

## นิพนธ์ต้นฉบับ

## บทบาทของจีน *SFRP2* ต่ออัตราการรอดของเซลล์ต้นกำเนิด มีเซนไคม์ของมนุษย์ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชัน

กาญจนา ผอมดุก\*, ภาควิชา แพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, เยาวลักษณ์ อยู่ปรีชา\*\*\*,  
เมธิจิต วัฒนพานิช\*\*\*\*, ญัฐฐา กลิ่นคำหอม\*\*\*\*, สุรพล อิศรไกรศิลป์ \*\*\*\*, \*\*\*\*

### บทคัดย่อ

- บทนำ:** เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (hMSCs) สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยในปัจจุบันได้มีการนำ hMSCs มาทดลองใช้ในการรักษาโรคต่างๆ แต่ผลการรักษากลับยังไม่เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจาก hMSCs มีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการปลูกถ่ายที่ต่ำมาก เพื่อพัฒนาผลการรักษาให้ดีขึ้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ hMSCs ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่มักพบได้บ่อยในเนื้อเยื่อที่ทำการปลูกถ่าย โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2)*
- วิธีการศึกษา:** ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการดัดต่อจีน *SFRP2* เข้าสู่จีโนมของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ที่แยกจากเนื้อเยื่อไขกระดูก (BM-hMSCs) โดย BM-hMSCs ที่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ได้ถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) 0.๗๕ มิลลิโมลาร์เป็นเวลา ๕ ชั่วโมงเพื่อจำลองภาวะความเครียดออกซิเดชันภายนอกในร่างกาย ภายหลังการเพาะเลี้ยง ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ด้วยวิธี flow cytometry และได้ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับ BM-hMSCs กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2*
- ผลการศึกษา:** BM-hMSCs กลุ่มที่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการเพาะเลี้ยงทั้งในภาวะปกติที่ไม่มีสาร  $H_2O_2$  (ร้อยละ  $๘๒.๐๕ \pm ๐.๗๕$  เปรียบเทียบกับร้อยละ  $๘๘.๔๘ \pm ๐.๖๑$ ,  $p \leq ๐.๐๕$ ) และในภาวะ oxidative stress ที่มีสาร  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 0.๗๕ มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ  $๕๒.๓๓ \pm ๐.๒๘$  เปรียบเทียบกับร้อยละ  $๘๑.๘๓ \pm ๕.๘๑$ ,  $p \leq ๐.๐๕$ ) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่า BM-hMSCs ที่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ยังคงมีรูปร่างและคุณสมบัติในการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์และความสามารถในการพัฒนาเหมือนกับ BM-hMSCs ปกติทุกประการ
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** การเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* สามารถเพิ่มอัตราการรอดของ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะ oxidative stress และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธีการรักษาโรคโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ:** เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์, อัตราการรอดชีวิต, ภาวะความเครียดออกซิเดชัน

**วันที่รับบทความ:** ๑๐ มีนาคม ๒๕๕๗

**วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์:** ๘ เมษายน ๒๕๕๗

\* ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

\*\* สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

\*\*\* สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

\*\*\*\* ศูนย์ความเป็นเลิศทางงานวิจัยสเต็มเซลล์ของศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

**ผู้ที่ติดต่อ:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ภาควิชา แพทย์ศาสตร์ศิริราช สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี โทรศัพท์ ๐๒-๕๒๖๔๗๖๘ ๐๘๖-๐๓๔๔๙๐๒ อีเมล: pkheolamai@me.com

## บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (Human mesenchymal stem cells หรือ hMSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยปัจจุบันนักวิจัยสามารถแยกและเพาะเลี้ยง hMSCs จากเนื้อเยื่อไขกระดูก<sup>๑</sup> เนื้อเยื่อไขมัน<sup>๒</sup> รวมทั้งเนื้อเยื่อที่ติดมากับทารกภายหลังการคลอด (gestational tissues) เช่น รก เยื่อหุ้มรก และสายสะดือ<sup>๓-๕</sup> โดย hMSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ มีรูปร่างยาวเรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle shape) และมีรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะคือ มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD90, CD105 และ CD73 และไม่พบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ในกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือด คือ CD34 และ CD45<sup>๖</sup> hMSCs สามารถที่จะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อชั้น mesoderm ได้แก่ เซลล์กระดูก (osteoblasts), เซลล์ไขมัน (adipocytes) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes)<sup>๗, ๘</sup> รวมทั้งมีความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บเพื่อหลั่งสารที่มีผลยับยั้งการอักเสบและส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization)<sup>๙-๑๒</sup>

