การใช้ growth factor หลายตัวให้ผลดีกว่าการใช้ growth factor ตัวเดียวในการได้มาซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

แจ่มจิต ด้วงปันตา[1] และอภิชาติ โอพารรัตนชัย[2*]

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2]ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้เขียนรับผิดชอบบทความ โทรสาร 0-5389-2904, E-mail: aoranrat@gmail.com.

บทคัดย่อ

การศึกษา growth factor ที่มีผลต่อการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ growth factor ที่มีผลต่อการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง (1) การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียว (LIF, PD98059, หรือ BIO) พบว่า การใช้ LIF เป็น growth factor ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู 6.21% ส่วน PD98059 และ BIO ไม่ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู (2) การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียวกับการใช้ growth factor หลายตัว (LIF+PD98059+BIO) พบว่าการใช้ growth factor หลายตัวได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู 31.29% มากกว่าการใช้ LIF (6.21%) เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3) นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 และ 2 มาหาระบบการใช้ growth factor ที่ได้ผลดีที่สุด พบว่าการใช้ growth factor หลายตัวในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ LIF ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู 31.58% และผลที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้ growth factor หลายตัวทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง (31.29%) (4) นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาศึกษาผลของช่วงเวลาที่ใช้ growth factor ที่มีต่อผลสำเร็จสูงสุด พบว่าการใช้ growth factor หลายตัวในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ LIF ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู สูงที่สุด (31.58%) มากกว่าการใช้ LIF ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง (6.21%) และมากกว่าการใช้ LIF ในช่วงที่ 1 ร่วมกับ การใช้ growth factor หลายตัวในช่วงที่ 2 ของการทดลอง (6.25%) เมื่อนำ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัวมาตรวจสอบด้วย AP (alkaline phosphatase) และตรวจสอบด้วย molecular marker Oct 4 พบว่ามีการติดสีม่วงเข้มของ AP มากกว่า และมีการติดสีของ Oct 4 เป็นบริเวณกว้างกว่าและ เข้มกว่า outgrowth ที่ได้จากการใช้ LIF เพียงอย่างเดียว

สรุปการใช้ growth factor หลายตัว โดยเฉพาะเมื่อใช้ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst ไปจนถึงระยะ outgrowth มีความสำคัญมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

คำสำคัญ: growth factor, เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cell) เป็นเซลล์ที่ได้มาจาก ICM (Inner cell mass) ของตัวอ่อนในระยะ blastocyst เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีคุณลักษณะจำเพาะพิเศษ คือ เป็นเซลล์ที่มี pluripotency, มีความสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ต่างๆ ของร่างกายได้ทุกชนิด, undifferentiation, self-renewal (Kiatpongsan *et al.*, 2006) นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนยังมีคุณลักษณะจำเพาะอื่นๆ เช่น มี alkaline phosphatase activity ที่สูง, มีการแสดงของ SSEA (stage-specific embryonic antigen) เช่น SSEA-1 ที่มีเฉพาะในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู, มีการแสดงออกของ germline transcription factor: Oct-4, มีอัตราส่วนของ nucleus และ cytoplasm ที่สูง, มี telomerase activity ที่สูง, มี cytokines ที่ควบคุม embryonic stem cell self-renewal (Wobus, 2001) และการที่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถอยู่ในภาวะ pluripotency และ self-renewal ได้นั้นเนื่องจากมี intracellular signaling หรือ signaling pathway ในการควบคุม คือ LIF signaling pathway และ SHP-2-ERK signaling pathway เป็น pathway ที่เกิดร่วมกัน (Niwa, 2001) และ Wnt signaling pathway เป็น pathway ที่ไม่อาศัยการทำงานของ LIF (Sato *et al.*, 2004) LIF signaling pathway และ SHP-2-ERK signaling pathway เกิดขึ้นโดยการที่ LIF (Leukemia inhibitory factor) จับกับ LIF-specific receptor (LIFR) และ common signal transducer gp130 ดังนั้นเมื่อ LIF จับกับ gp130 จะมีผลทำให้เกิดการกระตุ้น pathway 2 pathway ที่อยู่บริเวณ gp130 คือ JAK-STAT (Janus-associated tyrosine kinases-Signal Transducer and Activator of Transcription) pathway และ SHP-2-ERK (Protein phosphatase-2-Extracellular signal-reglulated kinase) pathway (Niwa, 2001) ทำให้เกิด tyrosine phosphorylation ของ LIFR และ gp130 มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่บริเวณ JAK-STAT และบริเวณ SH2 (Src homology 2) ทำให้ STATs ที่อยู่ภายใน transcriptionfactor โดยเฉพาะ STAT3 เข้าไปเสริมแรงของ receptor ทำให้มี phosphorylation และย้ายเข้าสู่นิวเคลียส มีผลทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และสร้างเซลล์ในลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) (Burdon *et al.*, 1999; 2002) นอกจากนี้บริเวณ SH2 ที่เกิดการกระตุ้น SH2 จะจับกับ phosphorylated tyrosine (Burdon *et al.*, 1999) ทำให้เกิด SHP-2 และ SHP-2 จะทำปฏิกิริยากับ intracellular domain ของ gp130 receptor และกระตุ้นการทำงานของ Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) ที่มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ Ras ที่จะไปกระตุ้นการทำงานของ extracellular signal regulated kinase (ERK) โดยผ่านทาง mitogen-activated protein kinase (MEK/MAPK) เมื่อ ERK ทำงานจะไปกระตุ้น transcription factor เช่น Elk, c-Fos, c-Jun ทำให้ระงับ self-renewal และกระตุ้น differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Burdon *et al.*, 2002; Okita and Yamanaka, 2006) แต่ถ้าเมื่อใดเกิดการยับยั้งการทำงานของ ERK โดยการใช้ MEK-1 inhibitor เช่น PD98059 (Parke-Davis 98059) จะทำให้เกิดการยับยั้ง differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้น SHP-2-ERK signaling pathway จึงเป็น pathway ที่ไม่จำเป็นสำหรับ self-renewal ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน แต่ SHP-2 ยังคงเป็นส่วนประกอบของ LIF signaling pathway (Niwa, 2001) นอกจากนี้ยังมี Wnt signaling pathway เป็น pathway ที่ไม่อาศัยการทำงานของ LIF ทำงานโดยการที่ Wnt ligands จับกับ Frizzled receptor (Fz) ที่บริเวณผิวเซลล์

