การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือด้วยอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ซีรัมจากเลือดสายสะดือ

ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์[1] ศศิประภา ทองบพิตร[1] สุภักดี จุลวิจิตรพงษ์[1] เพียงใจ วิชัยดิษฐ[2] ภัสรา หากุหลาบ[2] และ ทัศนีย์ เพิ่มไทย[1]

[1]หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

[2]งานการพยาบาลสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ฝ่ายการพยาบาล ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

บทคัดย่อ ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัวชนิดพิเศษสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเท่านั้น การใช้ซีรัมเชิงพาณิชย์จากมนุษย์มีรายงานถึงความสำเร็จได้น้อย อย่างไรก็ตามจากการวิจัยก่อนหน้าได้กล่าวถึงความสำเร็จในการใช้ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์มาใช้สร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำได้สำเร็จ ทำให้เกิดสมมติฐานว่าซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์อาจนำมาใช้ทดแทนซีรัมจากลูกวัวได้ การศึกษานี้นำซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์ที่ผลิตขึ้น มาใช้เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือจำนวน 49 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว ผลการศึกษาพบว่าซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์สามารถนำมาสร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือได้ โดยเซลล์ที่ได้มีรูปร่างและลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไม่แตกต่างกัน มีการแสดงออกของ CD29, CD73, CD90 และ CD105 ไม่พบการแสดงออกของ CD34 และ CD45 นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกได้ โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์สามารถใช้แทนซีรัมจากลูกวัวสำหรับสร้างและเพาะเลี้ยงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือได้

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือ, ซีรัมจากลูกวัวชนิดพิเศษสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน, ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์

Corresponding author E-mail: stemcells_siriraj@yahoo.com

Received: 13 March 2020 *Revised: 20 September 2020* *Accepted: 23 February 2021*

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากเซลล์ร่างกายทั่วไป 2 ประการ คือ สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ที่ได้ยังคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นความหวังที่จะนำไปปลูกถ่ายให้แก่ผู้ป่วยเพื่อการรักษาโรคในปัจจุบันที่ยังทำการรักษาได้ไม่หายขาด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์คินสัน โรคเบาหวาน และการบาดเจ็บของไขสันหลัง[1, 2, 3, 4, 5] โดยโรคที่ทางแพทยสภาได้ออกข้อกำหนดให้สามารถปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดให้แก่คนไข้เพื่อทำการรักษาโรคได้ คือ โรคทางโลหิตวิทยา เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และโรคธาลัสซีเมีย ส่วนการรักษาในโรคอื่น ๆ ถือว่ายังอยู่ในขอบข่ายงานวิจัย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การศึกษาด้านเซลล์ต้นกำเนิดได้รับความสนใจในวงกว้างอย่างรวดเร็ว

ในปี ค.ศ.1988 ได้มีการปลูกถ่ายเลือดสายสะดือของพี่สาวที่มีความเข้ากันของระบบภูมิคุ้มกันไปสู่น้องชายที่เป็นโรค Fanconi anemia ได้สำเร็จ และยังคงใช้ชีวิตได้ตามปกติจนถึงปัจจุบัน[6, 7] จากรายงานฉบับนี้ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเลือดสายสะดือเป็นจำนวนมาก และได้มีกลุ่มผู้จัดตั้งธนาคารเลือดสายสะดือขึ้นในหลายประเทศ ซึ่งมีการค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน คือ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) และ endothelial progenitor cell[8, 9, 10, 11] ข้อดีของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือคือ สามารถฟื้นฟูระบบของเซลล์เม็ดเลือด เก็บได้ง่าย และเมื่อนำไปปลูกถ่ายให้แก่ผู้ป่วยแล้วไม่พบปัญหาเกี่ยวกับระบบภูมิต้านทานเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก[8, 12] โดยมีรายงานว่าสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือไปปลูกถ่ายในผู้ป่วยได้เป็นผลสำเร็จและอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในช่วงเวลา 3 ปี ใกล้เคียงกับผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก[13] อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือยังมีข้อจำกัดด้านปริมาณเซลล์ที่ได้[14, 15] ซึ่งเมื่อนำไปปลูกถ่ายในผู้ป่วยเด็กที่มีน้ำหนักน้อยจะได้ผลดีกว่าในผู้ป่วยเด็กที่มีน้ำหนักมากกว่า เนื่องจากจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ปลูกถ่ายต้องมีความเหมาะสมกับน้ำหนักตัวของผู้ได้รับการปลูกถ่าย[7] จึงเป็นเหตุให้ต้องมีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนก่อนนำไปใช้ในการปลูกถ่าย

