopy

ตรวจโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยการย้อมสีตามหลักการ indirect staining ต่อ Oct-4 (Chemicon, cat.no. MAB-4305), SSEA-4 (Chemicon, cat.no. MAB-4304), Tra-1-60 (Chemicon, cat.no. MAB4360) และ Tra-1-81 (Chemicon, cat.no.MAB4381) ซึ่งใช้ Goat anti-mouse IgG conjugates FITC (Chemicon, cat.no. AP308F) เป็นแอนติบอดีตัวที่ 2 (secondary antibody)

3. วิธีการย้อมสีเพื่อนำไปตรวจสอบโปรตีนจำเพาะของเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry ทำโดยนำเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่เพาะเลี้ยงไว้มาแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยว และล้างด้วย PBS 2 ครั้ง หลังการล้างทำการเติม PBS 100 ไมโครลิตร และแอนติบอดีของโปรตีนจำเพาะที่ต้องการทดสอบดังกล่าวในข้อ 7.1 ในอัตราส่วน 1:200 ตั้งรอกเวลาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วจึงปั่นล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย PBS ก่อนจะทำให้เซลล์คงสภาพ (fix) ด้วย 1% paraformaldehyde (Merck, cat.no. S4440815-605) แล้วจึงนำไปตรวจสอบการติดสีด้วยเทคนิค flow cytometer โดยใช้เครื่อง Becton Dickinson รุ่น FacSort

4. วิธีการย้อมสีเพื่อนำไปตรวจสอบโปรตีนจำเพาะของเซลล์ด้วย fluorescence microscope เริ่มจากการรักษาสภาพเซลล์ต้นกำเนิด (fix) ด้วย 4% paraformaldehyde และล้างออกด้วย PBS ก่อนทำการ

เติม blocking solution ซึ่งเตรียมจาก 3% BSA (Gibco, cat.no.11270-098), 0.5% Tween/PBS (USB, cat.no. 20605) ลงไปนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้อมด้วย 1st Antibody ที่ละลายใน blocking solution ในอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ก่อนย้อมด้วย secondary antibody ที่มีสารเรืองแสงติดอยู่โดยใช้อัตราส่วน 1:300 แล้วเก็บที่มีคนาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำออกมาล้าง secondary antibody ที่เหลือด้วย PBS เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดย เซลล์ที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและ เซลล์ที่ใช้เป็น negative control ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์

2.3. การตรวจสอบระดับ global DNA methylation

การเตรียม DNA

นำเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้ใน passage ต่างๆ มาสกัด DNA โดยใช้เทคนิค Phenol-Chloroform ซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้ phenol-chloroform-isoamyl แล้วนำสาย DNA ที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย spectrophotometer ก่อนที่จะนำ DNA (OD ที่ wavelength 260/280 มากกว่า 1.9) ในปริมาณ 25 ไมโครกรัม จากนั้นนำมาทำการทำลาย RNA ด้วยการ incubate ด้วย RNase H (invitrogen) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนจะนำ DNA มาทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์สำหรับตัดพันธะเคมีบนสาย DNA ที่ตำแหน่ง Pyrophosphate และ glycosidic bond โดยใช้ enzyme nuclease P1 (Wako) และ calf intestinal phosphatase (US biological) เพื่อให้ได้ 5-methyl deoxycytidine จากนั้นนำ nucleoside ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์หาระดับของ DNA methylation ต่อไป

การวัดระดับ DNA methylation โดย เทคนิค HPLC

สร้าง standard curve จากความเข้มข้นของสาร 5-methyl-2'-deoxycytidine มาตรฐาน (Sigma) และ internal standard nucleoside ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งจะเป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นสาร 5-methyl-2'-deoxycytidine สำหรับการวัดระดับ DNA methylation จากนั้นตรวจหาระดับความเข้มข้นของ 5-methyl-2'-deoxycytidine จากสารละลาย nucleic acid ที่สกัดจากสาย DNA ของ stem cell ที่เตรียมไว้ โดยการศึกษาจะดำเนินการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนฝังจำ

การสกัด RNA

นำเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้ใน passage ต่างๆ มาสกัด RNA โดยใช้เทคนิค Phenol-Chloroform ซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้ phenol-chloroform-isoamyl แล้วทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของ DNA ด้วยการเติม เอนไซม์ DNase และ incubate ไว้ใน 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเปลี่ยนสาย RNA ที่ได้เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription แล้วนำสาย cDNA ที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย spectrophotometer ก่อนที่จะนำไปเก็บไว้เป็น cDNA stock สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ (imprinted gene)

นำเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้ใน passage ต่างๆ มาสกัด RNA โดยเทคนิค Phenol-Chloroform 2 ครั้ง โดยใช้ phenol-chloroform-isoamyl แล้วเปลี่ยนสาย RNA ที่ได้เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription ก่อนตรวจหาปริมาณการแสดงออกของยีนฝังจำ 3 ชนิด ได้แก่ Insulin-like growth factor 2 (IGF2), SNRPN และ MEST โดยใช้ specific primer ต่อขึ้นทั้ง 2 ในการเพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้และอ่านผลด้วยเทคนิค real time PCR

3. ผลการทดลอง

3.1. ผลการทดลองช่วงที่ 1 (1-6 เดือน)

ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงแยกเก็บเซลล์ต้นกำเนิด จากน้ำคร่ำด้วยเทคนิค Magnetic cell sorting และทดลองเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดใน passage ที่ 0 และเลี้ยงต่อเนื่องไปได้หลาย passage โดยผลการทดลองพบว่า

1. เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่แยกได้มีประมาณ 0-1% ของเซลล์ที่ได้จากน้ำคร่ำ
2. เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่แยกได้สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเป็นโคโลนีจากเซลล์เดี่ยวได้ และมีอัตราการแบ่งตัวที่ดีมาก ทำให้สามารถสร้าง clonal amniotic fluid stem cell line ได้ โดยภาพของ clonal amniotic fluid stem cell line ได้แสดงไว้ในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ภาพแสดงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่เริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว



3. เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำในแต่ละ clonal cell line มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระดับที่แตกต่างกัน โดยสังเกตจากอัตราการแบ่งตัวที่ไม่เท่ากันและ จำนวน passage ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง โดยได้แสดงตัวอย่างในตารางที่ 1