(cell surface) ทำให้ Dishevelled (Dsh) ทำงานและเกิดการกระตุ้นการทำงานของ protein axin ที่ประกอบด้วย adeomatous polyposis coli gene (APC) และ glycogen synthase kinase (GSK)-3β เมื่อ GSK-3 ถูกกระตุ้นและเกิดการทำงาน จะทำให้เกิด β-catenin phosphorylation มีผลทำให้ β-catenin ไม่เกิดความเสถียรและไม่มีการสะสมเพิ่มจำนวน และไม่เกิดการย้ายเข้าสู่นิวเคลียส มีผลทำให้ระดับของ cytoplasmic β-catenin ภายในเซลล์ต่ำลงและทำให้เซลล์ differentiation แต่ถ้าเมื่อใดมีการยับยั้งการทำงานของ GSK-3β โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นจะเกิดขึ้นเองภายในเซลล์หรือโดยการใช้ specific inhibitor เช่น BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime) ทำให้ไม่เกิด β-catenin phosphorylation เมื่อไม่เกิด β-catenin phosphorylation ทำให้ β-catenin มีความสถียรและมีการสะสมเพิ่มมากขึ้น และย้ายเข้าสู่นิวเคลียส ทำให้เซลล์มีแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และสร้างเซลล์ในลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้ (self-renewal) (Sato *et al*., 2004; Cartwright *et al*., 2004; Wang and Malbon, 2004; Avery *et al*., 2006; Okita and Yamanaka , 2006)

ปัจจุบันมีการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และได้รับความสนใจศึกษากันมากโดยแพทย์ บุคลากรทางการแพทย์ และนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย เนื่องจากในอนาคตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนอาจเป็นหนทางหนึ่งในการรักษาโรคต่างๆ ในมนุษย์ได้ การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้มีการศึกษาทั้งในมนุษย์และสัตว์ แต่การศึกษาในมนุษย์มีข้อจำกัดมากมาย เนื่องจากการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนต้องอาศัยไข่ และ ICM (Inner cell mass) ของตัวอ่อนในระยะ blastocyst ของมนุษย์ ซึ่งมีปัญหาทางด้านจริยธรรม ดังนั้นการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจึงมุ่งศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายๆ ชนิด เช่น ในหนู โดยการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนั้นต้องอาศัย growth factor (LIF, PD98059, BIO) เป็นตัวช่วยในการได้มาซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังเช่นรายงานการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูเป็นครั้งแรกใน 1981 มีการใช้ LIF (leukemia inhibitory factor) เป็น growth factor (Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981) และมีการใช้ PD98059 (Parke-Davis 98059) ซึ่งเป็น MEK-1 inhibitor เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อไม่ให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูเกิดการ differentiation (Burdon *et al*., 1999; Buehr and Smith, 2003) BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime) ซึ่งเป็น GSK-3 inhibitor เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูและมนุษย์เพื่อทำให้เซลล์คงสภาพ undifferentiation และอยู่ในภาวะ pluripotency (Sato and Brivanlou, 2003; Sato *et al*., 2004)

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบการใช้ growth factor หลายตัวกับการใช้ growth factor ตัวเดียวที่มีผลต่อการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียม mEF (mouse embryonic fribroblast) เพื่อเป็น feeder layer