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการทดลองนำ hMSCs มาปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยเพื่อรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด<sup>๑๓, ๑๔</sup> โรคหลอดเลือดสมอง<sup>๑๕, ๑๖</sup> รวมทั้งโรคระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ<sup>๑๗, ๑๘</sup> อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาส่วนใหญ่บ่งชี้ว่า hMSCs มีอัตราการรอดชีวิต (survivability) และอัตราการคงอยู่ในเนื้อเยื่อ (engraftment rate) บริเวณที่ต้องการทำการรักษาที่ต่ำมาก<sup>๑๙</sup> ส่งผลให้ผลการรักษาด้วยการปลูกถ่าย hMSCs ดังกล่าวไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตและอัตราการคงอยู่ในเนื้อเยื่อของ hMSCs ในบริเวณที่ต้องการทำการรักษาต่ำ เกิดจากภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่มักเกิดขึ้นและดำรงอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บจากการขาดเลือดและการอักเสบเหล่านั้นนั่นเอง<sup>๒๐</sup> ในการศึกษา<sup>๒๑</sup> ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ hMSC ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชัน โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2)* ใน hMSCs โดยยีน *SFRP2* (อีกชื่อหนึ่งของยีนนี้คือ *FRZB*) เป็นยีนที่มีผลส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยการออกฤทธิ์ผ่านทางระบบการส่งสัญญาณภายในเซลล์ชนิด Wnt signaling pathway<sup>๒๒-๒๓</sup> จากการศึกษาในหนูทดลองก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีน SFRP2 สามารถเพิ่มอัตรา

การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocytes) ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันได้<sup>๒๔</sup> จากข้อมูลผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า การเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *SFRP2* ใน hMSCs น่าจะมีผลช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ hMSC ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชัน และทำให้การรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *SFRP2* ใน hMSCs ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขกระดูกมนุษย์ (human bone marrow-derived mesenchymal stem cells หรือ BM-hMSCs) และได้ทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ ระดับการแสดงออกของยีน *SFRP2* ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน รวมถึงอัตราการรอดชีวิตภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันของ BM-hMSCs ที่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *SFRP2* ดังกล่าว เปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ปรกติที่ไม่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *SFRP2*

## วิธีการศึกษา

### กลุ่มตัวอย่าง

ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ตัวอย่างเนื้อเยื่อไขกระดูกได้รับบริจาคจากอาสาสมัครที่มาทำการบริจาคไขกระดูก ณ โรงพยาบาลศิริราช โดยกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดได้รับการอธิบายรายละเอียดของโครงการวิจัยจากผู้วิจัยโดยละเอียดก่อนลงนามยินยอมในเอกสารเข้าร่วมการวิจัย

### การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

เนื้อเยื่อไขกระดูกจะถูกนำมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน ๑:๑ ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของ mononuclear cells (MNCs) ด้วยวิธี IsoPrep<sup>®</sup> gradient centrifugation (Robbins Scientific Corporation, USA) ด้วยแรงหนีศูนย์กลางที่ 100g เป็นเวลา ๒๐ นาที ณ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงนำส่วนของ MNCs ที่แยกได้มาปั่นล้างด้วย PBS ๒ ครั้ง ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด T25-Flask (Corning, USA) ที่ความหนาแน่น ๒ x ๑๐<sup>๕</sup> เซลล์/ตารางเซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified

Eagle Medium (DMEM) (GIBCO™, Invitrogen Corporation, USA) ที่มี 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, USA), 100 U/ml penicillin (General Drug House Co., Ltd. Thailand) และ 100 µg/ml streptomycin (General Drug House Co., Ltd. Thailand) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสในบรรยากาศที่มีร้อยละ ๕ CO<sub>2</sub> โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๘๐ ของพื้นที่ผิว ผู้วิจัยจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเอนไซม์ 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO™, Invitrogen Corporation, USA) และนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในภาชนะเลี้ยงเซลล์อันใหม่ต่อไป

#### การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก

(๑) ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ด้วยวิธี flow cytometry

โดยการนำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน ๑ x ๑๐<sup>๕</sup> เซลล์ มาทำการติดฉลากด้วย mouse anti-human antibodies ๕ ชนิด คือ anti-CD45-FITC (BD Pharmingen, USA), anti-CD34-PE (Biolegend, USA), anti-CD90-FITC (AbD Serotec, USA), anti-CD73-PE (BD Pharmingen, USA) และ anti-CD105-PE (Miltenyi Biotec, Germany) ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นจึงนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ด้วยแรงหนีศูนย์กลาง 100g เป็นเวลา ๕ นาที ก่อนนำเซลล์มาทำให้คงสภาพด้วย 1% (w/v) paraformaldehyde ใน 1X PBS และนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง FACS calibur™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™ software (Becton Dickinson, USA)