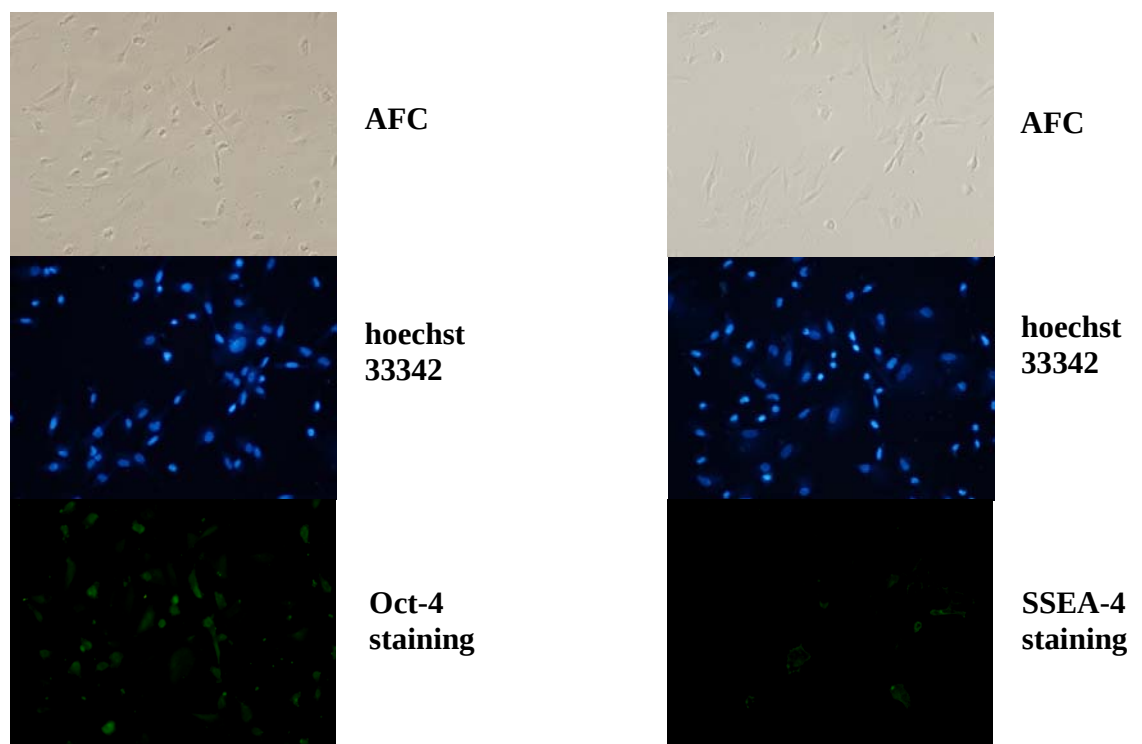
ตารางที่ 1 ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอัตราความเร็วที่ต่างกันของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำในแต่ละสายพันธุ์

Clonal AFS line	จำนวน passage ที่สามารถแบ่งได้ ต่อเนื่องของแต่ละสายพันธุ์	ระยะเวลาที่ใช้สร้างเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ จาก 1 เซลล์ (วัน)
T4	>17	28
T7	>17	28
T8	14	32
T9	>17	28
T10	>20	22
T11	13	32
T12	>19	22
T21	>19	22
6A	>15	32
2F	>30	20

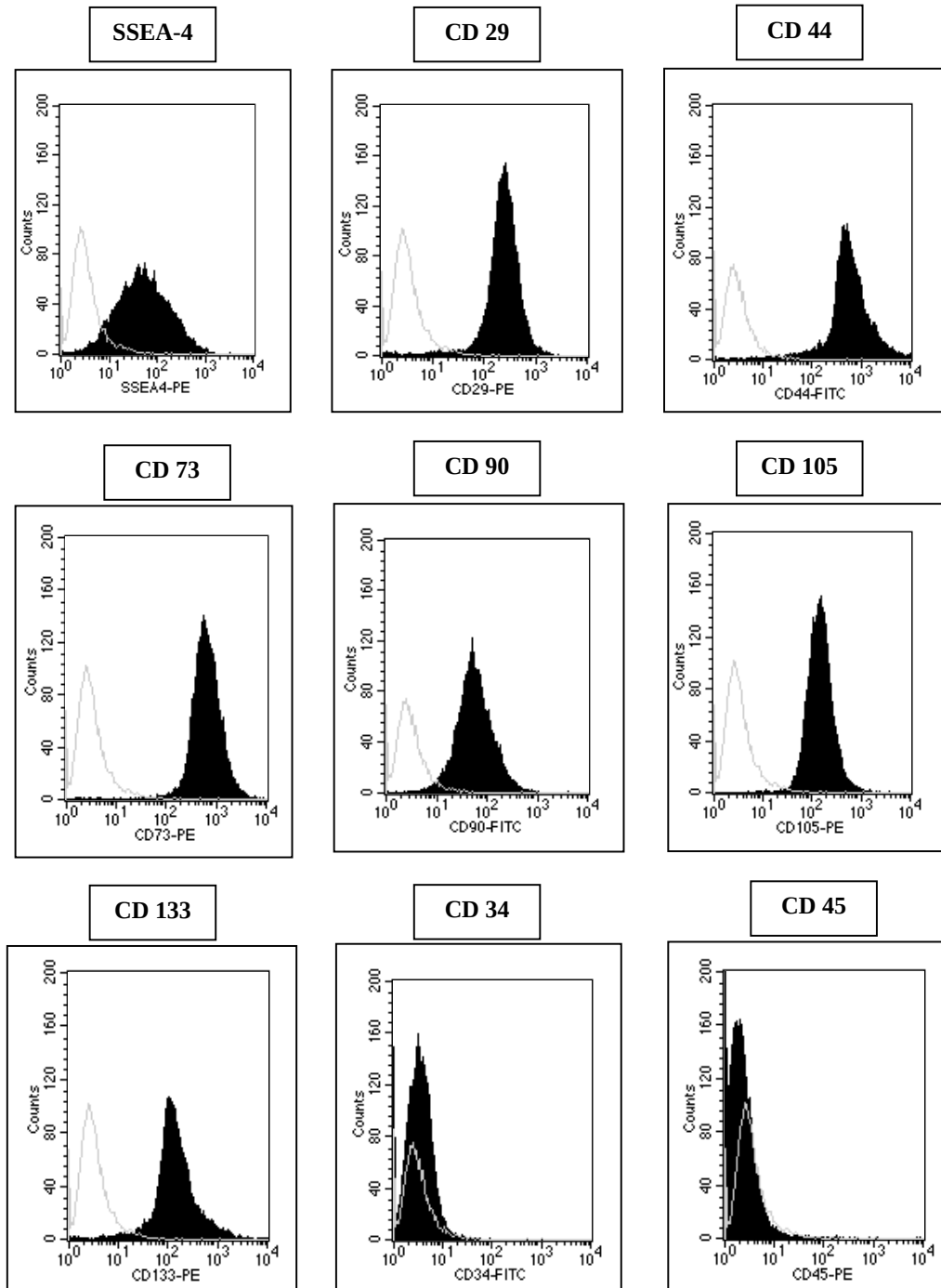
3.2 ผลการทดลองช่วงที่ 2 (7-12 เดือน)

3.2.1. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ ด้วยเทคนิค immunostaining และตรวจวัดด้วย Flow cytometer และ fluorescence microscope พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำที่ได้สามารถแสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนบางชนิด ได้แก่ การแสดงผลบวกต่อโปรตีน Oct 4 และ SSEA4 แสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัยชนิด mesenchymal stem cell ได้แก่ การแสดงผลบวกต่อโปรตีน CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 และยังแสดงโปรตีนจำเพาะบนเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ต้นกำเนิดสมอง ได้แก่ CD 133 แต่ไม่แสดงโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดกลุ่มที่จะพัฒนาต่อไปเป็นเม็ดเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 ซึ่งผลแสดงในภาพที่ 2 และ 3