เตรียมหนูเพศเมียและเพศผู้สายพันธุ์ ICR อายุประมาณ 12 สัปดาห์ผสมพันธุ์หนู ICR และวันรุ่งขึ้นตรวจดู vaginal plug ของหนู ICR เพศเมีย ถ้าเห็น vaginal plug แสดงว่ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น

ให้นับวันที่เห็น vaginal plug เป็นวันที่ 0.5 ของการตั้งครรภ์ เลี้ยงไว้จนหนูตั้งครรภ์ได้ 13.5 หรือ 14.5 วัน นำมาทำการเก็บตัวอ่อน เพื่อใช้ทำ mEF ตามวิธีของ Robertson (Robertson, 1987) และนำ mEF มาทำเป็น feeder layer ตามวิธีของ Robertson และของ Bryja (Robertson, 1987; Bryja *et al.*, 2006)

2. การเตรียมหนู เพื่อเก็บ blastocyst สำหรับการทดลอง

ฉีด FSH 5 unit เข้า Intraperitoneal (IP) ของหนูเพศเมีย hybrid F1 (c57BL/6 x DBA) ที่มีอายุ 10-12 สัปดาห์ โดยใช้ระยะเวลาในการกระตุ้น 46-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นฉีด HCG 5 unit เข้า IP และทำการผสมพันธุ์หนูเพศเมีย ดังกล่าว กับหนูเพศผู้ hybrid F1 (c57BL/6 x DBA) วันรุ่งขึ้นตรวจดู vaginal plug ของหนูเพศเมีย ถ้าเห็น vaginal plug แสดงว่ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น ให้นับวันนี้เป็นวันที่ 0.5 ของการตั้งครรภ์ และเลี้ยงหนูไว้จนถึงวันที่ 3.5 ของการตั้งครรภ์ จากนั้นนำมาเก็บ blastocyst ตามวิธีของ Robertson (Robertson, 1987)

3. การทำ Immonocytochemistry และ Alkaline phosphatase

เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจนได้ลักษณะ colony ขนาด 200-400 ไมครอน และลักษณะเซลล์ไม่ differentiation จากนั้นนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ มาตรวจสอบการติดสีของ alkaline phosphatase และตรวจสอบภาวะ pluripotency โดยการย้อม Oct4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 ตามวิธีของ Fang (Fang *et al.*, 2006) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ย้อมติดสีของ alkaline phosphatase, Oct4 และ SSEA-1

4. อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์

ES medium (Embryonic Stem cell medium ประกอบด้วย Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (KO-DMEM)(Gibco 10829-018)+ 2mM L-Glutamin (Gibco 35050-061)+0.1mM MEM nonessential amino acids (NEAA) (Sigma M7145)+ 0.1mM 2-Mercaptoethanol (βME) (Sigma M7522)) +20% Knockout serum replacement (SR) (Gibco 10828-028) หรือ 20% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco 10270-098)+growth factor (LIF, PD98059, BIO) ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นของ LIF 1000 unit/ml (Bryja *et al.*, 2006), PD98059 50 μM/ml (Buehr and Smith, 2003), BIO 2 μM/ml (Sato *et al.*, 2004)

5. วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst เพื่อให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

นำ blastocyst มาเพาะเลี้ยงบน feeder layer ที่มี ES medium+20%SR+growth factor ที่ใช้ในการทดลองโดยเพาะเลี้ยงที่ 37 ^{0}C 5%CO_2 in air เป็นเวลา 6 วันจนได้ outgrowth (outgrowth คือ เซลล์ที่มีการเจริญและการแบ่งตัวอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน) (ช่วงที่1 ของการทดลอง) จากนั้นนำ outgrowth มา passage ด้วย 2.5% trypsin และนำไปเพาะเลี้ยงบน feeder layer ที่มี ES medium+20%FBS+growth factor ที่ใช้ในการทดลอง 1 วัน เมื่อครบ 1 วันเปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็น ES medium+20%SR+ growth factor ที่ใช้ในการทดลอง เพาะเลี้ยงที่ 37 ^{0}C 5%CO_2 in air 4-6 วัน (ช่วงที่ 2 ของการทดลอง) พร้อมทั้งสังเกตลักษณะ colony ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่เกิดขึ้น และจดบันทึกจำนวนของเซลล์ต้น

กำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ (Bryja *et al.*, 2006)

6. การทดลอง

การทดลองนี้ในแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 เป็นการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst เพื่อให้ได้ outgrowth และช่วงที่ 2 เป็นการ passage outgrowth และเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียว แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้ LIF เติมในอาหารใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้ PD98059 เติมในอาหารใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

กลุ่มที่ 3 ใช้ BIO เติมในอาหารใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor (LIF) ตัวเดียวกับการใช้ growth factor หลายตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้ LIF (ที่ได้จากผลการทดลองที่1) เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

