

นิพนธ์ฉบับ

ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อความสามารถในการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ไปเป็นเซลล์ไขมัน

วีรวรรณ หาญกมลศิริ*, ศิริกุล มะโนจันทร์*, ชัยรัตน์ ตัณฑราวัดน์พันธ์*,
ดวงรัตน์ ตันติกัลยาภรณ์*, ไพรัตน์ ฐาปนาคะเชษฐ*, ภาควิชา เชี่ยวละม้าย*

บทคัดย่อ

- บทนำ:** โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เกิดจากภาวะที่ร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น โดยระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นทำให้เกิดการบาดเจ็บและการอักเสบของหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง และภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมา การศึกษาก่อนหน้านี้ที่พิสูจน์ให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไขมันในเนื้อเยื่อไขมันมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพิ่มความเสี่ยงของการป่วยเป็นโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ถึงแม้ในปัจจุบันจะเป็นที่ทราบกันว่าเซลล์ไขมันส่วนหนึ่งเจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells หรือ MSCs) ที่มีอยู่ทั้งในไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน แต่ความรู้เกี่ยวกับกลไกระดับโมเลกุลที่ควบคุมการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน รวมทั้งอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมระดับเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวานต่อการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์ไขมันดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัดในปัจจุบัน
- วิธีการศึกษา:** ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูก (BM-hMSCs) ในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันภายใต้ภาวะน้ำตาลสูง (hyperglycemic condition) รวมทั้งกลไกการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนที่เกี่ยวข้องโดยเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ
- ผลการศึกษา:** ถึงแม้ภาวะน้ำตาลสูงจะไม่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs แต่ภาวะน้ำตาลสูงส่งผลเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ นอกจากนี้ผลการทดลองยังระบุอีกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูง มีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน (adipogenic genes) ชนิด *Lipoprotein lipase (LPL)* สูงกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** ระดับของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานทำให้ BM-hMSCs มีระดับการแสดงออกของ *adipogenic genes Lipoprotein lipase* เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณเซลล์ไขมันที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจส่งผลทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะต้านอินซูลินเพิ่มมากขึ้นและตอบสนองต่อการรักษาลดลง ผู้วิจัยเชื่อว่าความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้แพทย์และนักวิจัยมีความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับกลไกที่ระดับน้ำตาลในเลือดส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในร่างกายไปเป็นเซลล์ไขมัน อันจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ป่วยโรคอ้วนลงพุงในอนาคตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์, เซลล์ไขมัน, เบาหวาน

วันที่รับบทความ: ๒๓ เมษายน ๒๕๕๗

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๕ มิถุนายน ๒๕๕๗

* สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ภาควิชา เชี่ยวละม้าย สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐

โทรศัพท์ ๐๒-๕๒๖-๕๗๖๘ อีเมล pkheolamai@me.com

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (Human mesenchymal stem cells หรือ hMSCs) จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด adult stem cells ที่พบในไขกระดูกพร้อมกับ hematopoietic stem cells (HSCs) hMSCs มีจำนวนประมาณร้อยละ ๐.๐๐๑ - ๐.๑ ของจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cell) ทั้งหมดในไขกระดูก โดย hMSCs สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนภายนอกร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และมีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน^{๑-๓}

ในปัจจุบันการศึกษากลไกที่ควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์ไขมัน (adipocyte) กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากการสะสมและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไขมันมีผลโดยตรงต่อพยาธิกำเนิดของโรคหลายชนิด เช่น โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง และโรคไขมันในเลือดสูง โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่าปริมาณของเซลล์ไขมันที่สะสมตามเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกายมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพิ่มอัตราเสี่ยงของการป่วยเป็นโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน^{๔, ๕} ซึ่งผู้ป่วยโรคเบาหวานส่วนใหญ่มักจะมีภาวะอ้วนลงพุง หรือที่เรียกกันว่าภาวะ metabolic syndrome ร่วมด้วย

ถึงแม้ในปัจจุบันจะเป็นที่ทราบกันว่า hMSCs สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันได้ แต่ความรู้เกี่ยวกับกลไกพื้นฐานที่ควบคุมการเจริญพัฒนาของ hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน รวมทั้งอิทธิพลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมระดับเซลล์ (โดยเฉพาะระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน) ต่อการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของ hMSCs ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อาจทำให้ hMSCs ในร่างกายมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะต้านอินซูลินมากขึ้น และตอบสนองต่อการรักษาลดลง เพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าวในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาศักยภาพในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของ hMSCs ภายใต้ภาวะน้ำตาลสูง (high glucose condition) รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าว โดยเปรียบเทียบกับ hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ เพื่อนำความรู้ที่ได้มาพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคไขมันในเลือดสูงให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างไขกระดูก

ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ ๑ โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครเพศชายหรือหญิงที่ทำการบริจาคไขกระดูกที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และไม่มีปัญหาหรือโรคที่มีผลกระทบต่อการศึกษาวิจัย โดยกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดจะได้รับคำอธิบายรายละเอียดของโครงการวิจัยจากผู้วิจัยก่อนทำการลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (consent form) โดยผู้วิจัยจะทำการเก็บไขกระดูกปริมาณ ๑๐ มิลลิลิตร จากผู้บริจาคเป็นจำนวน ๑ ครั้ง มาใช้ในการทำวิจัย โดยตัวอย่างไขกระดูกที่ได้รับจากอาสาสมัครจะถูกบรรจุลงในหลอดทดลองที่มีสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้ในการแยก mononuclear cells (MNCs) ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ที่แยกได้จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

นำไขกระดูกที่ได้มาเจือจางด้วย Phosphate buffer saline (PBS) (Invitrogen, USA) ในอัตราส่วน ๑ ต่อ ๑ แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสาร Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, USA) ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 500 g เป็นเวลา ๒๐ นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำ MNCs ที่แยกได้มาปั่นล้างด้วย PBS เป็นจำนวน ๒ ครั้ง หลังการปั่นล้างจึงนำ MNCs ที่แยกได้ส่วนหนึ่งไปนับจำนวนด้วย Haemocytometer ก่อนนำ MNCs ส่วนที่เหลือมาแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM) (Invitrogen, USA) ที่ผสม 10% Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA) และ ๑๐๐ ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด T-25 (Corning Life Science, USA) โดยมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก ๓ วัน โดยระหว่างนี้จะตรวจสอบการเจริญของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Olympus, Japan)

การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ที่แยกได้จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

(๑) การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ BM-hMSCs ด้วยวิธี flow cytometry

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน 1×10^5 เซลล์ มาทำการติดฉลากด้วย mouse anti-human antibodies ๕ ชนิด (ชนิดละ ๕ ไมโครลิตร โดยไม่มีการเจือจางในตัวอย่าง) คือ anti-CD45-FITC (BD Pharmingen, USA), anti-CD34-PE (Biolegend, USA), anti-CD90-FITC (AbDSerotec, USA), anti-CD73-PE (BD Pharmingen, USA) และ anti-CD105-PE (MiltenyiBiotec, Germany) ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นจึงนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100 g เป็นเวลา ๕ นาที ก่อนนำเซลล์มาทำให้คงสภาพด้วย 1% (w/v) paraformaldehyde ใน 1X PBS และนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง FACS calibur™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™ software (Becton Dickinson, USA)

(๒) การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน 5×10^4 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Osteodiff® Medium (MiltenyiBiotec, Germany) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-well plate (Corning Life Science, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน จนครบเวลา ๒๑ วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย ๔๐ มิลลิโมลาร์ Alizarin red S (Sigma Aldrich, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๔ ครั้ง ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

(๓) การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน 5×10^4 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® Medium (MiltenyiBiotec, Germany) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-well plate (Corning Life Science, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน จนครบเวลา ๒๑ วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย ๐.๕% (w/v) Oil red O (Sigma Aldrich, USA) ใน isopropanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๒ ครั้ง ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

การศึกษาผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันของ BM-hMSCs

BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จะถูกแบ่งออกเป็น ๓ กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และ ๑๐๐ ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin/streptomycin ส่วนกลุ่มที่สองจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่สามจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (สาเหตุที่ผู้วิจัยเลือกใช้ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรในการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นระดับน้ำตาลในเลือดโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคเบาหวานส่วนใหญ่ ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรเป็นระดับน้ำตาลในเลือดโดยเฉลี่ยของคนปกติที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน) โดย BM-hMSCs ทั้ง ๓ กลุ่มจะถูกเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-well plate ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน เป็นเวลา ๑๔ วัน จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และทำให้คงสภาพด้วย methanol ก่อนนำไปย้อมสี Oil red O แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ไขมันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง BM-hMSCs ในภาวะดังกล่าว

การศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันใน BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูง

BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จะถูกแบ่งออกเป็น ๓ กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และ ๑๐๐ ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin/streptomycin ส่วนกลุ่มที่สองจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่สามจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดย BM-hMSCs ทั้ง ๓ กลุ่มจะถูกเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด T-25 ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรโดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน เป็นเวลา ๑๔ วัน จากนั้นจึงนำเซลล์มาสกัด RNA เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์

ไขมัน (adipogenic genes) จำนวน ๕ ยีน คือ *PPAR-γ*, *ADIPOQ*, *GLUT4*, *LPL* และ *SREBP1c* ด้วยวิธี quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) โดยใช้ยีน *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* เป็น reference gene

ตัวอย่าง RNA ที่สกัดจาก BM-hMSCs จะถูกนำมาเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, USA) โดย cDNA จำนวน ๓ ไมโครลิตรจะถูกนำมาผสมกับ ๑๐ ไมโครโมลาร์ forward primer จำนวน ๑ ไมโครลิตร, ๑๐ ไมโครโมลาร์ reverse primer จำนวน ๑ ไมโครลิตร และ SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, USA) จำนวน ๑๐ ไมโครลิตร ก่อนนำมาบรรจุใน MicroAmp® fast optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems, USA) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรสด้วยเครื่อง 7500 fast real-time PCR (Applied Biosystems, USA) โดยใช้ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ ๑: อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที จำนวน ๑ รอบ

ขั้นตอนที่ ๒: อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ วินาที ต่อด้วย อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ วินาที ต่อด้วย อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๔๐ วินาที จำนวน ๔๐ รอบ

ขั้นตอนที่ ๓: อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที จำนวน ๑ รอบ โดยปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรสดังกล่าวใช้ primers ดังนี้

ADIPOQ forward primer: 5'- CCTGGTGAGAAGGGTGAGAA -3',
ADIPOQ reverse primer: 5'- CAATCCCACACTGAATGCTG -3',
GLUT4 forward primer: 5'- CTTGAGACAGCAGGGGTAG -3',
GLUT4 reverse primer: 5'- ACAGTCATCAGGATGGCACA -3',
LPL forward primer: 5'- TCAACTGGATGGAGGAGGAG -3',
LPL reverse primer: 5'- GGGGCTTCTGCATACTCAAA -3',
PPAR-γ forward primer: 5'- GACCACTCCCACTCCTTTGA -3',
PPAR-γ reverse primer: 5'- AGGCTCCACTTTGATTGCAC -3',
SREBP1c forward primer: 5'- TTCTCACCTCCCAGCTCTGT -3',
SREBP1c reverse primer: 5'- GGAGGCTTCTTTGCTGTGAG -3',
GAPDH forward primer: 5'- CAATGACCCCTTCATTGACC -3',
GAPDH reverse primer: 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3',
 การศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs ด้วยวิธี flow cytometry

นำ BM-hMSCs มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และ ๑๐๐ ยูนิตต่อมิลลิลิตร

pennicillin/streptomycin และมีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรเป็นเวลา ๗ วันก่อนนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการติดฉลากด้วย mouse anti-human antibodies ๕ ชนิด (ชนิดละ ๕ ไมโครลิตร โดยไม่มีการเจือจางในตัวทำละลาย) คือ anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE, anti-CD90-FITC, anti-CD73-PE และ anti-CD105-PE ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นจึงนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100 g เป็นเวลา ๕ นาที ก่อนนำเซลล์มาทำให้คงสภาพด้วย 1% (w/v) paraformaldehyde ใน 1X PBS และนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง FACS calibur™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™ software โดยผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ

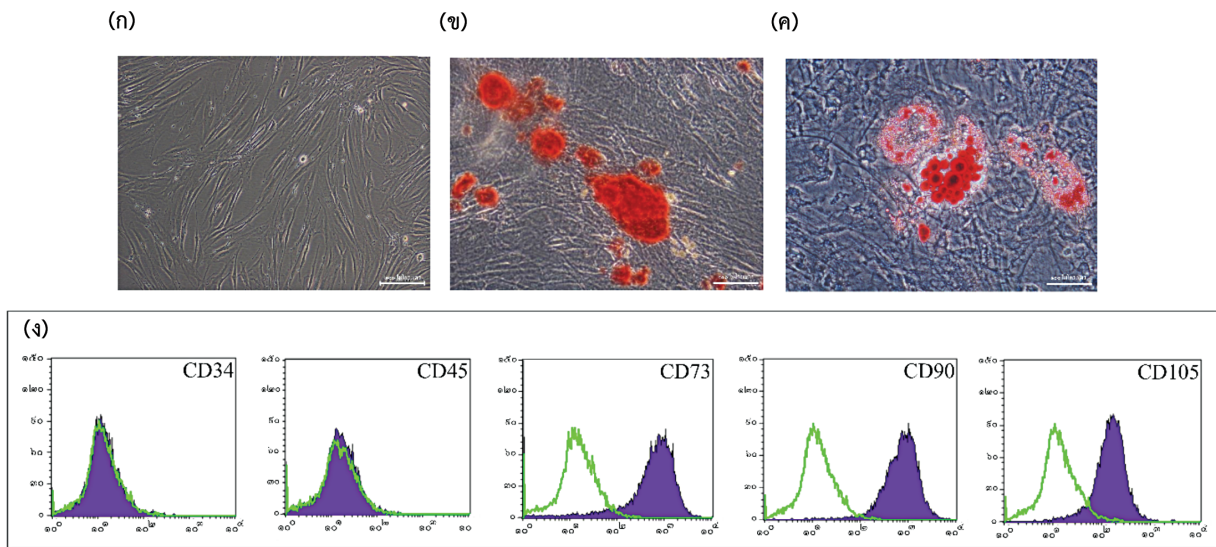
การทดสอบทางสถิติ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย ๓ ครั้ง ก่อนนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยการคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณได้มาทำการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธีคำนวณทางสถิติแบบ Mann-Whitney U test โดยถ้า p-value ที่คำนวณได้ด้วยวิธีดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ ๐.๐๕ จะถูกจัดว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังกล่าวมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

BM-hMSCs ที่แยกได้มีลักษณะคล้ายกระสวย (spindle-shaped cells) (รูปที่ ๑ ก) และมีรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hMSCs^{๑-๓} คือ มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD73, CD90, CD105 และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดคือ CD34 และ CD45 (รูปที่ ๑ ง) เมื่อทำการเหนี่ยวนำ BM-hMSCs ให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Osteodiff® medium และ NH Adipodiff® medium เป็นเวลา ๒๑ วัน และนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณของเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันที่เกิดขึ้นด้วยการย้อมสี Alizarin red S และ Oil red O^{๑,๒-๔} พบว่า BM-hMSCs ที่แยกได้ในการศึกษาสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก (รูปที่ ๑ ข) และเซลล์ไขมัน (รูปที่ ๑ ค) ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ ๑ ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

(ก) ลักษณะของ BM-hMSCs

(ข) เซลล์กระดูกที่เจริญพัฒนามาจาก BM-hMSCs หลังทำการย้อมด้วยสี Alizarin red S

(ค) เซลล์ไขมันที่เจริญพัฒนามาจาก BM-hMSCs หลังทำการย้อมด้วยสี Oil red O

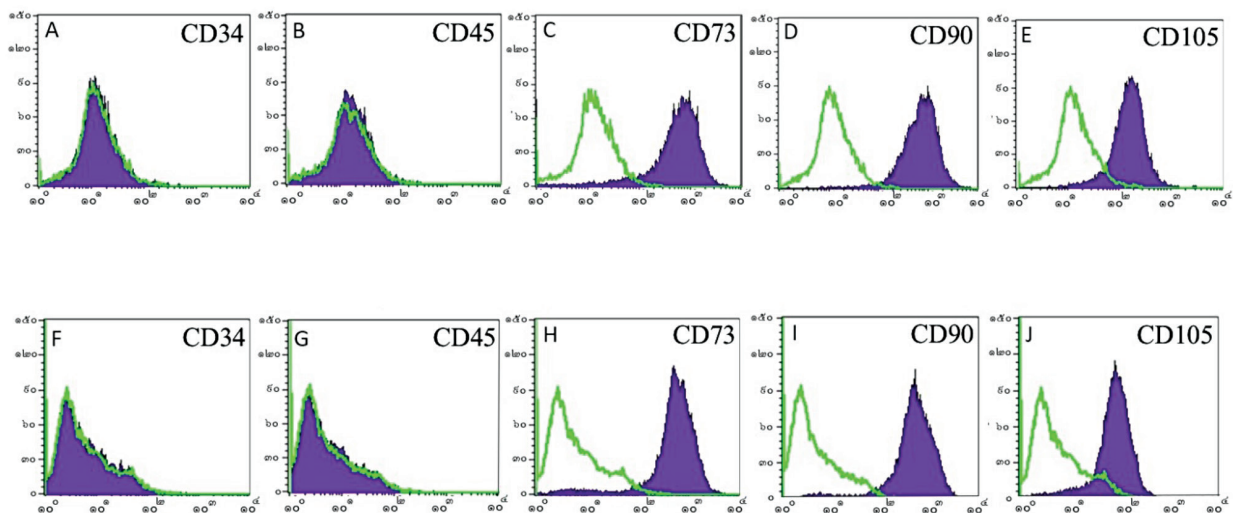
(ง) รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs

Scale bar ในรูป (ก) (ข) และ (ค) เท่ากับ ๒๐๐ ไมโครเมตร ๑๐๐ ไมโครเมตร และ ๑๐๐ ไมโครเมตร ตามลำดับ

ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs

เพื่อศึกษาผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSC surface markers) ของ BM-hMSCs ผู้วิจัยได้ทำการแบ่ง BM-hMSCs ออกเป็น ๒ กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และมีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรเพื่อจำลองภาวะน้ำตาลสูง (ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรเป็นระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่) ในขณะที่กลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่

ผสม 10% FBS และมีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (เพื่อจำลองภาวะน้ำตาลปกติ) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูงมีรูปแบบการแสดงออกของ MSC surface markers ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ โดย BM-hMSCs ทั้งสองกลุ่มมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD90, CD73, CD105 และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD34 และ CD45 (รูปที่ ๒) จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าภาวะน้ำตาลสูงไม่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของ MSC surface markers บนผิวเซลล์ BM-hMSCs



รูปที่ ๒ ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs

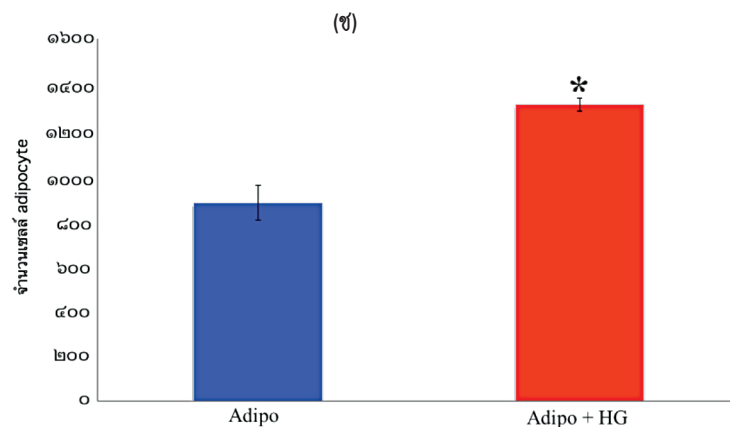
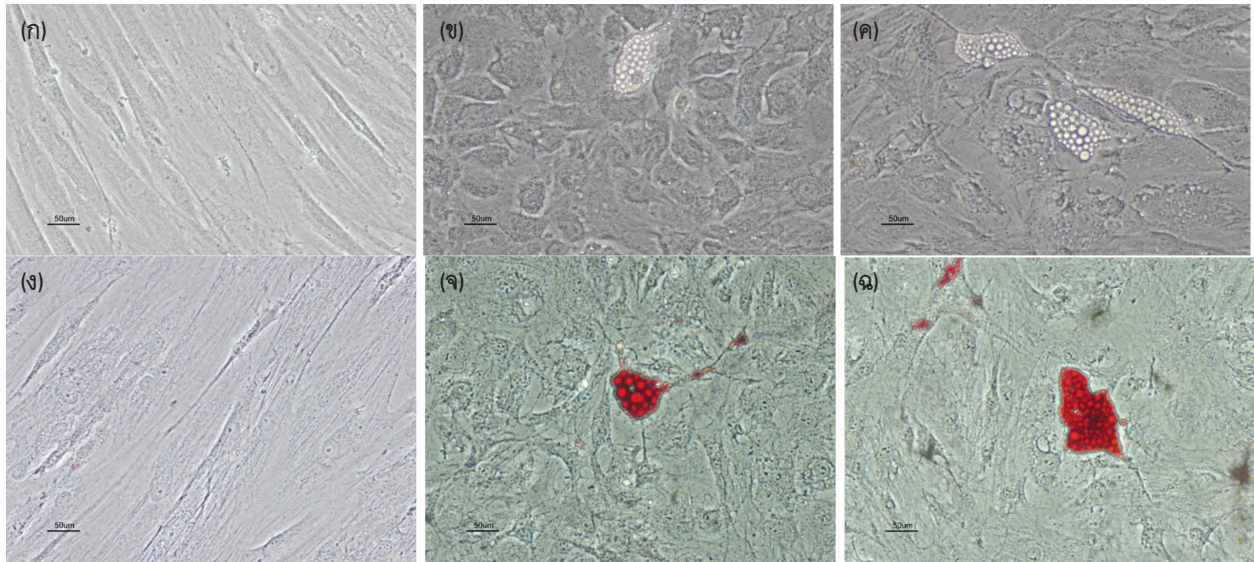
A-E รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ

F-J รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูง

ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของ BM-hMSCs

เพื่อศึกษาผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของ BM-hMSCs ผู้วิจัยได้ทำการแบ่ง BM-hMSCs ออกเป็น ๓ กลุ่ม โดยกลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS ส่วนกลุ่มที่สองจะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่สามจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลสูงมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่มากกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($1,308 \pm 24$

เปรียบเทียบกับ 876 ± 76 , $p \leq 0.05$) (รูปที่ ๓ ข) นอกจากนี้ยังพบว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลสูงมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันได้เร็วกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลปกติอีกด้วย (มาจากการศึกษาที่ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยเซลล์ไขมันที่เจริญพัฒนามาจาก BM-hMSCs ทั้งสองกลุ่มมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือเป็นเซลล์ลักษณะกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ ๑๐๐ ไมโครเมตร และมี lipid droplet สะสมอยู่เป็นปริมาณมากในไซโตพลาซึม (รูปที่ ๓ ข และ ๓ ค) ซึ่งย้อมติดสี Oil red O (รูปที่ ๓ จ และ ๓ ฉ) ในขณะที่ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ไขมัน (รูปที่ ๓ ก) และไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสี Oil red O (รูปที่ ๓ ง) จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าภาวะน้ำตาลสูงส่งผลเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลปกติ



รูปที่ ๓ ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันของ BM-hMSCs เป็นเวลา ๑๔ วัน

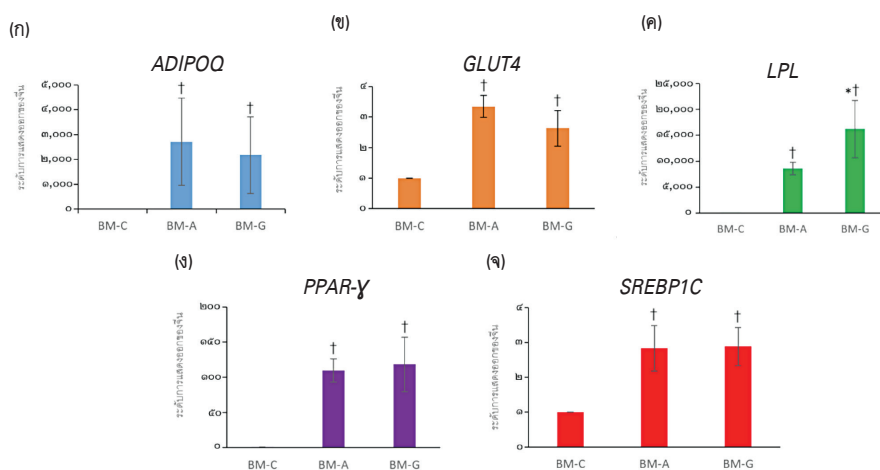
- (ก) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเลี้ยงใน DMEM ที่ผสม 10% FBS ในภาวะน้ำตาลปกติ
- (ข) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ในภาวะน้ำตาลปกติ
- (ค) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
- (ง) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน DMEM ที่ผสม 10% FBS ในภาวะน้ำตาลปกติ ภายหลังทำการย้อมด้วยสี Oil red O
- (จ) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ในภาวะน้ำตาลปกติ ภายหลังทำการย้อมด้วยสี Oil red O
- (ฉ) ภาพแสดงลักษณะของ BM-hMSCs ที่ทำการเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ภายหลังทำการย้อมด้วยสี Oil red O
- (ช) แผนภูมิแสดงจำนวน adipocyte ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง BM-hMSCs ใน NH Adipodiff® medium ในระดับน้ำตาลปกติ (Adipo) และ NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Adipo + HG) โดยแผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) ที่คำนวณมาจากการทำการทดลองซ้ำ ๓ ครั้ง; * $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน adipocyte ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง BM-hMSCs ใน NH Adipodiff® medium ในระดับน้ำตาลปกติ (Adipo)