ในปัจจุบันได้มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและเมื่อนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติด้วยโปรตีนจำเพาะ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ คือ CD29, CD44, CD73, CD90 และ CD105 และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น เซลล์ไขมัน, เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน[9, 12, 15] โดยปกติในขั้นตอนการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดยังจำเป็นต้องใช้แหล่งโปรตีนจากซีรัมสัตว์ที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์โดยเฉพาะซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum: FBS) เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดไม่ดี[16, 17, 18] และอาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อไวรัส (virus transmission) บางชนิดจากสัตว์สู่คนได้[19, 20, 21] และตามที่เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือของมนุษย์อยู่ในระบบการไหลเวียนของเลือด ซึ่งจะได้รับโปรตีนจากซีรัมของมนุษย์ในกระแสเลือด จากรายงานก่อนหน้าที่แสดงถึงความสำเร็จของการใช้ซีรัมจากเลือดสายสะดือมาใช้สร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดต่าง ๆ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ, จาก Wharton's jelly, จากผนังมดลูกชั้นใน และจากเยื่อบุผนังมดลูกชั้นใน[17, 18, 22, 23] โดยสายพันธุ์ที่ได้มีลักษณะและรูปร่างไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นร่างกายจำเพาะก็ไม่แตกต่างกัน แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ดังนั้นถ้าทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากเลือดสายสะดือมนุษย์ด้วยซีรัมจากเลือดสายสะดือเอง อาจทำให้เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งตัวได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัวและเป็นผลดีต่อการนำมาใช้รักษาผู้ป่วยในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การเก็บเลือดสายสะดือ

ทำการเก็บเลือดสายสะดือของทารกแรกคลอดจากห้องคลอดหรือห้องผ่าตัดของโรงพยาบาลศิริราชจำนวน 49 ตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างละ 50–100 มิลลิลิตร โดยหญิงตั้งครรภ์ที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการต้องผ่านการตรวจร่างกายตามระเบียบการฝากครรภ์ และแสดงความยินยอมลงนามในเอกสารที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ตามหมายเลข Si025/2012 ซึ่งตัวอย่างเลือดต้องมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการว่าปลอดเชื้อ Syphilis, Hepatitis B, Hepatitis C และ HIV type I/II โดยการเก็บเลือดสายสะดือนั้นจะทำการเก็บในถุงเก็บเลือดปลอดเชื้อของสภากาชาดไทย ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด Heparin ในความเข้มข้น Heparin 0.1 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง หลังจากการเก็บเลือดสายสะดือ

การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ

นำเลือดสายสะดือที่ได้มาปั่นที่ 1,800x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Heraeus Labofuge 400R centrifuge, Thermo Scientific, USA) เมื่อครบเวลาให้เก็บส่วนของ buffy coat มาผสมกับ phosphate buffered saline ที่มีส่วนผสมของ 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA; Sigma-Aldrich, USA) ในอัตราส่วน buffy coat 1 มิลลิลิตรต่อสารละลาย PBS/EDTA 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว overlay ลงบนสารละลาย ficoll (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare, Sweden) ในอัตราส่วนของสาร ficoll 3 มิลลิลิตรต่อ buffy coat ที่ผสมด้วย PBS/EDTA 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 1,000x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บส่วนของ mononuclear cells ใส่หลอดทดลองใหม่ ล้างด้วย PBS/EDTA 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งต้องนำไปปั่นที่ 400x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เมื่อทำครบ 3 ครั้งแล้วให้เก็บตะกอนเซลล์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีการเคลือบด้วย 10 ng/ml fibronectin ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบของ Dulbecco's modified Eagle's Medium ชนิด low glucose (DMEM-LG; Gibco, Invitrogen, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Millipore, Billerica, USA) และ 10% ES-FBS (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) หรือ hUCS ที่ได้แยกตามวิธีการของ Phermthai T[23] โดยนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จึงทำการ subculture ด้วย 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) และนำเซลล์ลงเลี้ยงในภาชนะที่ไม่มีการเคลือบด้วย fibronectin สู่ passage ต่อไป

การตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (population doubling time; PDT)

นับเซลล์ด้วย hemocytometer ภายหลังจากการ subculture ในทุก passage และคำนวณหาระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามสูตร

$$PDT = t \times \log 2/(\log NH - \log NI)$$

NI คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น
NH คือ จำนวนเซลล์เมื่อทำการเก็บ
t คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ (วัน)

ซึ่งจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดจะถูกนำมาคำนวณหาค่า PDT ทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง

การตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ passage ที่ 4 จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารแต่ละชนิดมาตรวจสอบคุณสมบัติจำเพาะ ด้วยวิธี flow cytometry โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD29, CD73, CD90 และ CD105 (eBioscience, Sadiego, USA) และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 (Becton Dickinson, USA) บ่ม 15 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ตรึงเซลล์ด้วย 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CELL Quest (Becton Dickinson)

การแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ (cryopreservation)

ทำการแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในน้ำยาแช่แข็ง (freezing medium) 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG, 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) และ 40% ES-FBS หรือ hUCS แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ก่อนนำไปเก็บรักษาเซลล์ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน เมื่อครบกำหนดให้นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใส่ลงในอาหารที่มีส่วนประกอบของ DMEM-LG และ 10% ES-FBS หรือ hUCS ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำไปปั่นและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ลงเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด โดยตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิต (%cell viability) ด้วยการย้อมด้วย trypan blue (Sigma-Aldrich) ซึ่งเซลล์ที่ไม่ติดสี คือ เซลล์เป็น ส่วนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน คือ เซลล์ตาย และนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\%\text{cell viability} = (\text{จำนวนเซลล์เป็น}/\text{จำนวนเซลล์เป็น} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}) \times 100$$

การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย (differentiation)

1. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ความหนาแน่น 1×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนเป็นน้ำยาเหนี่ยวนำสำหรับเซลล์ไขมันซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG (Gibco), 10% ES-FBS, 1 µM dexamethasone, 5 µM insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine และ 60 µM indomethacin (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 10% formalin (Sigma-Aldrich) และทำการย้อมสีด้วย Oil Red O (Sigma-Aldrich) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างเม็ดไขมันของเซลล์ โดยจะย้อมติดสีแดงบนเม็ดไขมัน

2. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ความหนาแน่น 1×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณร้อยละ 50-70 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนเป็นน้ำยาเหนี่ยวนำสำหรับเซลล์กระดูกซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG (Gibco), 10% ES-FBS, 0.1 µM dexamethasone, 10 mM glycerol-2-phosphate disodium salt hydrate และ 50 µM ascorbic acid (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 10% neutral buffered formalin และทำการย้อมสีด้วย Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) เพื่อตรวจสอบความสามารถของเซลล์ในการสร้างเอนไซม์ ซึ่งจะติดสีน้ำตาลดำบนเซลล์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และใช้ Student's t test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า PDT ในแต่ละ passage เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA) ซึ่งค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

การเก็บเลือดสายสะดือ

จากการเก็บเลือดสายสะดือของทารกแรกคลอดทั้งหมด 49 ตัวอย่าง พบว่าอายุครรภ์ของมารดาตั้งครรภ์ปกติที่เข้าร่วมโครงการมีอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 35–40 สัปดาห์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 38.3 ± 1.3 สัปดาห์ โดยมีค่ามัธยฐาน 39 สัปดาห์ ส่วนปริมาณของเลือดสายสะดือที่เก็บได้อยู่ระหว่าง 22–134 มิลลิลิตร คิดเป็นค่าเฉลี่ย 60.3 ± 26 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามัธยฐาน 56 มิลลิลิตร

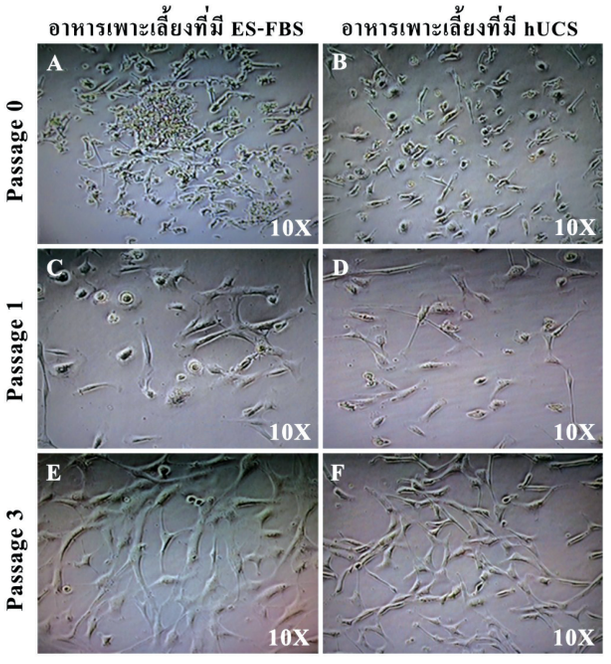
การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ

ภายหลัง 3 วันแรก ของการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่แยกได้มีลักษณะการกระจายตัวบนพื้นภาชนะเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวจะอยู่กันเป็นโคโลนีเป็นส่วนใหญ่ เซลล์ที่ได้มีลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสต์ พบเซลล์มีลักษณะกลมคล้ายเซลล์เม็ดเลือดปะปนอยู่ และกระจายทั่วพื้นภาชนะ ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือนั้น เซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่แบบกระจายทั่วพื้นภาชนะ ไม่เป็นโคโลนี ซึ่งเซลล์ที่พบมีรูปร่างลักษณะคล้ายไฟโบรบลาสต์อยู่ปะปนกับเซลล์กลม และพบว่าขนาดของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ดังแสดงในภาพที่ 1A และ 1B ซึ่งในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือนี้ไม่สามารถทำได้สำเร็จในทุกตัวอย่าง โดยได้แสดงผลร้อยละความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) ในแต่ละ passage จำนวน 49 ตัวอย่าง

passage	ซีรัมจากลูกวัว		ซีรัมจากเลือดสายสะดือ	
	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละความสำเร็จ	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละความสำเร็จ
0	49	100	49	100
1	21	42.86	20	40.82
2	6	12.24	6	12.24
3	3	6.12	5	10.2
4	2	4.08	3	6.12
5–10	2	4.08	2	4.08