(๒) ศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก

โดยการนำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน ๕ x ๑๐<sup>๔</sup> เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Osteodiff® Medium (Miltenyi Biotec, Germany) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีร้อยละ ๕ CO<sub>2</sub> โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน จนครบเวลา ๒๑ วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาทำย้อมด้วย ๔๐ มิลลิโมลาร์ Alizarin red S (Sigma Aldrich, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๔ ครั้ง ก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Olympus, Japan)

(๓) ศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน

โดยการนำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๕) จำนวน ๕ x ๑๐<sup>๔</sup> เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH

Adipodiff® Medium (Miltenyi Biotec, Germany) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีร้อยละ ๕ CO<sub>2</sub> โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน จนครบเวลา ๒๑ วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาทำย้อมด้วย 0.5% (w/v) Oil red O (Sigma Aldrich, USA) ใน isopropanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๒ ครั้ง ก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Olympus, Japan) การตัดต่อจีน *SFRP2* เข้าสู่ BM-hMSCs

จีน *SFRP2* ถูกตัดต่อเข้า pENTR™/D-TOPO (Invitrogen Corporation, USA) และ pLenti6/UbC/V5-DEST (Invitrogen Corporation, USA) โดยใช้ gateway cloning system (Invitrogen Corporation, USA) เพื่อสร้าง *SFRP2*/pLenti6/UbC/V5-DEST vector ซึ่งเป็น plasmid ที่จะทำการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ก่อนนำ plasmid ที่สร้างขึ้นได้ดังกล่าวมาตัดต่อเข้าสู่จีโนมของ BM-hMSCs โดยใช้ lentiviral transduction system โดยเซลล์ BM-hMSCs ที่ผ่านการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* (ผู้วิจัยตั้งชื่อเซลล์ดังกล่าวว่า *SFRP2*-BM-hMSCs) จะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป การศึกษาระดับการแสดงออกของจีนด้วยวิธี Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

ตัวอย่าง RNA ที่ทำการสกัดจาก 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) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรสด้วยเครื่อง 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

โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วย primers ดังนี้;  
*SFRP2* forward primer: 5'-AGGACAACGACCTTTCATC-3',  
*SFRP2* reverse primer: 5'-TCATTTTATTTTGCAGGCTTC-3',  
*GAPDH* forward primer 5'-GTCAACGGATTGGTCGTATTG-3',  
*GAPDH* reverse primer 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'  
 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ SFRP2-BM-hMSCs ภายใต้  
 ภาวะความเครียดออกซิเดชัน

นำ SFRP2-BM-hMSCs จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ มา  
 เพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 35 mm cell culture dish  
 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (ที่ไม่มีการเติม FBS) เป็น  
 เวลา ๒ ชั่วโมง ก่อนนำมาเติมสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ให้  
 มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น ๐.๗๕ มิลลิโมลาร์ แล้วจึงบ่มเพาะ  
 เซลล์ในภาชนะนี้ต่อไปอีกเป็นเวลา ๕ ชั่วโมง แล้วจึงนำเซลล์ไป  
 วัดอัตราการรอดชีวิตของ SFRP2-BM-hMSCs โดยใช้ชุด FITC  
 Annexin V Apoptosis Detection Kit (Sigma Aldrich, USA) ซึ่ง  
 มีวิธีการโดยย่อคือ นำ SFRP2-BM-hMSCs ที่ได้มาแขวนลอย  
 ในสารละลาย 1X binding buffer ที่ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร  
 ก่อนนำมาบ่มด้วย FITC-Annexin V จำนวน ๕ ไมโครลิตร  
 และ propidium iodide (PI) จำนวน ๕ ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ  
 ห้อง เป็นเวลา ๑๕ นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง  
 FACS calibur™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™  
 software (Becton Dickinson, USA) โดยเซลล์ที่ย้อมติดสี  
 Annexin V และ/หรือ propidium iodide (Annexin V+/PI-,  
 Annexin V-/PI+, และ Annexin V+/PI+) คือ เซลล์ที่ตายแล้ว  
 ส่วนเซลล์ที่ย้อมไม่ติดทั้ง Annexin V และ propidium iodide  
 (Annexin V-/PI-) คือ เซลล์ที่รอดชีวิต โดยอัตราการรอดชีวิต  
 ของเซลล์ จะแสดงผลเป็นร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตจาก  
 จำนวนเซลล์ทั้งหมด