Scale bar ในรูป (ก) (ข) (ค) (ง) (จ) และ (ฉ) เท่ากับ ๕๐ ไมโครเมตร

ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันใน BM-hMSCs

เพื่อศึกษาผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน ใน BM-hMSCs ผู้วิจัยได้ทำการแบ่ง BM-hMSCs ออกเป็น ๓ กลุ่ม โดยกลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS ส่วนกลุ่มที่สองจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่สามจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Adipodiff® medium ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ผู้วิจัยได้ทำการสกัดแยก RNA จาก BM-hMSCs ทั้งสามกลุ่ม ก่อนนำ RNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ adipogenic genes จำนวน ๕ ยีน ประกอบด้วย *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-γ)*, *Lipoprotein lipase (LPL)*, *Glucose transporter type 4 (GLUT4)*, *Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c)*,

และ *Adiponectin (ADIPOQ)* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ผลการทดลองระบุว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลสูง มีระดับการแสดงออกของยีน *LPL* สูงกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.6 ± 0.3 เท่า, $p \leq 0.05$) (รูปที่ ๔ ค) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *ADIPOQ* (รูปที่ ๔ ก), *GLUT4* (รูปที่ ๔ ข), *PPAR-γ* (รูปที่ ๔ ง) และ *SREBP1c* (รูปที่ ๔ จ) ใน BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลสูงนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวใน BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลปกติ ส่วน BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS นั้นมีระดับการแสดงออกของ adipogenic genes ทั้ง ๕ ยีน ต่ำกว่า BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลปกติ และ BM-hMSCs ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีระดับน้ำตาลสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๔ ก-จ)



รูปที่ ๔ ผลของภาวะน้ำตาลสูงต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันใน BM-hMSCs

แสดงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันจำนวน ๕ ยีน คือ *ADIPOQ* (ก) *GLUT4* (ข), *LPL* (ค), *PPAR-γ* (ง), *SREBP1C* (จ) ใน BM-hMSCs ๓ กลุ่ม คือ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน DMEM ที่ผสม 10% FBS (BM-C), BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (BM-A) และ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (BM-G) ด้วยวิธี quantitative real-time PCR โดยแผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) ที่คำนวณมาจากการทำการทดลองซ้ำ ๓ ครั้ง; * $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน NH Adipodiff® medium ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (BM-A); † $p \leq 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงใน DMEM ที่ผสม 10% FBS (BM-C)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

โรคเบาหวานชนิดที่ ๒ เกิดจากภาวะที่ร่างกายตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินลดลงทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น พบได้ประมาณร้อยละ ๙๕ ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด โดยระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) และเกิดการอักเสบของหลอดเลือดตามมา นำไปสู่การเพิ่มความเสียหายต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) โรคหลอดเลือดสมองตีบ (cerebrovascular disease) โรคหลอดเลือดส่วนปลายเสียหยา (peripheral vascular disease) รวมทั้งทำให้บาดเจ็บในผู้ป่วยโรคเบาหวานหายซ้ำอีกด้วย โดยโรคเบาหวานมักพบร่วมกับความผิดปกติอื่นๆ เช่น ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง รวมทั้งภาวะอ้วนลงพุง ถึงแม้ผลการศึกษาก่อนหน้านี้จะระบุว่าปริมาณของเซลล์ไขมันในร่างกายมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสียหายของการป่วยเป็นโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^๕ แต่กลไกทางชีววิทยาที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองนั้นยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน

ผลการทดลองในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ภาวะน้ำตาลสูงจะไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSC surface markers) ของ BM-hMSCs (รูปที่ ๒) แต่ภาวะน้ำตาลสูงส่งผลอย่างชัดเจนต่อการเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่มากขึ้น (รูปที่ ๓) โดยการเหนี่ยวนำดังกล่าวส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ภาวะน้ำตาลสูงทำให้ BM-hMSCs มีระดับการแสดงออกของยีน *Lipoprotein lipase (LPL)* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการเจริญพัฒนาในระยะท้ายๆ (late-phase) ของเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ ๔) ส่งผลให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่มากขึ้น ผลการทดลองในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า เซลล์ของผู้ที่มีน้ำหนักเกิน (overweight) มีสาร cytokine บางอย่างส่งผลเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้น^๕ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารดังกล่าวคืออะไร สำหรับผลระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันชนิดอื่นๆ เช่น *Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c)* และ *Peroxisome proliferator-acti-*