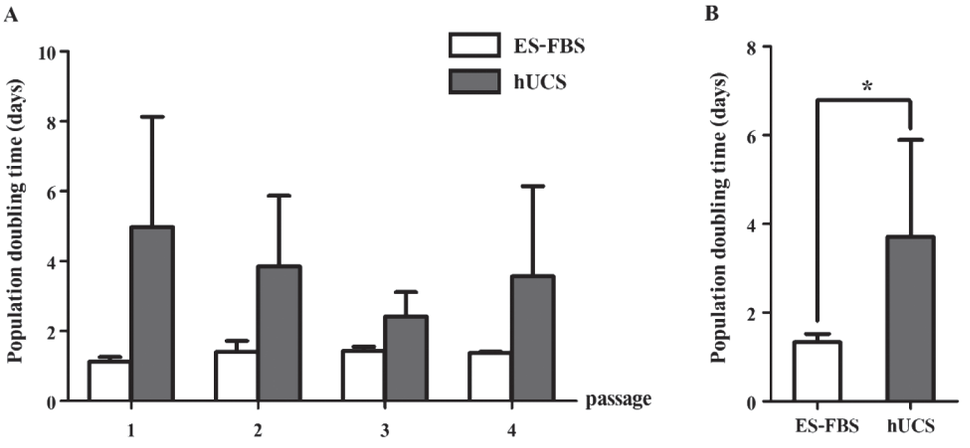
ระหว่างการเพาะเลี้ยงสังเกตได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิด ในช่วงระยะ passage 0-1 มีเซลล์รูปร่างหลายแบบปะปนกัน ดังแสดงในภาพที่ 1C และ 1D แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องจนถึง passage 2-3 พบว่าเซลล์ที่ได้มีเพียงลักษณะเดียว (homogeneous) คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ดังแสดงในภาพที่ 1E และ 1F



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) โดยจะเห็นว่าใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง พบเซลล์อยู่กันเป็นโคโลนีในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว (A) และอยู่กันแบบกระจายตัวในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง passage 1 พบว่าเซลล์มีการปะปนกันหลายรูปแบบ คือ มีแบบคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์และมีแบบเป็นเม็ดกลม ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (C, D) และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนถึง passage 3 จะพบว่าเซลล์ที่มีลักษณะเม็ดกลมจะหมดไป เหลือเพียงเฉพาะเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่านั้น ทั้งในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือ (E, F) (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนถึง passage ที่ 4 เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวเหลือเพียง 2 สายพันธุ์ และเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือเหลือเพียง 3 สายพันธุ์ โดยความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 4.08 และ 6.12 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการคำนวณหาค่า PDT ของเซลล์ที่ passage 1-4 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีศักยภาพในการแบ่งตัวที่สูง คือ มีค่า PDT ที่ต่ำกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ ดังแสดงในภาพที่ 2A และเมื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยของ PDT ในทุก passage ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีค่าเท่ากับ 1.33 ± 0.19 วัน (อยู่ระหว่าง 1.03-1.63 วัน) ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีค่าเท่ากับ 3.71 ± 2.18 วัน (อยู่ระหว่าง 1.37-7.19 วัน) จะเห็นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังแสดงในภาพที่ 2B โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเลี้ยงต่อได้ เนื่องจากเซลล์มีสภาวะเข้าสู่ senescence ที่ passage 4 จึงจำเป็นต้องคัดออกจากการทดลอง



ภาพที่ 2 ผลของระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, n = 2) และในซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, n=3) โดยแสดงค่าเป็น mean ± SD ของแต่ละ passage (A) และ ของ passage 1-4 (B)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

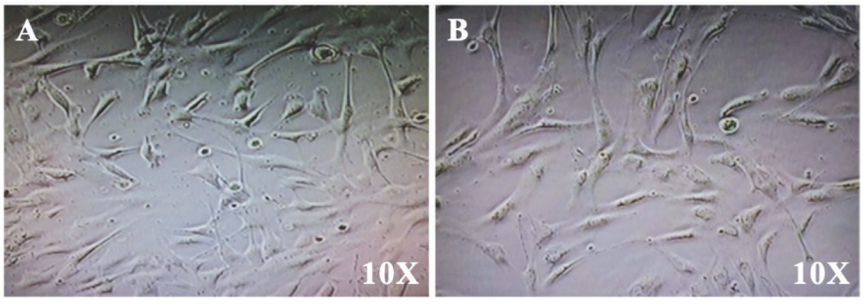
นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ passage ที่ 4 มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ โดยย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงทั้งในซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD29, CD73, CD90 และ CD105 และไม่มีการแสดงออกหรือแสดงออกในระดับที่ต่ำของโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 อย่างไรก็ตาม พบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ 1 สายพันธุ์ ที่มีการแสดงออกของ CD90 ในระดับที่ต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, n=2) และในซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, n=2) โดยแสดงค่าเป็น mean ± SD

โปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์	ซีรัมจากลูกวัว (%)	ซีรัมจากเลือดสายสะดือ (%)
CD29	94.46 ± 6.95	94.36 ± 2.42
CD34	4.27 ± 4.36	5.68 ± 7.5
CD45	0.92 ± 0.91	0.63 ± 0.01
CD73	99.47 ± 0.42	96.46 ± 0.76
CD90	99.85 ± 0.11	50.88 ± 67.76
CD105	99.83 ± 0.18	99.27 ± 0.89

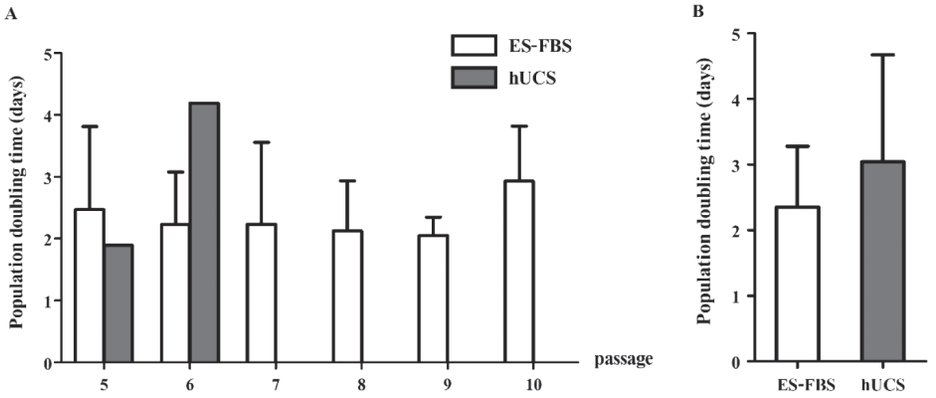
การตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ภายหลังจากการแช่แข็ง

ภายหลังจากการแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในน้ำยาที่มีซีรัมจากลูกวัว (n=2) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (n=2) เป็นเวลา 2 เดือน เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำมาละลาย และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue เพื่อคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แช่แข็งในซีรัมจากลูกวัวมีการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 95.4 ± 2 ส่วนเซลล์ที่แช่แข็งในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 94.5 ± 0.6 ภายหลังจากการนำเซลล์ต้นกำเนิดลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด พบว่าเซลล์ยังคงลักษณะไฟโบรบลาสต์ ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อเทียบกับเซลล์ก่อนการเก็บแช่แข็ง



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือภายหลังจากการเก็บแบบแช่แข็ง และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) (A) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) (B) ที่ passage 5 (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

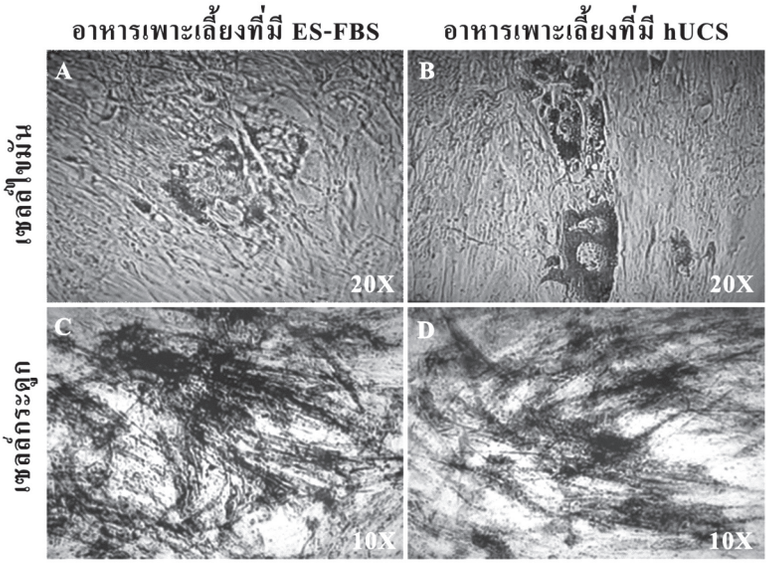
สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง passage 10 แต่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ถึงแค่ passage 7 และเซลล์จะเข้าสู่สภาวะ senescence ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ เซลล์เข้าสู่ senescence ตั้งแต่ passage 5 จึงจำเป็นต้องคัดสายพันธุ์นี้ออกจากการทดสอบ ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยของ PDT ในทุก passage (passage 5-10) ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีค่าเท่ากับ 2.34 ± 0.79 วัน (อยู่ระหว่าง 1.30-3.56 วัน, n=2) ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือที่ passage 5-6 มีค่าเฉลี่ยของ PDT เท่ากับ 3.04 ± 1.68 วัน (อยู่ระหว่าง 1.89-4.19 วัน, n=1) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, n = 2) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, n=1) โดยแสดงค่าเป็น mean ± SD ของแต่ละ passage (A) และของ passage 5-6 (B)

การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย (differentiation)

ผลการศึกษา พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกได้ โดยการตรวจสอบด้วยการย้อม Oil Red O และ alkaline phosphatase ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด สามารถสร้างเม็ดไขมันได้ โดยพบการติดสีแดงของ Oil Red O บนเม็ดไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 5A และ 5B และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ โดยพบการติดสีน้ำตาลดำของ alkaline phosphatase ดังแสดงในภาพที่ 5C และ 5D



ภาพที่ 5 ผลของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน พบการติดสี Oil Red O ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (A, B) (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า) และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก พบการติดสีของ alkaline phosphatase ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (C, D) (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

วิจารณ์

การศึกษานี้ ได้ทำการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือทั้งหมด 49 ตัวอย่าง โดยนำแต่ละตัวอย่างมาแบ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ซีรัมต่างชนิดกัน 2 ชนิด คือ ซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) ทำการเปรียบเทียบลักษณะการเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ลักษณะรูปร่างของเซลล์ อัตราความสำเร็จในการสร้างเป็นสายพันธุ์ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการแสดงออกถึงคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด โดยตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะชนิดต่าง ๆ ของเซลล์ต้นกำเนิด และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกาย

ผลการศึกษา พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือต้องขยายการศึกษาถึง 49 ตัวอย่าง เนื่องจากใน 10 ตัวอย่างแรก เมื่อใช้ซีรัมทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถแยกเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอย่างได้เลย แม้เซลล์ที่แยกได้จะสามารถลงเกาะพื้นผิวและเพาะเลี้ยงได้ แต่เพาะเลี้ยงต่อได้ไม่นานกว่า 15 วัน ใน passage 0 และไม่สามารถทำการ subculture เพื่อเลี้ยงต่อใน passage ที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่มีรายงานไว้โดย Musina และคณะ[24] ที่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือเพาะเลี้ยงได้ยากและมีโอกาสเพิ่มจำนวนได้ยาก แต่เนื่องจาก

มีรายงานผลงานวิจัยก่อนหน้าของ Shetty และคณะ[25] ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในเลือดสายสะดือสามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยซีรัมจากเลือดสายสะดือและสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง passage ที่ 3 คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองต่อโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างขึ้นจนถึง 49 ตัวอย่าง ซึ่งทำให้ประสบความสำเร็จในการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนถึง passage 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง

สำหรับการศึกษาลักษณะการเกาะพื้นผิวภาชนะและรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าหลังการปล่อยให้เซลล์เกาะบนพื้นภาชนะภายใน 3 วัน ใน passage 0 เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิดนี้ให้ผลลักษณะการเกาะบนพื้นภาชนะและการกระจายตัวของเซลล์ต่างกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายโคโลนีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (colony-forming unit fibroblast) ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้า[12, 24] ซึ่งรายงานการพบโคโลนีของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4-19 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการเกาะพื้นภาชนะในแบบกระจายตัวทั่วภาชนะเพาะเลี้ยง โดยไม่พบการสร้างเป็นโคโลนี แต่มีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Shetty และคณะ[25] ที่ได้รายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือไม่มีการสร้างโคโลนี แต่หากนับถึงปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อเทียบกับการใช้ซีรัมจากลูกวัวแล้วพบว่าจำนวนเซลล์ที่ได้ไม่ต่างกัน ซึ่งผลดังกล่าวก็เป็นไปในแนวเดียวกับในการศึกษานี้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสันนิษฐานเพิ่มเติมในเรื่องของการ migration ว่าในซีรัมจากเลือดสายสะดือที่นอกจากมี growth factor จำนวนมากที่ช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์แล้ว ยังมี cytokine ที่เหมาะสมกับการกระตุ้นการ migration หรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ด้วย ซึ่งอาจทำให้เซลล์กระจายตัวได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว[26, 27] อย่างไรก็ตามประเด็นข้อสันนิษฐานนี้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ส่วนลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวและในซีรัมจากเลือดสายสะดือพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยรูปร่างลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นแบบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขนาดเล็กและสามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่ไม่ดีนัก นอกจากนี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิดให้ผลใกล้เคียงกัน ในความสำเร็จของการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือพบว่าที่ passage 2 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงทั้งในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัวและในซีรัมจากเลือดสายสะดือสามารถสร้างได้ 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 49 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราความสำเร็จร้อยละ 12.24 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Musina และคณะ[24] ที่รายงานว่าการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือทำได้ยาก นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ได้แสดงถึงปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ต่อปริมาณเซลล์ของ mononuclear cells ที่แยกได้จากเลือดสายสะดือเป็น 0.05-2.8 cells ต่อ 10^6 เท่านั้น[28, 29, 30] จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือได้ยาก มีรายงานของ Yang และคณะ (2004), Shetty และคณะ (2010) และ Sibov และคณะ (2012)[31, 32, 33] ว่าการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือมีอัตราความสำเร็จเพียงร้อยละ 6 ถึงร้อยละ 20 และพบว่ามี 3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ 1) เลือดสายสะดือจากอายุครรภ์มารดาไม่ควรเกิน 37 สัปดาห์ 2) เลือดสายสะดือที่เก็บได้ต้องมีปริมาณมากกว่า 80 มิลลิลิตร และ 3) ระยะเวลาที่เก็บถึงกระบวนการแยกต้องไม่เกิน 6 ชั่วโมง[33] นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่อาจส่งผลต่อความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ คือ ปริมาณของ mononuclear cells ที่แยกได้ควรมีมากกว่า 1.28×10^8 cells ซึ่งพบความสำเร็จมากกว่าร้อยละ 70[34]

อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมต่างกันนี้มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารที่ใช้ซีรัมจากลูกวัวนั้น สามารถแบ่งตัวได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งตัวแตกต่างกันถึง 2.38 วัน จากผลการทดลองที่แสดงความแตกต่างกันนี้

สันนิษฐานว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ แม้จะมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์อยู่จริง แต่มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดค่อนข้างต่ำ ดังเห็นได้จากความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ไม่ดีนัก ทำให้จำเป็นต้องมีการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต[35] ดังนั้นการใช้ซีรัมจากลูกวัวซึ่งมีที่มาจากซีรัมตัวอ่อนอายุ 3 เดือน ในครรภ์แม่วัว[36] ซึ่งเป็นระยะที่มีโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตที่สูงเต็มที่[37] ในขณะที่ซีรัมจากเลือดสายสะดือที่ทำการเก็บในโครงการวิจัยนี้ถือเป็นซีรัมจากเด็กแรกเกิดที่อายุครรภ์ของมารดา 37-40 สัปดาห์ หรือ 9-10 เดือน ซึ่งแม้จะอุดมไปด้วยสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจำนวนมาก แต่ยังประกอบด้วยโปรตีนยับยั้งการเจริญเติบโตที่ช่วยสมดุลของแม่และเด็กที่ครบกำหนดคลอด[37] อาจเป็นสาเหตุที่ให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือเจริญได้ดีกว่าเมื่อมีซีรัมจากลูกวัว

ในด้านคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ โดยพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมทั้ง 2 ชนิด สามารถแสดงคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ CD29, CD73, CD90 และ CD105 และไม่แสดงโปรตีนจำเพาะของเซลล์เม็ดเลือด CD34 และ CD45 และการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกาย พบว่าเซลล์จากทั้ง 2 กลุ่มสามารถแสดงคุณสมบัติดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงและสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือเป็นส่วนประกอบ สรุปได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ไม่ต่างกัน และมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกายได้ไม่แตกต่างกัน ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์จึงสามารถใช้แทนซีรัมจากลูกวัวสำหรับสร้างและเพาะเลี้ยงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

1. Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. Mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. Eur Neurol 2020; 83: 235-41.
2. Nishida F, Zappa Villar MF, Zanuzzi CN, Sisti MS, Camiña AE, Reggiani PC, et al. Intracerebroventricular delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells as a promising therapy for repairing the spinal cord injury induced by Kainic acid. Stem Cell Rev Rep 2020; 16(1): 167-80.
3. Jin MC, Medress ZA, Azad TD, Doulames VM, Veeravagu A. Stem cell therapies for acute spinal cord injury in humans: a review. Neurosurg Focus 2019; 46(3): E10. (11 pages).
4. Zang L, Hao H, Liu J, Li Y, Han W, Mu Y. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. Diabetol Metab Syndr 2017; 9: 36. (11 pages).
5. Hu J, Wang Y, Gong H, Yu C, Guo C, Wang F, et al. Long term effect and safety of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 2 diabetes. Exp Ther Med 2016; 12(3): 1857-66.

6. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321(17): 1174-8.
7. Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. Cell Prolif 2011; 44(Suppl 1): 55-9.
8. Broxmeyer HE. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. In: StemBook. [online]. 2010; [cited 2020 Nov 9]: [13 screens]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44751/
9. Phuc PV, Ngoc VB, Lam DH, Tam NT, Viet PQ, Ngoc PK. Isolation of three important types of stem cells from the same samples of banked umbilical cord blood. Cell Tissue Bank 2012; 13(2): 341-51.
10. Vu N, Bui A, Trinh V, Phi L, Phan N, Pham P. A comparison of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cell transplantation and mononuclear cell transplantation for the treatment of acute hindlimb ischemia in a murine model. Biomed Res Ther 2014; 1(1): 9-20.
11. Kim SW, Jin HL, Kang SM, Kim S, Yoo KJ, Jang Y, et al. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. Int J Cardiol 2016; 203: 498-507.
12. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. J Cell Biochem 2011; 112(4): 1206-18.
13. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, Wagner E, Vachon MF, Barrette S, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. Bone Marrow Transplant 2004; 33(6): 605-11.
14. Shim JS, Cho B, Kim M, Park GS, Shin JC, Hwang HK, et al. Early apoptosis in CD34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. Br J Haematol 2006; 135(2): 210-3.
15. Fujii S, Miura Y, Iwasa M, Yoshioka S, Fujishiro A, Sugino N, et al. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. J Clin Exp Hematop 2017; 57(1): 1-8.
16. Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Ben Othman T, Ducrocq E, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res Ther 2012; 3(1): 6. (14 pages).
17. 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 2013; 16(5): 683-91.