#### การทดสอบทางสถิติ

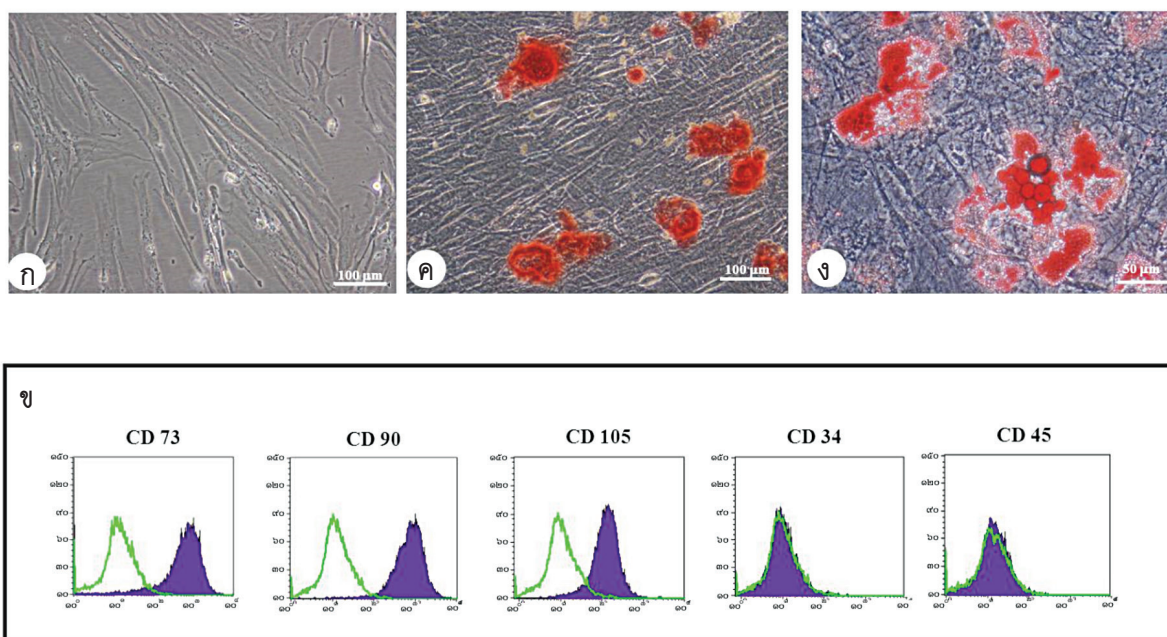
ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย ๓ ครั้ง  
 ก่อนนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยการคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard  
 error of mean) แล้วจึงนำข้อมูลที่คำนวณได้มาทำการเปรียบเทียบ

เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธีคำนวณทางสถิติ  
 แบบ Mann-Whitney U test โดยถ้า p-value ที่คำนวณได้  
 ด้วยวิธีดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ ๐.๐๕ จะถูกจัดว่า  
 ความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังกล่าวมีนัยสำคัญทางสถิติ

## ผลการศึกษา

### ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จาก ไชกระดูก

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิด  
 มีเซนไคม์ของมนุษย์จากไขกระดูก (human bone marrow-  
 derive mesenchymal stem cells หรือ BM-hMSCs) โดย  
 BM-hMSCs ที่แยกได้มีลักษณะคล้ายกระสวย (spindle-  
 shape) โดยเซลล์ดังกล่าวมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่ม  
 จำนวนอย่างรวดเร็วและสามารถครอบคลุมพื้นที่เพาะเลี้ยง  
 เกือบทั้งหมดภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ  
 ๒ สัปดาห์ (รูปที่ ๑ ก) จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ  
 โมเลกุลบนผิวเซลล์ของ BM-hMSCs ด้วยวิธี flow cytometry  
 พบว่า BM-hMSCs ที่แยกได้จากการศึกษานี้มีรูปแบบการ  
 แสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs คือ  
 มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD73, CD90,  
 CD105 และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่  
 จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดคือ CD34 และ CD45 (รูปที่ ๑ ข)  
 จากผลการเหนี่ยวนำ BM-hMSCs ให้เจริญพัฒนาเป็น  
 เซลล์กระดูก (osteocytes) และเซลล์ไขมัน (adipocytes)  
 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด NH Osteo-  
 diff® medium และ NH Adipodiff® medium เป็นเวลา  
 ๒๑ วัน และนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณของเซลล์  
 osteocytes และ adipocytes ที่เกิดขึ้นโดยการย้อมสี Alizarin  
 red S และ Oil red O เพื่อดูความสามารถของ BM-hMSCs  
 ดังกล่าวในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน  
 พบว่า BM-hMSCs ที่แยกได้ในการศึกษานี้สามารถเจริญ  
 พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก (รูปที่ ๑ ค) และเซลล์ไขมัน  
 (รูปที่ ๑ ง) ได้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ ๑ ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