การทดลองที่ 3 นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 และ 2 มาหาระบบการใช้ growth factor ที่ได้ผลดีที่สุด แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง และใช้ LIF เติมในอาหาร ที่ใช้ เลี้ยง เซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 3 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง และใช้ PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 4 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง และใช้ BIO เติมในอาหารที่ใช้ เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง

การทดลองที่ 4 นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาศึกษาผลของช่วงเวลาที่ใช้ growth factor ที่มีต่อผลสำเร็จสูงสุด แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง และใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง

กลุ่มที่ 3 ใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง และใช้ LIF+BIO+PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์อัตราส่วนร้อยละของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูต่อจำนวน blastocyst ด้วยสถิติ Chi-square test โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 11.5 ($p < 0.05$)

ผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียว (LIF, PD98059หรือ BIO) เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง พบว่าการใช้ LIF ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมากกว่าการใช้ PD98059 และ BIO (6.21% , 0%, 0%) ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า LIF เป็น growth factor ตัวเดียวที่ให้ผลได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

2. การเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor (LIF) ตัวเดียวกับการใช้ growth factor หลายตัว (LIF+PD98059+BIO) เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง พบว่าการใช้ growth factor หลายตัว ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู (31.29%) มากกว่าการใช้ LIF (6.21%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ growth factor หลายตัว ให้ผลได้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมากกว่าการใช้ LIF เพียงอย่างเดียว

3. การใช้ growth factor หลายตัว (LIF+PD98059+BIO) เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ช่วงการทดลอง และการใช้ growth factor หลายตัวเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ช่วงที่ 2 ของการทดลอง ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู 31.29%, 31.58% ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และได้ผลดีกว่าการใช้ growth factor หลายตัวเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ PD98059 หรือ BIO เติมในอาหาร ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ช่วงที่ 2 ของการทดลอง (5.76%, 0%) ตามลำดับ (ตารางที่3) จากผลการทดลองนี้แสดง ให้เห็นว่าไม่มีความจำเป็นต้องใช้ growth factor หลายตัวติดต่อกันทั้ง 2 ช่วงการทดลอง

4. การใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ทั้ง 2 ช่วงการทดลอง, การใช้ growth factor หลายตัวเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง และการใช้ LIF เติมในอาหารเลี้ยงที่ใช้เซลล์ในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ growth factor หลายตัวเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลองได้เซลล์ต้นกำเนิด ตัวอ่อนหนู 6.21%, 31.58%, 6.25% ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ growth factor หลายตัวในช่วงที่ 1 ของการทดลอง มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

จากผลการทดลองได้นำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ไปตรวจสอบการติดสีของ alkaline phosphatase พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูให้ผลติดสีม่วงเข้ม และเมื่อนำมาตรวจสอบภาวะ pluripotency โดยตรวจสอบกับ molecular marker เช่น Oct4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ให้ผลบวกของ Oct 4 และ SSEA-1 ส่วน TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4 ให้ผลลบ นั้นแสดงให้เห็นว่าผลที่ได้เป็นการยืนยันว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้จากการทดลองอยู่ในภาวะ pluripotency (รูปที่1)

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียว

ช่วงที่ 1	ช่วงที่ 2	จำนวน blastocyst	จำนวน mES cell line/ blastocyst
LIF	LIF	161	10/161 (6.21%)[a]
PD98059	PD98059	31	0/31 (0%)[b]
BIO	BIO	32	0/32 (0%)[b]

[a b]แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ growth factor ตัวเดียว กับการใช้ growth factor หลายตัว

ช่วงที่ 1	ช่วงที่ 2	จำนวน blastocyst	จำนวน mES cell line/ blastocyst
LIF	LIF	161	10/161 (6.21%)[a]
LIF+PD98059+BIO	LIF+PD98059+BIO	131	41/131 (31.29%)[b]

[a b]แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 และ 2 มาหาระบบการใช้ growth factor ที่ได้ผลดีที่สุด