vated receptor-gamma (PPAR-γ) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการเจริญพัฒนาในระยะเริ่มต้น (early-phase) ของเซลล์ไขมันที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในการศึกษานี้ อาจแปลผลได้ว่าภาวะน้ำตาลสูงส่งผลจำเพาะต่อการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนที่มีอิทธิพลต่อการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมันเฉพาะในระยะท้ายๆ ของกระบวนการ differentiation โดยไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระยะเริ่มต้น ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของ BM-hMSCs ในภาวะน้ำตาลสูงดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของ cytokine ในเลือดของผู้ป่วยน้ำหนักเกินต่อการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมันที่ได้รับการตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า cytokine ในเลือดของผู้ป่วยน้ำหนักเกินส่งผลเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs เพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *LPL* ซึ่งเป็นยีนในระยะท้ายแต่ไม่ส่งผลเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* และ *CCAAT/enhancer binding protein-alpha (CEBP-α)* ซึ่งเป็นยีนในระยะต้นของเซลล์ไขมัน^๕

จากผลการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสรุปว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานส่งผลให้ BM-hMSCs มีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันสูงขึ้นและเหนี่ยวนำให้ BM-hMSCs มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันในปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์ไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะต้านอินซูลินมากขึ้นและตอบสนองต่อการรักษาลดลง โดยความรู้ที่ได้รับจากการศึกษานี้จะทำให้แพทย์และนักวิจัยมีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกที่ระดับน้ำตาลในเลือดส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในร่างกายไปเป็นเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้นอันจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ป่วยโรคอ้วนลงพุงในอนาคตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕

เอกสารอ้างอิง

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.

๒. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells* 2006;24:1294-301.
๓. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:783-91.
๔. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:39-48.
๕. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, et al. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002;51:144-51.
๖. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, et al. Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem cells* 2006;24:1728-37.
๗. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem cells* 2005;23:1105-12.
๘. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121:368-74.
๙. Di Bernardo G, Messina G, Capasso S, Del Gaudio S, Cipollaro M, Peluso G, et al. Sera of overweight people promote in vitro adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:4.

Abstract

Adipogenic differentiation capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in high glucose condition

Weerawan Hankamolsiri*, Sirikul Manochantr*, Chairat Tantrawatpan*, Duangrat Tantikanlayaporn*, Pairath Tapanadechopone**,

Pakpoom Kheolamai*

* Division of Cell Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Assistant Professor Dr. Pakpoom Kheolamai Division of Cell Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University Praholyothin Road, Khlong Luang, Pathumthani

Telephone number: 02-926-9768, 086-034-9902 E-mail: pkheolamai@me.com

Introduction: Type 2 diabetes is a disease in which the level of blood glucose is abnormally high due to a decreased responsiveness of patient's own cells to insulin. Several previous studies have demonstrated that an increased number of adipocytes in adipose tissue is significantly correlated with an increased risk of developing diabetes and cardiovascular diseases. It is known that significant amount of our adipocytes are derived from mesenchymal stem cells (MSCs) presented in our bone marrow and adipose tissues. However, the molecular mechanism regulating the differentiation of MSCs toward adipocytes as well as an influence of microenvironment, especially an elevated level of blood glucose, on the adipogenic differentiation process of MSCs is still poorly characterized.

Method: In the present study, we investigated the effects of high glucose on the adipogenic differentiation capacity and the expression levels of several adipogenic genes of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-hMSCs) in comparison to BM-hMSCs which were cultured in normal glucose condition.

Results: Although high glucose condition did not have any discernable effect on the surface marker expression profile of BM-hMSCs. The numbers of adipocytes generated from BM-hMSCs in high glucose condition were significantly greater than those generated from BM-hMSCs cultured in normal glucose condition. Moreover, the expression level of adipogenic gene *Lipoprotein lipase* in BM-hMSCs was also significantly up-regulated when the cells were cultured in high glucose condition.

Discussion and conclusion: An elevated level of blood glucose in diabetic patients could up-regulate the expression level of adipogenic gene *Lipoprotein lipase* and subsequently enhance the differentiation of BM-hMSCs toward adipocyte-lineage. The increased number of hMSC-derived adipocytes might increase the level of insulin resistant in diabetic patients, and therefore compromise the outcome of their treatment. We believe that the knowledge gained from this study will increase our understanding on the mechanisms underlying the effects of high glucose on adipogenic differentiation of hMSCs and might lead to an improvement in the treatments of both diabetes and metabolic syndrome in the future.

Key words: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell, Adipocyte, Diabetes