(ก) รูปร่างลักษณะของ BM-hMSCs

(ข) รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ BM-hMSCs

(ค) เซลล์กระดูกที่เจริญพัฒนามาจาก BM-hMSCs

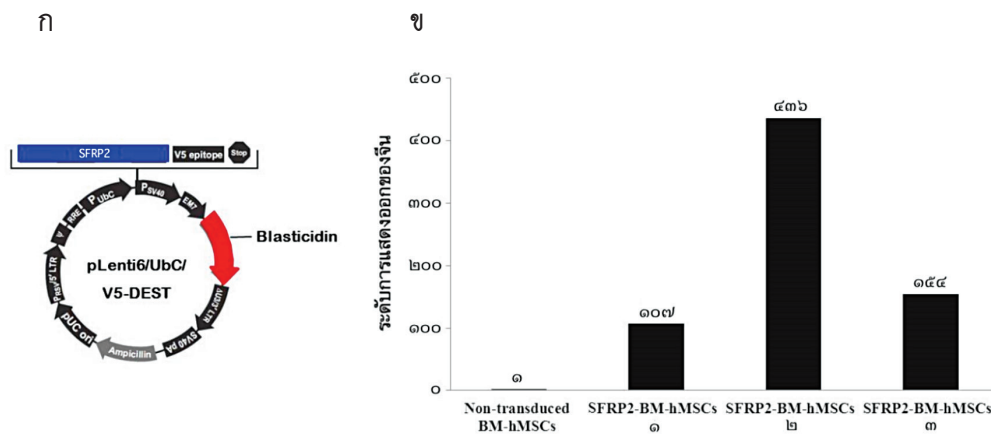
(ง) เซลล์ไขมันที่เจริญพัฒนามาจาก BM-hMSCs

Scale bar รูป ก, ค และ ง = ๑๐๐ ไมโครเมตร (μm), ๑๐๐ ไมโครเมตร และ ๕๐ ไมโครเมตร ตามลำดับ

#### ระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ในเซลล์ *SFRP2*-BM-hMSCs ภายหลังการตัดต่อจีน

เมื่อทำการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ใน BM-hMSCs ดีเอ็นเอส่วน coding sequence ของ *SFRP2* ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR โดย sequence ของยีนที่ clone ได้นั้นได้รับการยืนยันความถูกต้องด้วยวิธี DNA sequencing ก่อนที่จะนำมาตัดต่อเข้า pENTR™ / D-TOPO vector ซึ่งเป็น entry plasmid ก่อนจะนำไป clone เข้า pLenti 6/UbC/V5-DEST ซึ่งเป็น expression plasmid โดยใช้ LR recombination system โดย expression plasmid ที่ได้ (*SFRP2*/pLenti6/

UbC/V5-DEST vector) (รูปที่ ๒ ก) จะถูกนำไปตัดต่อเข้าจีโนมของ BM-hMSCs โดยใช้ lentiviral transduction system ภายหลังการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะชนิด Blasticidin BM-hMSCs ที่มีการแสดงออกของ *SFRP2*/pLenti6/UbC/V5-DEST vector (ผู้วิจัยตั้งชื่อเซลล์กลุ่มนี้ว่า *SFRP2*-BM-hMSCs) จะถูกนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ผลการทดลองระบุว่า *SFRP2*-BM-hMSCs จำนวน 3 clone ที่เลือกมาทำการตรวจสอบมีระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* สูงกว่า BM-hMSCs กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการตัดต่อจีน *SFRP2* ประมาณ ๑๐๐ - ๔๐๐ เท่า (รูปที่ ๒ ข)



รูปที่ ๒ ระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ในเซลล์ SFRP2-BM-hMSCs ภายหลังการตัดต่อจีน