ภาพที่ 2 ภาพเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำที่แสดงผลบวกต่อโปรตีน Oct 4 และ SSEA4 โดยการวัดด้วย fluorescence microscope



ภาพที่ 3 ภาพแสดงผลการตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำโดยการวัดด้วย Flow cytometer



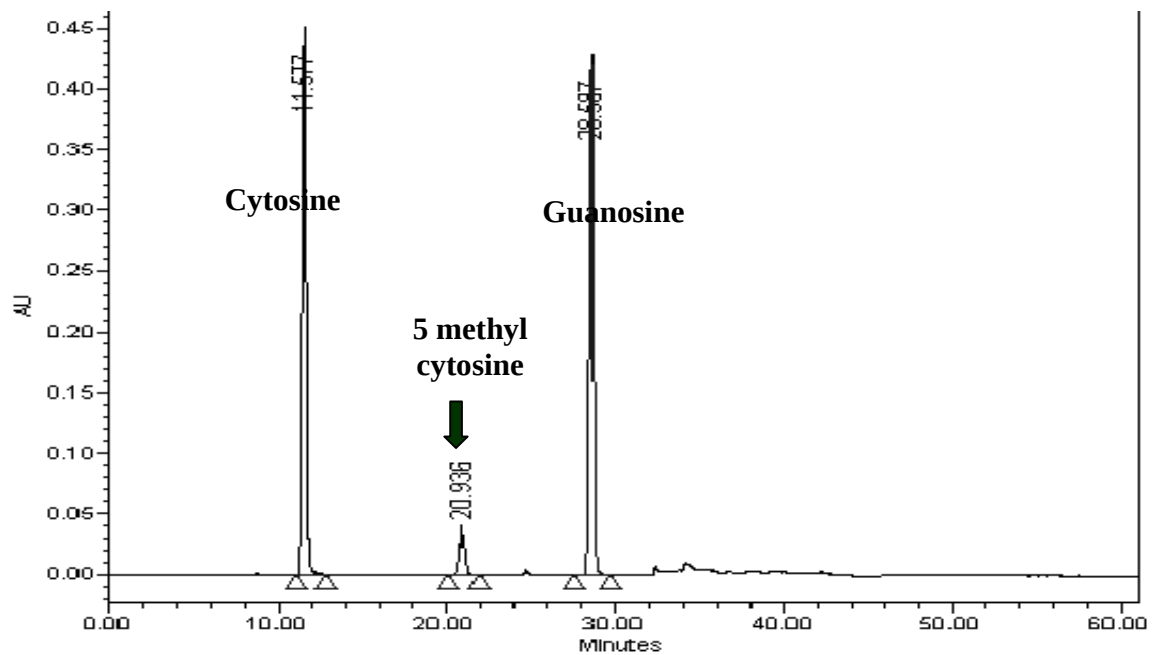
3.2.2. สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อ จำนวน 11 สายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปสกัด RNA และ DNA โดยทำการตรวจสอบคุณสมบัติการแสดงออกบน surface marker เมื่อเพาะเลี้ยงถึง passage ที่ 8 และ 12 และใน passage สุดท้าย ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำได้จัดแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำใน passage ต่างๆ

sample	P8	P10	P12	P14	P15	P17	P18	P19	P20
T4	x	x	x	x	x	x			
T5	x	x							
T7	x	x	x	x	x	x			
T8	x	x	x	x					
T9	x	x	x	x	x	x			
T10	x	x	x	x	x	x	x	x	ND
T11	x	x	x	x					
T12	x	x	x	x	x	x			
T21	x	x	x	x	x	x	x	x	ND
6A	x	x	x	x	x				
2F	x	x	x	x	x	x	x	x	x

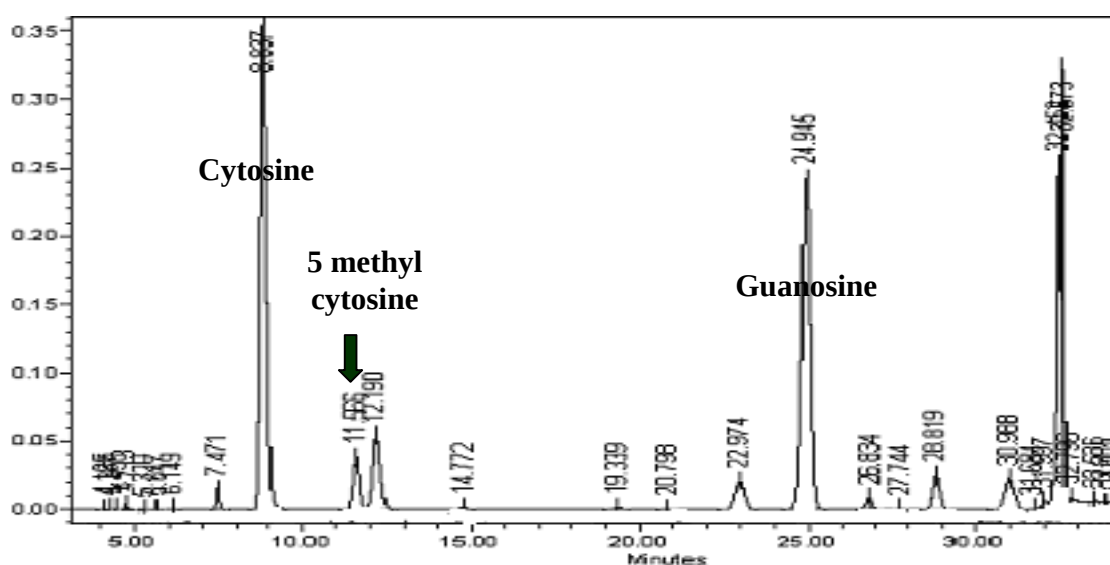
3.2.3. การ set up เทคนิคการวัดระดับ DNA methylation โดย เทคนิค HPLC

1. การทดสอบแยก mixture ของ standard nucleoside 3 ชนิด ได้แก่ cytidine (C), guanosine (G), 5-methyl-cytidine (5MC) เพื่อค้นหาถึงวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาสารทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างทดสอบจริง พบว่าผลการดำเนินการทำได้สำเร็จ สามารถตรวจพบ retention time ของสารที่สนใจทั้ง 3 ชนิด ที่เวลา 11.5 นาที 20.9 นาที และ 28.6 นาที ตามลำดับ



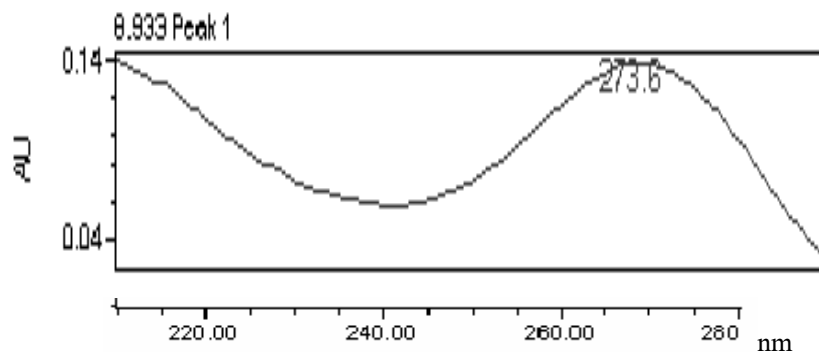
ภาพที่ 4 ภาพแสดงเวลา (retention time) และ peak ของ สารนิวคลีโอไซด์มาตรฐาน (standard nucleoside) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ cytidine (C), guanosine (G) และ 5-methyl-cytidine (5MC) ที่แยกได้จาก สารละลาย โดยเทคนิค HPLC