18. Phermthai T, Tungprasertpol K, Julavijitphong S, Pokathikorn P, Thongbopit S, Wichitwiengrat S. Successful derivation of xeno-free mesenchymal stem cell lines from endometrium of infertile women. Reprod Biol 2016; 16(4): 261-8.
19. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. Blood 1997; 89(3): 776-9.
20. Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. Hum Gene Ther 2002; 13(13): 1605-10
21. Ma HY, Yao L, Yu YQ, Li L, Ma L, Wei WJ, et al. An effective and safe supplement for stem cells expansion ex vivo: cord blood serum. Cell Transplant 2012; 21(5): 857-69.
22. Phermthai T, Odglun Y, Chuenwattana P, Julavijitphong S, Titapant V, Vantanasiri C. Successful derivation and characteristics of xeno-free mesenchymal stem cell lines from human amniotic fluid generated under allogenic cord blood serum supplementation. Tissue Eng Regen Med 2011; 8: 216-23.
23. 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(8): 990-1001.
24. Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Grinenko TS, Sukhikh GT. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Bull Exp Biol Med 2007; 143(1): 127-31.
25. Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 2007; 31(3): 293-8.
26. Huang L, Critser PJ, Grimes BR, Yoder MC. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells. Cytotherapy 2011; 13(6): 712-21.
27. Romanov YA, Vtorushina VV, Dugina TN, Romanov AY, Petrova NV. Human umbilical cord blood serum/plasma: cytokine profile and prospective application in regenerative medicine. Bull Exp Biol Med 2019; 168(1): 173-7.
28. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7(11): 581-8.
29. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98(8): 2396-402.
30. Hunt CJ. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. Transfus Med Hemother 2011; 38(2): 107-23.
31. Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. Cytotherapy 2004; 6(5): 476-86.

32. Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells. Asian J Transfus Sci 2010; 4(1): 14-24.
33. Sibov TT, Severino P, Marti LC, Pavon LF, Oliveira DM, Tobo PR, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. Cytotechnology 2012; 64(5): 511-21.
34. Yoshioka S, Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Yao H, Miura M, et al. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from small-volume umbilical cord blood units that do not qualify for the banking system. Int J Hematol 2015; 102(2): 218-29.
35. Fan X, Liu T, Liu Y, Ma X, Cui Z. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. Biotechnol Prog 2009; 25(2): 499-507.
36. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Altern Lab Anim 2002; 30(2): 219-27.
37. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E, Jr. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. Biotechnol Prog 2006; 22(5): 1294-300.

Expansion of Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Using Culture Medium Supplemented with Umbilical Cord Serum

Suparat Wichitwiengrat[1] Sasiprapa Thongbopit[1] Suphakde Julavijitphong[1]
Piengchia Vichaidith[2] Pussara Hakularb[2] and Tatsanee Phermthai[1]

[1]Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Wanglang Road, Siriraj, Bangkoknoi, Bangkok 10700

[2]Obstetric and Gynecological Nursing Division, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Wanglang Road, Siriraj, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand

ABSTRACT Nowadays, the cultivation of cord blood mesenchymal stem cells (CBSC) can only propagated in a medium supplemented with embryonic stem cell grade fetal bovine serum (ES-FBS). By using a commercial human serum, the CBSC had been limited in cell propagation. Our previous study had showed a successful establishment of animal free-amniotic fluid stem cell (AFS), using human umbilical cord blood serum (hUCS). The current work is based on the idea of using hUCS for CBSC culture as a replacement of ES-FBS. With 49 cord blood samples for MSC isolation, every samples were cultured under the medium supplemented with hUCS comparable to supplementation with ES-FBS. The result demonstrated that CBSC lines generated under hUCS-medium showed similar morphology and specific MSC characteristics to the lines as from ES-FBS-medium. Both cell lines expressed CD29, CD73, CD90 and CD105 without expression of CD34 and CD45. Moreover, they can be differentiated into adipocyte and osteoblast. Nevertheless, the proliferation rate of CBSC derived in ES-FBS-medium was higher than the lines generated in hUCS-medium. The author concluded that hUCS can be used to replace ES-FBS in the medium for derivation and culture of CBSC lines.

Keywords: Cord blood mesenchymal stem cells, Embryonic stem cell grade fetal bovine serum, Human umbilical cord blood serum