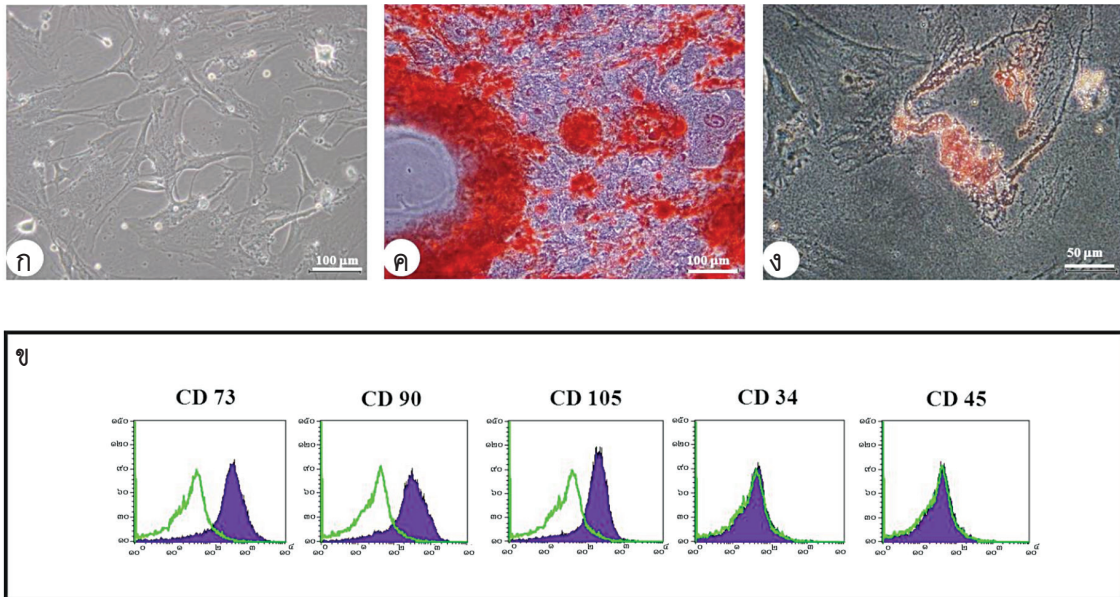
(ก) Plasmid map ของ SFRP2/pLenti6/UbC/V5-DEST vector

(ข) ระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ใน SFRP2-BM-hMSCs เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (non-transduced BM-hMSCs)

ผลกระทบของการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ต่อคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก

เพื่อศึกษาผลกระทบของการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ต่อคุณสมบัติของ BM-hMSCs ผู้วิจัยจึงนำ SFRP2-BM-hMSCs มาทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ รวมทั้งทดสอบความสามารถของเซลล์ดังกล่าวในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก และเซลล์ไขมันว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่ ผลการทดลองระบุว่า SFRP2-BM-hMSCs ซึ่งมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของ

จีน *SFRP2* ยังคงลักษณะคล้ายกระดูก (spindle-shape) (รูปที่ ๓ ก) และมีรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการตัดต่อจีน *SFRP2* คือ มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD90, CD73, CD105 และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิด CD34 และ CD45 (รูปที่ ๓ ข) นอกจากนี้ SFRP2-BM-hMSCs ยังคงความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก และเซลล์ไขมันได้เช่นเดียวกับ BM-hMSCs ปรกติ (รูปที่ ๓ ค และ ๓ ง)



รูปที่ ๓ ผลกระทบของการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ต่อคุณสมบัติของ BM-hMSCs

(ก) รูปร่างลักษณะของ SFRP2-BM-hMSCs ที่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2*

(ข) รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ SFRP2-BM-hMSCs

(ค) เซลล์กระดูกที่เจริญพัฒนามาจาก SFRP2-BM-hMSCs

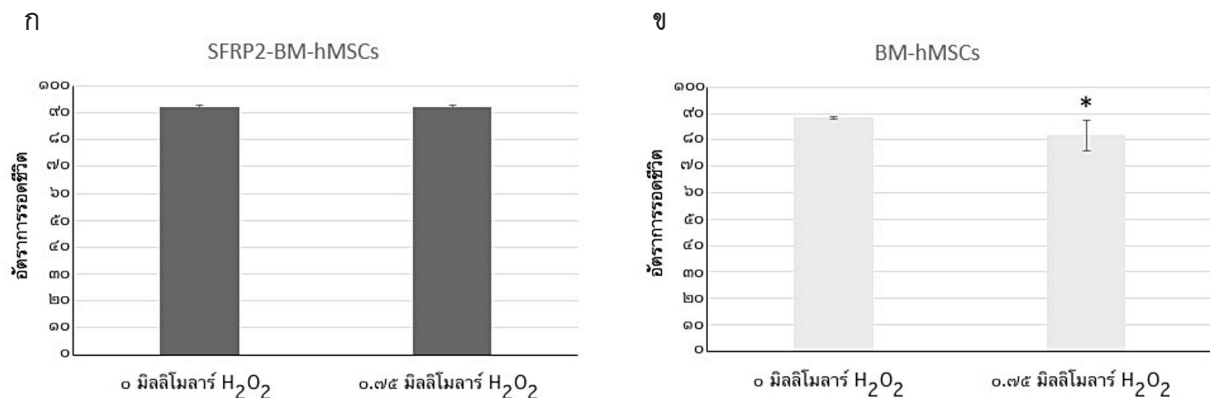
(ง) เซลล์ไขมันที่เจริญพัฒนามาจาก SFRP2-BM-hMSCs