2. เมื่อทำการทดลองสกัด DNA จาก fibroblast cell ของหนู และนำ DNA ที่ได้มา treat ให้ได้ nucleoside เพื่อนำไปฉีด HPLC โดยใช้วิธีการที่จัดหาได้ในขั้นตอนที่ 3.1 พบว่าสามารถตรวจวัดได้จริง แต่เวลา retention time ที่พบมีความแตกต่างออกไปเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 5 จึงใช้การตรวจสอบ Photo Diode Array เพื่อวัดค่าเฉพาะในการดูคลื่นแสงในแต่ละความยาวคลื่นแสงของสารนิวคลีโอไซด์มาตรฐานแต่ละชนิด เพื่อใช้ในการยืนยันความถูกต้องในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างทดลอง โดยแสดงภาพที่ 6



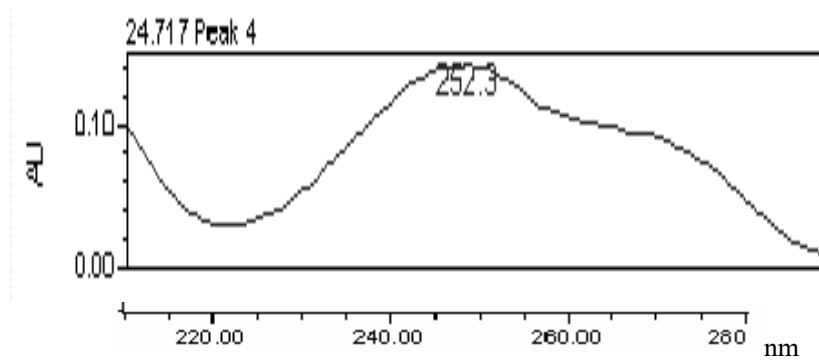
ภาพที่ 5 ภาพแสดงเวลา (retention time) และ peak ของ cytidine (C), guanosine (G) และ 5-methylcytidine (5MC) ที่แยกได้จากเซลล์ fibroblast ของหนู เพื่อเป็นการทดสอบถึงกระบวนการและวิธีการที่ใช้ตรวจหาระดับ methylation บนสายในตัวอย่างทดสอบจริงโดยเทคนิค HPLC ซึ่งพบว่า มี retention time เปลี่ยนไปจากการวัดในสารละลายที่มีเพียง สารนิวคลีโอไซด์มาตรฐาน โดย Peak ของ cytosine (C) แสดงที่ 11.566 นาที Peak ของ methylcytosine (5mC) แสดงที่ 14.772 นาที และ peak ของ guanosine แสดงที่ 24.945 นาที

6A



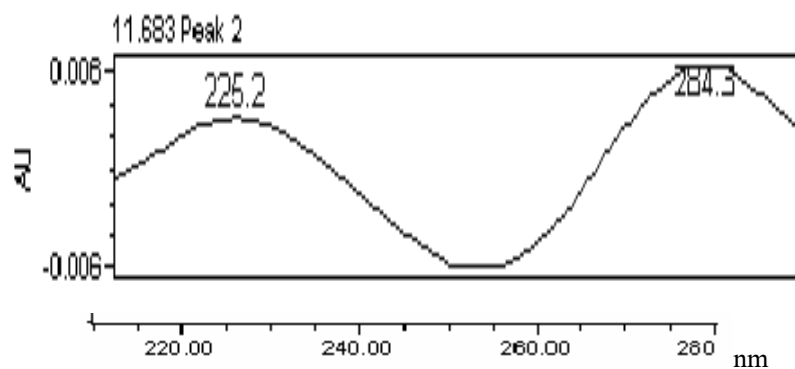
Cytosine

6B



Guanosine

6C



5 methyl
cytosine

ภาพที่ 6 ภาพแสดงผลการตรวจวัดค่าเฉพาะในการดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นแสงของสารนิวคลีโอไซด์มาตรฐาน cytidine (ภาพ 6A), guanosine (ภาพ 6B) และ 5-methyl-cytidine (ภาพ 6C) ด้วย Photo Diode Array

3.3 รายงานผลการทดลองช่วงที่ 3 (13-18 เดือน)

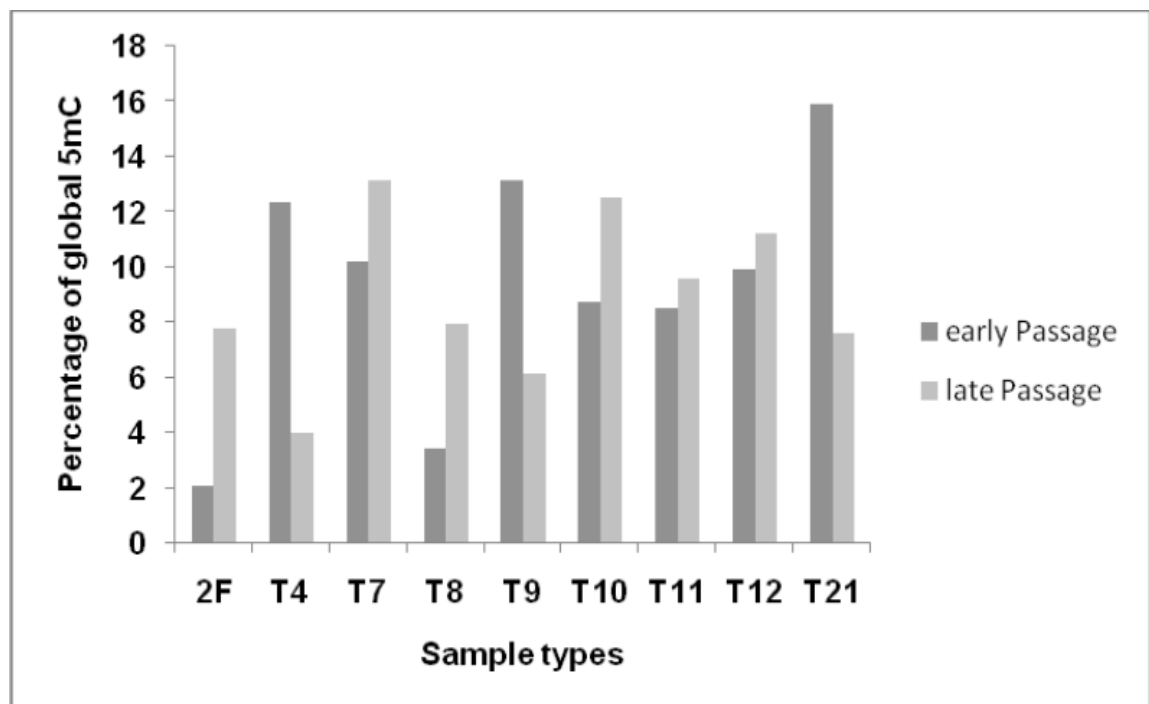
ตรวจสอบระดับ DNA methylation ด้วยเทคนิค HPLC ในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ

โดยการนำเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ ใน passage ที่ 8 และ passage สุดท้ายที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละสายพันธุ์มาทำการสกัด DNA จากนั้นนำ DNA และ treat ด้วยเอ็นไซม์เพื่อให้ได้ nucleoside และพบว่าผลการดำเนินการทำได้สำเร็จ ภายหลังการวิเคราะห์ nucleoside 3 ชนิด ได้แก่ cytidine (C), guanosine (G), 5-methyl-cytidine (5MC) ในแต่ละตัวอย่างทดสอบด้วยเทคนิค HPLC พบระดับ DNA methylation โดยรวมในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ แต่ละสายพันธุ์มีระดับที่แตกต่างกันทั้งใน passage ที่ 8 และ passage สุดท้ายที่เพาะเลี้ยงได้โดยมีค่าเฉลี่ยของระดับ DNA methylation โดยรวมอยู่ที่ 9.38 ± 4.4 และ 8.9 ± 3.01 ตามลำดับ ซึ่งผลการตรวจสอบแสดงใน ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 7

ตารางที่ 3 ตารางแสดงผลระดับ 5mC จากการตรวจวัด ด้วยเทคนิค HPLC โดยผลคิดเป็นร้อยละต่อจำนวน cytidine (C) ทั้งหมด บนสาย DNA ที่ทำการศึกษาในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ passage ที่ 8 และ passage สุดท้ายที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละสายพันธุ์

Sample	passage 8	Last passage
T4	12.36952264	4.017464641
T7	10.22285905	13.15437214
T8	3.458480719	7.935369573
T9	13.15246955	6.137608282
T10	8.768757992	12.55181037
T11	8.543125524	9.607421261
T12	9.94527914	11.2088852
T21	15.89770428	7.638851495
2F	2.115138465	7.786043091

ภาพที่ 7 ภาพผลการตรวจสอบระดับ 5-methylcytosine (5mC) ที่วิเคราะห์ได้ในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ
เปรียบเทียบกันระหว่างใน passage ต้น และ passage สุดท้ายที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละสายพันธุ์



3.4 ผลการทดลองช่วงที่ 4 (19-24 เดือน)

3.4.1 การจัดเตรียมระบบการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

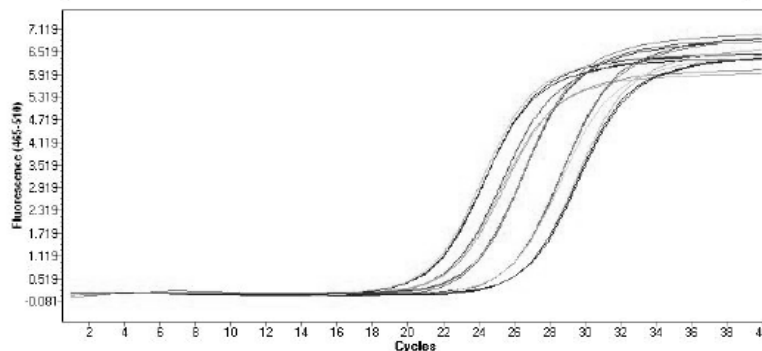
เมื่อภายหลังการสกัด RNA แล้ว ทำการเปลี่ยนแปลง RNA เป็น cDNA และจัดหา primer สำหรับการทดสอบหาปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยการทดสอบเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค real time PCR โดยรายละเอียดของ primer ที่ใช้ได้รายงานใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียด ของ primers ที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณการแสดงออกของยีนฝังจำ

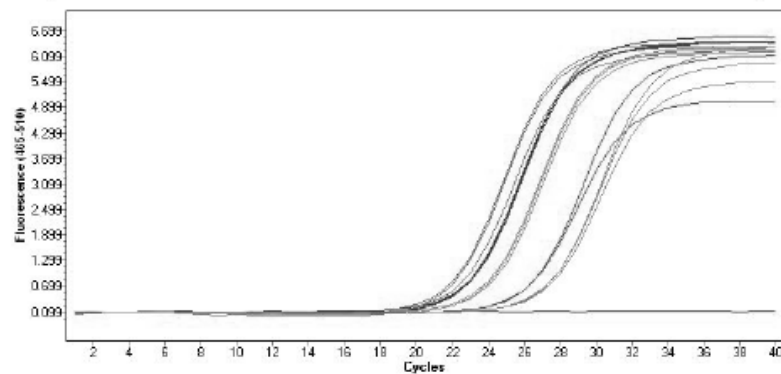
GENES	Forward primers	Reverse primers	Tm
IGF2	5'- CACGCCAAACACTGAATGTC -3'	5'- ATTGGGATTGCAAGCGTTAC -3'	84
MEST	5'- AACCAGCATACCTTACTCTGC -3'	5'- AGAATTGGTCTTCCCAGCTAA -3'	78
SNRPN	5'- CTCTTTGAAGCTTCTGCCCA -3'	5'- GCTGTTCCACCAAATCCAAT -3'	80
Beta-ACTIN	5'- ATGTGGCCGAGGACTTTGATT -3'	5'- ATGTGGCCGAGGACTTTGATT -3'	78

3.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ primers ด้วยการทำ primer validation

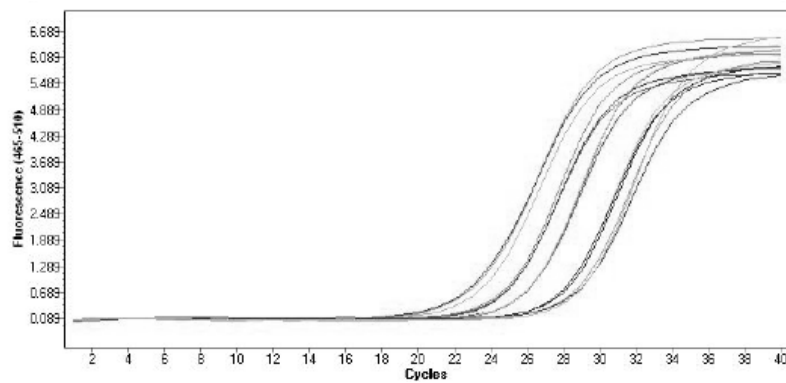
ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน ทั้ง 4 ยีน โดยใช้ตัวอย่างทดสอบชนิดเดียวกันในระดับความเข้มข้นต่างกันที่ 20ng, 10ng, 5ng, 1ng, 0.5ng ดังแสดงผลในภาพที่ 8 (A), (B) (C) และ (D)