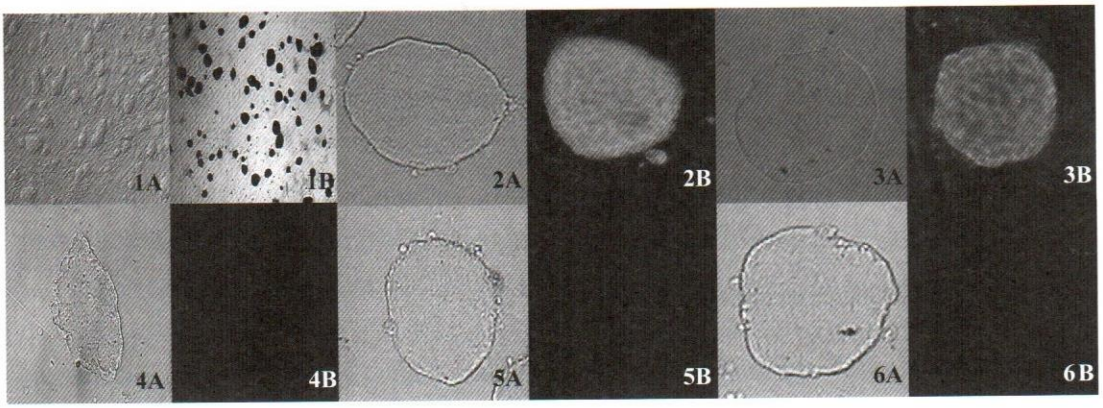
ช่วงที่1	ช่วงที่2	จำนวน blastocyst	จำนวน mES cell line/blastocyst
LIF+PD98059+BIO	LIF+PD98059+BIO	131	41/131 (31.29%)[a]
LIF+PD98059+BIO	LIF	76	24/76 (31.58%)[a]
LIF+PD98059+BIO	PD98059	52	3/52 (5.76%)[b]
LIF+PD98059+BIO	BIO	53	0/53 (0%)[b]

[a b]แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงผลที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาศึกษาผลของช่วงเวลาที่ใช้ growth factor ที่มีต่อผลสำเร็จสูงสุด

ช่วงที่1	ช่วงที่2	จำนวน blastocyst	จำนวน mES cell line/ blastocyst
LIF	LIF	161	10/161 (6.21%)[a]
LIF+PD98059+BIO	LIF	76	24/76 (31.58%)[b]
LIF	LIF+PD98059+BIO	64	4/64 (6.25%)[a]

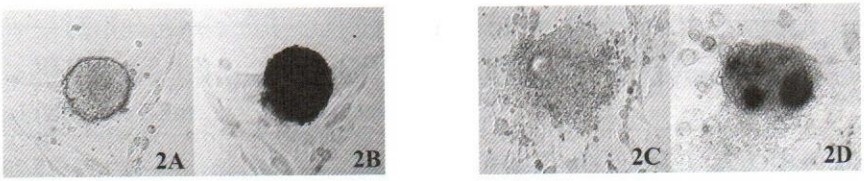
[a b]แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



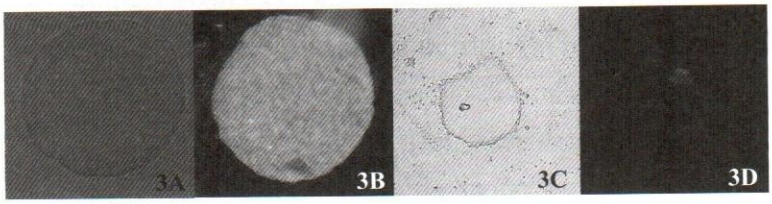
รูปที่ 1 แสดงความมี pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู (100x)

1AB, 2AB, 3AB : แสดงลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูให้ผลบวกของ alkaline phosphatase, Oct-4 และ SSEA-1 ตามลำดับ

4AB, 5AB, 6AB : แสดงลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูให้ผลลบของ SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ตามลำดับ



รูปที่ 2 แสดงการย้อมติดสีของ alkaline phosphatase ของ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัว (2AB) เปรียบเทียบกับ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor (LIF) ตัวเดียว (2CD) (100x)



รูปที่ 3 แสดงการย้อมติดสีของ Oct4 ของ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัว (3AB) เปรียบเทียบกับ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor (LIF) ตัวเดียว (2CD) (100x)

วิจารณ์และสรุป

การทดลองที่ 1 พบว่าการใช้ LIF เป็น growth factor ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ส่วนการใช้ PD98059 หรือ BIO ไม่ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ในการทดลองนี้การที่ LIF ให้ผลได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู เนื่องจากว่า LIF ที่เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยง จะไปกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ LIF signaling pathway ที่มีอยู่ภายในเซลล์ epiblast ที่พัฒนามาจาก ICM ของตัวอ่อนในระยะ blastocyst จึงทำให้ผลในการทดลองที่มีการใช้ LIF ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู แต่เมื่อมีการใช้ PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ผลการทดลองไม่ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า PD98059 ที่เติมในอาหารเลี้ยงที่ใช้เซลล์จะไปยับยั้งการทำงานของ MEK/MAPK ใน ERK signaling pathway (Niwa, 2001) ซึ่งอาจจะมีเซลล์ที่อยู่ในภาวะ pluripotency น้อยมากไม่เพียงพอที่จะเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และอาจมีเซลล์บางส่วน differentiation ไป ส่วน BIO เมื่อเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ BIO จะไปยับยั้งการทำงานของ GSK-3β ใน Wnt signaling pathway (Sato *et al*., 2004) มีผลทำให้เกิด self-renewal ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน(Avery *et al*., 2006; Wang and Malbon, 2004; Okita and yamanka, 2006) และจากคุณสมบัติของ BIO นี้น่าจะให้ผลการทดลองได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู แต่ผลของการทดลองไม่ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู เป็นเพราะว่ามีเซลล์ที่อยู่ในภาวะ pluripotency ที่เกิดจาก pathway นี้อาจเกิดขึ้นไม่มากและไม่เพียงพอที่จะเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้นในการทดลองที่ 1 นี้มีเพียงแต่ LIF ที่ให้ผลในการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