Scale bar รูป ก, ค และ ง = ๑๐๐ ไมโครเมตร (μm), ๑๐๐ ไมโครเมตร และ ๕๐ ไมโครเมตร ตามลำดับ

#### ผลกระทบของการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ต่ออัตราการรอดชีวิตของ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะ oxidative stress

เพื่อจำลองภาวะความเครียดออกซิเดชันภายนอก ร่างกาย ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีเพาะบ่ม BM-hMSCs กับ สารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในการจำลองภาวะความเครียดออกซิเดชันภายนอก ร่างกาย จากผลการทดลองเบื้องต้นระบุว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการจำลอง ภาวะความเครียดออกซิเดชันภายนอก ร่างกาย คือ ๐.๗๕ มิลลิโมลาร์ (มาจากการศึกษาที่ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อนำ SFRP2-BM-hMSCs มาเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันที่จำลองขึ้นภายนอก ร่างกายโดยการเติมสาร

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น ๐.๗๕ มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา ๕ ชั่วโมง พบว่า SFRP2-BM-hMSCs ซึ่งมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงไม่แตกต่างจาก SFRP2-BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงในภาวะปกติที่ไม่มีสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ร้อยละ ๘๒.๓๓ ± ๐.๒๘ เปรียบเทียบกับร้อยละ ๘๒.๐๔ ± ๐.๗๘) ในขณะที่ BM-hMSCs กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ที่เพาะเลี้ยงในภาวะปกติที่ไม่มีสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ ๘๘.๔๘ ± ๐.๖๑ เปรียบเทียบกับร้อยละ ๘๑.๘๓ ± ๕.๘๑,  $p < ๐.๐๕$ ) (แผนภูมิที่ ๑ ก และ ๑ ข)



**แผนภูมิที่ ๑** ผลกระทบของการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ต่ออัตราการอยู่รอดของ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะ oxidative stress

- (ก) แผนภูมิแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SFRP2-BM-hMSCs ภายใต้ภาวะ oxidative stress ที่มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ความเข้มข้น ๐.๗๕ มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SFRP2-BM-hMSCs ภายใต้ภาวะปกติที่ไม่มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )
- (ข) แผนภูมิแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะ oxidative stress ที่มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ความเข้มข้น ๐.๗๕ มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะปกติที่ไม่มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

โดยแผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย และ error bar แสดงความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard error of mean) ที่คำนวณมาจากการทำการทดลองซ้ำ ๓ ครั้ง

\* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะปกติ

## วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เป็นเซลล์ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้รักษาโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพและการบาดเจ็บต่างๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้หลายชนิด เช่น เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน<sup>๗</sup> รวมทั้งมีความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บเพื่อหลั่งสารที่มีผลยับยั้งการอักเสบและส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization)<sup>๘, ๑๒</sup> ปัจจุบันมีการทดลองนำ hMSCs มาปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยเพื่อรักษาโรคหลายชนิด<sup>๑๓-๑๕</sup> แต่ผลการรักษาด้วยการปลูกถ่าย hMSCs ดังกล่าวยังไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยหนึ่งในสาเหตุหลักเกิดจากภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดขึ้นและดำรงอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่ต้องการทำการรักษา ทำให้อัตราการรอดชีวิต (survivability) และอัตราการคงอยู่ในเนื้อเยื่อ (engraftment rate) ของ hMSCs ในบริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวต่ำมาก โดยรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่า

MSCs ที่ทำการปลูกถ่ายเข้าสู่บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับบาดเจ็บจากภาวะขาดเลือดไปหล่อเลี้ยงของหนูทดลองมีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการคงอยู่ในเนื้อเยื่อดังกล่าวต่ำกว่าร้อยละ ๑<sup>๑๔, ๒๐</sup>

จากสาเหตุดังกล่าวในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ hMSC ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันโดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า BM-hMSCs ที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรมให้มียีนการแสดงออกของจีน *SFRP2* สูงขึ้น (SFRP2-BM-hMSCs) มีอัตราการรอดชีวิตภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ BM-hMSCs ปกติที่ไม่ได้รับการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* โดย SFRP2-BM-hMSCs ยังคงมีรูปร่างลักษณะของเซลล์ รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ รวมถึงความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน เหมือนกับ BM-hMSCs ปกติทุกประการ

ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในเซลล์ชนิดอื่นระบุว่า *SFRP2* ออกฤทธิ์ผ่านทางระบบส่งสัญญาณภายในเซลล์ชนิด Wnt signaling pathway<sup>๒๑-๒๓</sup> ทำให้ระดับของโปรตีน  $\beta$ -catenin ในเซลล์สูงขึ้น และส่งผลให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเกิด apoptosis หลายชนิด โดยการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเกิด apoptosis ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น<sup>๒๔</sup> จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยตั้งข้อสันนิษฐานว่า จีน *SFRP2* อาจใช้กลไกเดียวกันในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ BM-hMSCs ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชัน

จากผลการศึกษาทั้งหมดที่ได้กล่าวมา ผู้วิจัยสรุปว่าการเพิ่มระดับการแสดงออกของจีน *SFRP2* ใน BM-hMSCs สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ BM-hMSC ภายใต้ภาวะความเครียดออกซิเดชันได้ โดยความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยชิ้นนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธีการรักษาโรคโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส RTA 488-0007) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (CHE-RES-RG-49) ทุนบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และทุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

### เอกสารอ้างอิง

๑. Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010;28:585-96.
๒. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95.
๓. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem* 2010;111:846-57.
๔. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011;9:12.
๕. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330-7.
๖. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
๗. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
๘. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.
๙. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frasson F, Pistoia V, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*. 2007;25:1753-60.
๑๐. Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, et al. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:560-70.
๑๑. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821-7.
๑๒. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnou NP, Watt SM. Spindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One* 2013;8:e54747.

๑๓. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-5.
๑๔. Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sørensen M, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2006;92: 768-74.
๑๕. Bhasin A, Srivastava MV, Kumaran SS, Mohanty S, Bhatia R, Bose S, et al. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovasc Dis Extra* 2011;1:93-104.
๑๖. Lee PH, Kim JW, Bang OY, Ahn YH, Joo IS, Huh K. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83:723-30.
๑๗. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389-98.
๑๘. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262:509-25.
๑๙. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.
๒๐. Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:567-81.
๒๑. Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 1997;88:747-56.
๒๒. Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M Jr, Luyten FP. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11196-200.
๒๓. Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos M Jr. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 1997;88:757-66.
๒๔. Mirotso M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1643-8.

### Abstract

The role of *SFRP2* in the survivability of human mesenchymal stem cell under oxidative stress condition

Kanjana Pomduk\*, Pakpoom Kheolamai\*\*, Yaowalak U-Pratya\*\*\*,

Methichit Wattanapanitch\*\*\*\*, Nuttha Klincumhom\*\*\*\*, Surapol Issaragrisil\*\*\*\* \*\*\*\*

\* Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

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

\*\*\* Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

\*\*\*\* Siriraj Center of Excellence for Stem Cell Research, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Contacting author: Assistant professor Dr. Pakpoom Kheolamai Division of Cell Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University  
Praholyothin Road, Klong Luang, Pathumthani Telephone number: 02-926-9768, 086-034-9902 E-mail: pkheolamai@me.com

**Introduction:** Human multipotent mesenchymal stem cells (hMSCs) have been successfully isolated from several human tissues and can be expanded *ex vivo* for clinical uses. However, the success of most hMSC transplantation is limited due to poor cell survival and insufficient level of engraftment in the host tissues. In this study, we would like to augment the survivability of hMSCs under oxidative stress condition which are frequently presented in the host tissues by overexpressing *secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2)* gene.

**Methods:** SFRP2/pLenti6/Ubc/V5-DEST vector for overexpressing *SFRP2* gene was constructed transduced into bone marrow-derived hMSCs using lentiviral transduction system. The SFRP2-overexpressing BM-hMSCs (named SFRP2-BM-hMSCs) were cultured and treated with 0.75 mM  $H_2O_2$  for 5 hours to simulate the oxidative stress condition *in vitro*. After incubation with  $H_2O_2$ , the percentages of survival cells were determined by flow cytometry and the results were compared with those of non-transduced BM-hMSCs cultured under the same condition.

**Results:** The percentages of survival SFRP2-BM-hMSCs in 0 mM and 0.75 mM  $H_2O_2$  were significantly higher than those of non-transduced BM-hMSCs ( $92.04 \pm 0.79\%$  vs.  $88.48 \pm 0.61\%$ ,  $p \leq 0.05$  and  $92.33 \pm 0.28\%$  vs.  $81.83 \pm 5.81\%$ ,  $p \leq 0.05$ , respectively). Moreover, the overexpression of *SFRP2* gene did not affect the characteristics of BM-hMSCs, in term of their morphology, surface marker expression, and differentiation potential.

**Discussion and conclusion:** The over-expression of *SFRP2* gene could augment the survivability of BM-hMSCs under oxidative stress condition without altering their MSC characteristics and might have a potential to be used in the future clinical applications.

**Key words:** Human mesenchymal stem cell, Survivability, Oxidative stress