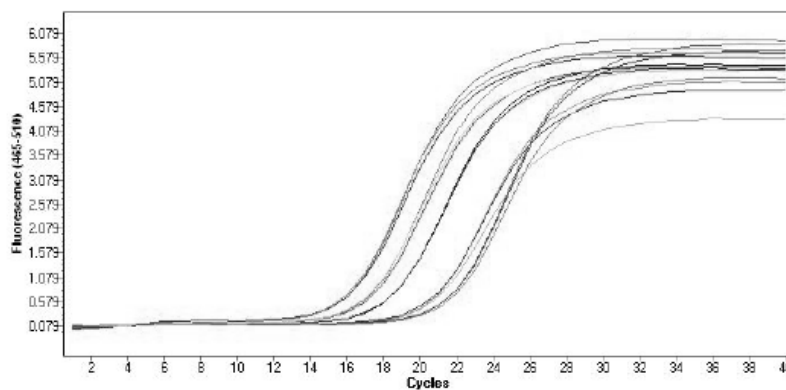
ภาพ 8(A) ภาพแสดงผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ primers ของยีน IGF2 ด้วยการทำ primer validation



ภาพ 8(B) ภาพแสดงผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ primers ของยีน MEST ด้วยการทำให้ primer validation



ภาพ 8(C) ภาพแสดงผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ primers ของยีน SNRPN ด้วยการทำให้ primer validation



ภาพ 8(D) ภาพแสดงผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ primers ของ β -actin ด้วยการทำให้ primer validation

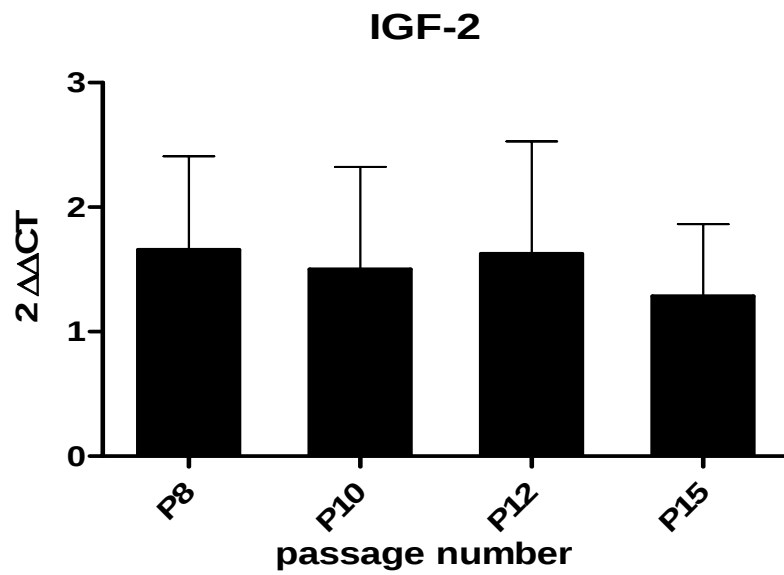
3.4.3. การศึกษาอัตราการแสดงออกของ *imprinted genes* ในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนฝังจำในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำระหว่างที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่ายีนฝังจำทั้ง 3 ยีน ได้แก่ ยีน *MEST*, *IGF2* และ *SNRPN* มีระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในระหว่างการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย โดยรายละเอียดระดับการแสดงออกของยีนได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 5, 6 และ 7 โดยพบว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ *IGF2* มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *IGF2* ในปริมาณที่สูง มีความสัมพันธ์กับการที่เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวเร็วในระหว่างการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ *IGF2*

Sample	Passage 8	Passage 10	Passage 12	Passage 15
T4	1.25	1.24	0.76	0.871
T7	2.33	1.48	2.06	1.48
T8	0.98	0.939	-	-
T9	2.3	2.28	2.42	1.36
T10	1.52	1.76	1.1	0.841
T11	1.81	1.45	1.37	0.483
T12	1.26	0.533	1.33	1.27
T21	2.35	2.47	3.17	1.79
6A	0.852	0.923	0.978	0.424
2F	2.94	2.72	2.33	2.25

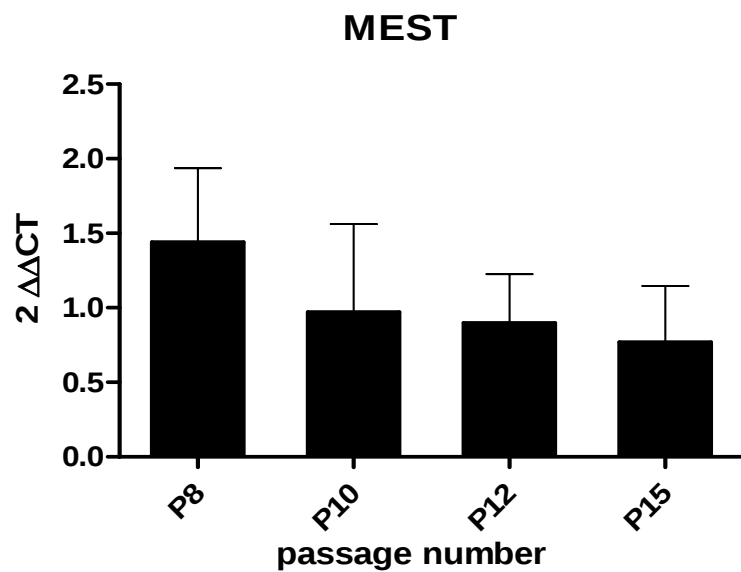
ภาพที่ 9 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนฝั่จ้ IGF2 ระหว่างการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย



ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนฝั่งจำ MEST

Sample	Passage 8	Passage 10	Passage 12	Passage 15
T4	0.656	1.4	0.732	0.315
T7	1.987	1.61	0.797	0.796
T8	0.856	1.32	-	-
T9	1.36	1.84	0.418	0.428
T10	1.35	0.432	0.598	0.431
T11	1.75	1.68	1.52	1.62
T12	1.95	0.417	1.07	0.914
T21	1.07	0.996	0.978	1.44
6A	1.46	0.426	1.17	1.07
2F	2.23	0.972	1.43	0.765

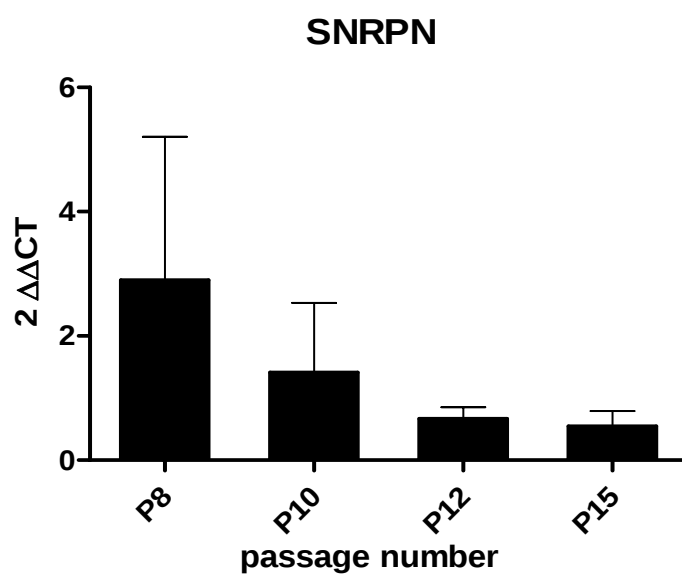
ภาพที่ 10 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนฝั่งจำ MEST ระหว่างการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย



ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ SNRPN

Sample	Passage 8	Passage 10	Passage 12	Passage 15
T4	0.976	2.92	0.917	0.458
T7	0.893	2.86	0.468	0.888
T8	0.913	1.49	-	-
T9	1.25	2.74	0.458	0.496
T10	5.82	0.422	0.467	0.468
T11	6.79	2.32	0.321	0.275
T12	5.85	0.45	0.819	0.647
T21	1.87	0.452	0.644	0.199
6A	3.69	0.777	0.713	0.588
2F	3.12	0.601	0.836	0.274

ภาพที่ 11 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนฝังจำ SNRPN ระหว่างการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย



4. บทวิจารณ์

จากการที่ระบบกลไก Epigenetic นี้ประกอบไปด้วยกลไกย่อยภายใน หลายชนิด โดยมีกลไกที่เป็นหลัก ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation), การเติมหมู่เคมีบนโปรตีนฮิสโตน Histone modification และ Chromatin remodeling ดังนั้น การเกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำงานของระบบด้วยเหตุผลใดๆก็ตาม จึงส่งผลกระทบต่อคุณภาพ คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด นอกจากนี้ระบบ Epigenetic ยังเป็นระบบที่มีความไว (Sensitive) ต่อการเหนี่ยวนำหรือเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการในเวลานานๆ ก็อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ Epigenetic เกิดการเปลี่ยนแปลง และนำไปสู่การสูญเสียคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการเลือกศึกษาระบบ Epigenetic ผ่านการศึกษากลไกย่อยของการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) โดยรวมในเซลล์ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวแทนของ Epigenetic ทั้งระบบ เนื่องจากพบว่า การทำงานของกลไก DNA methylation มีความสัมพันธ์และทำงานร่วมกันกับกลไกอื่นๆในระบบ Epigenetic ซึ่งจากผลการศึกษา ระดับ DNA methylation โดยรวมแม้จะไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงระดับ methylation แต่พบว่าจากการศึกษานี้ พบการเปลี่ยนแปลงของระบบ DNA methylation โดยรวมในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ จากการศึกษาเปรียบเทียบทั้งใน เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ ใน 2 subculture passage คือ passage ต้นและปลายจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation โดยรวมนั้นมีทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ชัดเจนซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดขึ้นจากการที่ DNA methylation เป็นพื้นฐานของกลไกหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป บางยีนมีส่วนช่วยในการคงสภาพ pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดและบางยีนเกี่ยวข้องกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆในร่างกาย ในขณะที่บางยีนก็ทำหน้าที่อื่นที่แตกต่างออกไป

ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อเนื่องเพื่อให้เกิดความเข้าใจที่ชัดเจนมากขึ้น โดยการทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลไกยีนฝ่งจำ ซึ่งกลไกนี้จะใช้การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) เป็นพื้นฐานการทำงาน และเนื่องจากยีนฝ่งจำส่วนใหญ่เกี่ยวกับการควบคุมการพัฒนาและการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ มียีนฝ่งจำที่นำมาใช้ศึกษาทั้งสิ้น 3 ยีน ได้แก่ Insulin-like growth factor type 2 (IGF2), Mesoderm-specific transcription (MEST), และ Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (SNRPN) โดย ยีน IGF2 เป็นยีนฝ่งจำในมนุษย์ ที่มีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ทำให้คาดว่าเซลล์อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ ยีน MEST พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิด

growth retardation และยีน SNRPN เป็นยีนฝังจำชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Pre-RNA processing ทั้งสามยีนฝังจำนี้ จึงมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งตัวของเซลล์ โดยจากผลการศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดนี้ พบว่า ยีนทั้งสามมีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ในระหว่างที่เซลล์ต้นกำเนิดเพาะเลี้ยงอยู่ภายนอกร่างกาย ผลที่ได้รับนี้เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ DNA methylation โดยรวม และจากผลการวิเคราะห์ถึงรูปแบบการแสดงออกของยีนฝังจำทั้งสามชนิดที่ได้ พบว่าการที่ยีนทั้งสามชนิดนี้มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่ลดลงเรื่อยๆ ตลอดการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องใน passage ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีความสอดคล้องกับความสามารถในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำด้วย จะเห็นได้ว่าในระยะแรก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการแสดงออกของยีนฝังจำทั้งสามชนิดในปริมาณที่สูงนั้น เซลล์จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่เร็วกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในระยะหลังที่เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวที่ช้าลงและหยุดการแบ่งตัวในที่สุด แต่เมื่อในระยะหลังระดับการแสดงออกของยีนฝังจำทั้งสามชนิดมีปริมาณที่ลดลงและเกี่ยวเนื่องกับการแบ่งตัวและการสร้างโปรตีนเพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด

นอกจากการศึกษาวิจัยนี้จะแสดงออกถึงระดับและรูปแบบการแสดงออกของยีนฝังจำที่มีความเกี่ยวเนื่องกับการพัฒนาและการแบ่งตัวของเซลล์แล้ว การศึกษานี้พบผลการทดลองที่น่าสนใจในระดับการแสดงออกของยีน IGF2 มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำในทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน IGF2 ในระดับที่สูงในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำระยะต้นจะสัมพันธ์กับความสามารถของเซลล์ที่จะสามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการในระยะเวลาอันยาวนานและมีอัตราในการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วรวมถึงจำนวน passage ที่มากกว่าในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการ โดยที่เซลล์ยังสามารถคงคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ได้ จากการตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 2F, T7, T9 และ T21 ที่มีระดับการแสดงออกของยีน IGF2 ที่สูงนั้นพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้ยาวนานและมีอัตราการแบ่งเซลล์ที่ดีกว่าในสายพันธุ์อื่นๆที่มีระดับการแสดงออกของ IGF2 ต่ำกว่า จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ว่า ระดับการแสดงออกของยีน IGF2 อาจจะถูกใช้เป็น marker สำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากหลาย clonal AFS line ที่ผลิตได้ นอกจากนี้ ยีนฝังจำเหล่านี้อาจจะใช้เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญสำหรับศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดอื่นที่มีศักยภาพการแบ่งตัวต่ำ

การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำเพื่อใช้ในการศึกษานี้ เตรียมโดยการสร้าง Clonal stem cell line คือ การสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำจากเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำเพียง 1 เซลล์ โดยอ้างอิง

จากการศึกษาของ Atala และคณะ ในปี 2007 ที่ใช้วิธีการนี้ทำให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่มีความบริสุทธิ์(purity) สูงมาก เหมาะแก่การนำไปใช้ได้จริง เพราะเนื่องจากเซลล์ในน้ำคร่ำนั้น คาดว่าได้มาจากเซลล์ที่หลุดออกมาจากทารกในครรภ์ในช่วง 1-3 เดือนแรกของการตั้งครรภ์ ดังนั้นเซลล์ที่ได้จากน้ำคร่ำจึงมีลักษณะเป็น Heterogenous population คือ มีเซลล์หลายชนิดปะปนกันอยู่ ดังนั้น หากทำการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ ในลักษณะ Clonal stem cell line จะทำให้เซลล์ที่ได้มี purity สูง จะเป็นประโยชน์และง่ายต่อการนำไปใช้พัฒนาต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม การสร้าง Clonal stem cell line จากเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำเซลล์เดียว ใน passage 0 จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ให้ได้จำนวนเพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อใช้ในการสกัด DNA, สกัด RNA, ตรวจสอบคุณสมบัติเซลล์ด้วย Flow cytometry ใน passage เดียวกันของการทดลอง ทำให้ passage แรกที่ใช้ในการศึกษา จึงใช้ passage ที่ 8 เป็น early stage study ซึ่งหากการศึกษาให้ผลที่เป็นแนวทางชัดเจนแล้ว ในการศึกษาต่อไปซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เซลล์ที่ passage เดียวกันทั้งหมด ก็จะสามารถจัดหาเซลล์ใน passage ที่อ่อนกว่านี้ เป็น passage แรกของการศึกษาได้