การทดลองที่ 2 พบว่าการใช้ growth factor หลายตัว ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมากกว่าการใช้ LIF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ใช้ growth factor หลายตัว ให้ผลได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมากขึ้น ทั้งนี้เพราะว่า growth factor หลายตัวที่ใช้นั้นมีผลต่อ signal paythway ที่มีอยู่ภายในเซลล์ epiblast ที่พัฒนามาจาก ICM ของตัวอ่อนในระยะ blastocyst เกิดขึ้นโดยการที่ LIF ไปกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ LIF signaling และ SHP-2 - ERK signaling pathway และ PD98059 จะไปยับยั้งการทำงานของ MEK/MAPK ที่อยู่ใน SHP-2-ERK signaling pathway ส่วน BIO นั้นจะไปยับยั้งการทำงานของ GSK-3β ที่อยู่ใน Wnt signaling pathway เมื่อ growth factor ทั้ง 3 ตัวทำงานในหน้าที่ตาม signaling pathway ที่อยู่ภายในเซลล์ epiblast จึงทำให้เซลล์ epiblast เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเกิด self-renewal และอยู่ในภาวะ pluripotency ไม่มีการพัฒนาไปเป็น mesoderm และ endoderm (Rossant, 2001) จึงทำให้มีเซลล์จำนวนมากและเพียงพอที่จะเป็นเซลล์ตั้งต้นในการได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ดังนั้นในการทดลองที่ 2 นี้ การใช้ growth factor หลายตัว จึงให้ผลได้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเพิ่มมาก

การทดลองที่ 3 พบว่าการใช้ growth factor หลายตัว เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง ร่วมกับการใช้ LIF เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้ growth factor หลายตัว เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ทั้ง 2 ช่วงของการทดลอง และมากกว่าการใช้ growth factor หลายตัว เติมในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง ร่วมกับการใช้ PD98059 หรือ BIO เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า PD98059 หรือ BIO เมื่อมีการใช้เพียงเดียวๆ ไม่สามารถทำให้เกิด self-renewal และรักษาภาวะ pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการใช้ BIO เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในสภาวะที่ไม่มี feeder พบว่าลักษณะ colony ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ มีลักษณะเกาะติดกันแน่นอยู่ในสภาวะ undifferentiated (Sato *et al*., 2003) หรือมีรายงานการใช้ PD98059 เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู และในอาหารที่ใช้เลี้ยง embryonic bodies ที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมีสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นและ embryonic bodies มีลักษณะคงเดิมไม่มีการเปลี่ยนรูป (Burdon *et al*., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 1 ที่การใช้ PD98059 หรือ BIO ไม่ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไม่มีความจำเป็นต้องใช้ growth factor หลายตัว ติดต่อกันในการทดลอง

การทดลองที่ 4 การใช้ growth factor หลายตัว เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลอง ร่วมกับการใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 ของการทดลองได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน มากกว่าการใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ร่วมกับการใช้ growth factor หลายตัวเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 2 และการใช้ LIF เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ทั้ง 2 ช่วงการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองนี้การใช้ growth factor หลายตัว เติมในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในช่วงที่ 1 ของการทดลองมีความสำคัญเป็นอย่างมากในเพิ่มประสิทธิภาพการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ทั้งนี้เพราะว่า growth factor ที่ใช้ คือ LIF, PD98059, BIO มีผลต่อ signal transduction ที่มีอยู่ภายในเซลล์ epiblast ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่เกิดขึ้นภายใน outgrowth ที่ได้จากการทดลองช่วงที่ 1 เกิด self-renewal และมีภาวะ pluripotency และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ที่มากเพียงพอที่จะเป็นเซลล์ตั้งต้น เมื่อมีการ passage เซลล์และเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้สามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และคงสภาพเดิมไม่ differentiate ทั้งนี้เพราะว่าเมื่อนำ outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัว มาเปรียบเทียบกับ outgrowth ที่ได้จากการใช้ LIF เพียงตัวเดียวพบว่าลักษณะของ outgrowth ที่ได้มีลักษณะแตกต่างกัน โดย outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัว มีลักษณะเกาะกันหนาแน่นมากกว่า outgrowth ที่ได้จาการใช้ LIF และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วย AP (alkaline phosphatase) และ molecular marker Oct4 พบว่ามีการติดสีม่วงเข้มของ AP มากกว่า (รูปที่ 2) และมีการติดสีของ Oct4 เป็นบริเวณกว้างกว่าและเข้มกว่า outgrowth ที่ได้จากการใช้ LIF เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3) นั้นแสดงให้เห็นว่า outgrowth ที่ได้จากการใช้ growth factor หลายตัว มี alkaline phosphatase activity ที่สูงและน่าจะมีเซลล์ที่มีภาวะ pluripotency จำนวนมากกว่า outgrowth ที่ได้จากการใช้ LIF เพียงตัวเดียว