5. หนังสืออ้างอิง

1. Meshorer, E. and Misteli, T. 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature Review* 7: 540-6.
2. Constantinescu, D., Gray, H. L., Sammak, P. J., Schatten, G. P. & Csoka, A. B. 2005. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell* 24: 177-85.
3. Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C. D. Histone and chromatin cross-talk. 2003. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 172-83.
4. Hsieh, C. L. Dynamics of DNA methylation pattern. 2000. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 224-8.
5. Lee, J. H., Hart, S. R., Skalnik, D. G. 2004. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* 38: 32-8.
6. Marshall, W. F. Gene expression and nuclear architecture during development and differentiation. 2003. *Mech. Dev.* 120: 1217-30.
7. Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F. R., Gasser, S. M. 2004. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* 38: 305-45.
8. Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3: 662-73.
9. Nan, X. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-9.
10. Jones, P. L. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet.* 19: 187-91.
11. Zhang, Y. *et al.* 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes. Dev.* 13: 1924-35.
12. Wade, P. A. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature Genet.* 23: 62-6.
13. Ng, H. H. 1999 MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genet.* 23: 58-61.
14. Feng, Q., Zhang, Y. 2001. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev.* 15: 827-32.

15. Yang, L., Chavatte-Palmer, P., Kubota, C., O'Neill, M., Hoagland, T., Renard, J.P., Taneja, M., Yang, X., Tian X.C. 2005. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol. Reprod. Dev.* 7: 431-8.
16. Bartolomei, M.S., Tilghman, S.M. 1997. Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31: 493-525.
17. Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., Tilghman, S.M. 1990. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell Biol.* 10: 28-36.
18. Bartolomei, M.S., Zeme, S., Tilghman, S.M. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351: 153-5.
19. Barlow, D.P., Stoger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., Schweifer, N. 1991. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349: 84- 7.
20. Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., Stewart, C.L. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and 380 perinatal lethality. *Genes. Dev.* 8: 2953- 63.
21. Wang, Z.Q., Fung, M.R., Barlow, D.P., Wagner, E.F. 1994. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. *Nature* 372: 464- 7.
22. Hall, J.G. 1990. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 857- 73.
23. Moore, T., Haig, D. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* 7: 45- 9.
24. Jaenisch, R. 1997. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 13: 323- 9.
25. Young, L.E., Fairburn, H.R. 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible role of 435 genomic imprinting. *Theriogenology* 53: 627-48.
26. Reik, W. 1989. Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet.* 5: 331- 6.
27. Reik, W., Constancia, M. 1997. Genomic imprinting. Making sense or antisense? *Nature* 389: 669- 71.
28. Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E.S., Golub T.R., Jaenisch, R. 2002. Abnormal gene expression in cloned mice derived

- from 340 embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 12889-94.
29. Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., Ogura, A. 2002. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295: 297.
 30. Ogawa, H., Ono, Y., Shimosawa, N., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hiura, H., Ito, M., Kono, T. 2003. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction* 126: 549- 57.
 31. Yamazaki, Y., Mann, M.R., Lee, S.S., Marh, J., McCarrey, J.R., Yanagimachi, R., Bartolomei, M.S. 2003. Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 12207- 12.
 32. Xue, F., Tian, X.C., Du, F., Kubota, C., Taneja, M., Dinnyes, A., Dai, Y., Levine, H., Pereira, L.V., Yang, X. 2002. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat. Genet.* 31: 216- 20.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

***อยู่ในระหว่างการจัดเตรียม manuscript 1 เรื่อง คือ

Title : gene imprinting patterns in Amniotic fluid stem cell among in vitro culture

วางแผนจะ Submit to Biology of Reproduction (journal impact factor 3.4 (2008) in December 2009

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เจริญนโยบาย และ เจริญสาธารณะ เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับรื้อสายพันธุ์หรือวิธีทำงาน)

***จากผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการนำมาปรับใช้ในการแก้ไขปัญหาการเลือกเก็บสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่มีคุณภาพไม่เหมาะสม ซึ่งขณะนี้ได้นำมาทดลองใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำที่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลแล้ว ซึ่งพบว่าเป็นผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย และเพิ่มโอกาสสำเร็จในการทำงานด้านเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำมากขึ้น คาดว่าจะสามารถขยายผลเผยแพร่งานวิจัยนี้ให้เป็นประโยชน์ต่อไปได้ เนื่องจากในกระบวนการโดยทั่วไปของการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำจากเซลล์เดี่ยว (clonal stem cell line) นั้น จะสามารถจัดเก็บสายพันธุ์ได้เป็นร้อยสายพันธุ์จากตัวอย่างเพียงตัวอย่างเดียว ดังนั้น จำเป็นต้องทำการคัดเลือกเพื่อเก็บเฉพาะสายพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ก่อนที่จะทิ้งสายพันธุ์ที่เหลือไป โดยการคัดเลือกจะดูจากรูปร่างลักษณะของเซลล์และลักษณะการแบ่งตัว ที่ผ่านมายังไม่มีตัวชี้วัดที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามบ่อยครั้งที่พบว่า สายพันธุ์ที่เลือกไว้สามารถเจริญได้ดีเพียงในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมาจะมีอัตราการโตที่ช้าลงและเพาะเลี้ยงได้ในช่วงสั้นๆ แต่ในบางกรณีพบว่าสายพันธุ์ที่เลือกไว้สามารถเจริญได้ดี มีอัตราการโตที่รวดเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ในระยะยาวนานและเซลล์ที่ได้มีคุณภาพดี โดยจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับยีนฝังบ่งชี้จะเป็นประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาการขาดตัวชี้วัดได้

- เจริญวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

***ผลงานวิจัยที่ได้ในการศึกษายีนฝังบ่งชี้ ทั้ง 3 ชนิด จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาค้นคว้าหาวิธีการแก้ไขปัญหาคำถามไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการของเซลล์ต้นกำเนิดบางชนิดต่อไป

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
- ***ได้ทำการยื่นขอจดสิทธิบัตรร่วมในนามของ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล เรื่อง กรรมวิธี การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำโดยวิธีการใช้เซลล์เริ่มต้น (Starter cell method for amniotic fluid stem cell isolation) ซึ่งขณะนี้ได้ยื่นเรื่องขอดำเนินการแล้ว ตั้งแต่วันที่ 25 กันยายน 2552 เลขที่คำขอ 0901004343

ภาคผนวก