สรุปการใช้ growth factor หลายตัว โดยเฉพาะเมื่อใช้ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ blastocyst ไปจนถึงระยะ outgrowth มีความสำคัญมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการได้มาของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาปี 2551 และขอขอบคุณ คุณอมร สันธิ และ คุณอนุชา สธนวงศ์ ที่ให้คำแนะนำทางด้านเทคนิคการทดลอง เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Avery S, Inniss K, Moore H.The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2006; 15: 729-740.

Bryja V, Bonilla S, Čajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells 2006; 24 : 844-849.

Buehr M, Smith A. Genesis of embryonic stem cell. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2003; 358: 1397-1402.

Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends Cell Biol 2002; 12: 432-438.

Burdon T, Stracey C, Chambers T, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signaling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cell. Dev Biol 1999; 210: 30-41.

Cartwright P, MeLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 control ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development 2004; 132: 885-596.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cell form mouse embryo. Nature 1981; 292: 154-156.

Fang ZF, Gai H, Huang YZ, Li SG, Chen XJ, Shi JJ, Wu L, Liu A, Xu P, Sheng HZ. Rabbit embryonic stem cell line derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. Exp Cell Res 2006; 312: 3669-3682.

Kiatpongsan S, Tannirandorn Y, Virutamasen P. Introduction to stem cell medicine. *J Med Asso Thai* 2006; 89: 111-112.

Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos culture in medium condition by teratocarinoma stem cell. Proc Natl Acad Sci 1981; 78: 7634.

Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cell. Cell Struct Funct 2001; 26: 137-148.

Okita K, Yamanaka S. Intracellular signaling pathway regulating pluripotency of embryonic stem cell. Curr Stem Cell Res Ther 2006; 1: 103-111.

Robertson EJ(Ed.). Teratocarcinomas and embryonic stem cell: a practical approach. IRL Press, Oxford,1987, pp. 71-111.

Rossant J. Stem cell from the mammalian blastocyst. Stem Cell 2001; 19: 477- 482.

Sato N, Brivanlou AH. Manipulation of self-renewal in human embryonic stem cells through a noval pharmacological GSK-3 inhibitor. In: Human Embryonic Stem Cell Protocols, Turksen K(ED.) Humana Press, Totowa, NJ, 2003, pp. 115-128.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenace of pluripotency in human and mouse embryonic stem cell through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med 2004; 10: 55-63.

Wang HY, Malbon CC. Wnt-frizzled signaling to G-proten-coupled effectors. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 69-75.

Wobus AM. Potential of embryonic stem cell. Mol Asp Med 2001; 22: 149-164.

For Derivation of Mouse Embryonic Stem Cells, Multiple Growth Factors give Better Result than Using Single One.

Jamjit Doungpunta[1], Apichart Oranratnachai[2*]

[1] Master-Degree student, Human & Animal Biotechnology Department, The Graduate School, Chiang Mai University.

[2] Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

[*] Corresponding Author; E-mail: aoranrat@gmail.com

Abstract

The objective of this study is to compare the efficiency of growth factor(s) on the derivation of mouse embryonic stem cells (mES). Four experiments were carried out: (1) for the effect of single growth factor (LIF, PD98059, BIO) individually on derivation of mES as calculated per number of blastocysts being cultured from the beginning of the experiments; it was found that LIF gave the highest number of mES (6.21%) while the others gave nil; (2) as comparing with single growth factor (LIF), multiple ones (LIF+PD98059+BIO) gave much significantly higher number of mES (31.29% vs. 6.21%); (3) from the results of the first two experiments, the best formula of growth factors was designed and tested, and it showed that culturing of blastocysts with multiple growth factors (LIF+PD98059+BIO) for the whole period (two stages) of culturing time gave comparable result to those using multiple growth factors during the first stage and only single growth factor (LIF) for the second stage (31.29% vs. 31.58% respectively); (4) the effect of growth factors regarding the stage of culture (first or second one) was experimentally tested and it finally confirmed that the best result was obtained when multiple growth factors (LIF+PD98059+BIO) was used during the first stage of the culture and single growth factor (LIF) for the second one (31.58%) while the reverse order culture (6.25%) and both-stage LIF only (6.21%) gave significantly much lower mES. To explore further into the mechanism of those impressive results, the quality of the outgrowth masses obtained from the first-stage culture was studied. Following alkaline-phosphatase and Oct-4 staining, which represent pleuripotency state of mES, they clearly showed that those outgrowths culturing in multiple growth factors stained much stronger and in higher proportion than those obtained from LIF-only culture.

In conclusion, multiple growth factors (LIF+PD98059+BIO) give higher rates of mES-derivation as comparing with single factor (LIF), particularly during the first stage of blastocyst culture.

Keywords: growth factor, mouse embryonic stem cell

Molecular Characterization of the Membrane (M) Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Isolated in Thailand

Sujira Parchariyanon*, Bandit Nuansrichay, Lamul Molee, Patcharin Muensa and Anchalee Srijangwad

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author, Tel. 025798908-14, E-mail: sujirap@dld.go.th

Abstract

A total of 8 samples from piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Thailand during 1995 to 2008 were submitted to National Institute of Animal Health for virus isolation. Membrane (M) gene of PEDV was amplified using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced. The entire open reading frame gene is 681 base long encoding 226 amino acids. All of the 8 Thai PEDV isolates contain three transmembrane domains (aa20-38, aa43-65 and aa75-97). One of these isolates (NIAH380/98) has a potential glycosylation site, while other seven isolates have two sites. Phylogenetic and sequence analyse revealed that these 8 Thai PEDV isolates are clustered into 2 groups. The first group is in Group III consisting of PEDV isolates from late 2007 to 2008 including NIAH116099/07, NIAH116913/07, NIAH100541/08, NIAH100542/08 and NIAH104812/08; this group shares 98.8-99.1% and 99.1-99.5% similarities with Chinese strain, JS-2004-2 at nucleotide and amino acid levels, respectively. The second group is in Group IV comprising PEDV isolates from 1995 to 2004 including NIAH2013/95, NIAH380/98, NIAH1795/04; this group shares 97.7-98.0% and 97.3-98.6% similarities with strain CV777 at nucleotide and amino acid levels, respectively.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus, membrane (M) gene, molecular characterization

Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by PED virus (PEDV) is an infectious and highly contagious viral disease of pigs (Cavanagh *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1999). PED is characterized by depression, anorexia and acute watery diarrhea which results from the destruction of villus enterocytes. Although morbidity is high and most of the animals in the herd can be affected within a week, mortality is usually low in adult animals (3%), which can recover within 7-10 days. On the contrary, in pigs under 4-5 weeks old, mortality is usually 50% and can reach 90% in severe outbreaks. Besides the mortality, PEDV infection causes important economic losses due to decreasing production (Pensaert, 1999).

PEDV was first reported in Belgium and the United Kingdom in 1978 (Pensaert and Debouck, 1978). Besides, PED has been isolated in most pig producing countries in Europe, China, Korea, and Japan. Economic losses resulting from this disease are serious every winter in these countries. PEDV is a member of Group 1a, genus *Coronavirus*, family *Coronaviridae* of the order *Nidovirales*. It is an enveloped, single-stranded, positive sense RNA virus. Its genome is approximately 28 kb in length. The PEDV genome contains genes encoded for pol1 (P1) protein, spike (S) protein, open reading frame (ORF3), envelope (E) protein, membrane (M) protein, and nucleocapsid (N) protein (Bridgen *et al.*, 1993; Duarte and Laude, 1994). M protein is a structural membrane glycoprotein, which plays an important role in the reaction of neutralization and assembly process of viral nucleocapsid and membrane proteins. The M glycoprotein can neutralize anti-M antibody in the presence of complement. It can also induce the production of gamma-interferon (IFN-γ) (Jinghui and Yijing, 2005).

The aim of this present study is to determine the nucleotide and amino acid sequences of the M gene of 8 Thai PEDV isolates. The M gene was cloned and sequenced and the nucleotide sequences were compared with those of PEDV isolates. The data are useful for a further application of molecular biology and epidemiology of PEDV that is prevalent in Thailand.

Materials and Methods

Virus

A total of 8 Thai PEDV isolates previously collected from the intestinal tissues of pigs from Virology Section, National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand, were used in this study (Table 1). The intestinal suspensions were diluted 1:10 in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 50 µg/ml of gentamicin. The virus was propagated in Vero cell grown in minimal essential medium (MEM) containing 10% tryptose phosphate broth, 3% L-glutamine, 1% gentamicin and 5% fetal bovine serum in a 5% CO_2 incubator at 37°C. The viruses from each different isolate were harvested when the infected

cells reached 70-80% cytopathic effect (CPE). The presence of PEDV was examined by RT-PCR (Chen *et. al.*, 2008). The isolates used for multiple alignment of nucleotide and amino acid sequences and construction of phylogenetic tree in this study were demonstrated in Table 1.

Table 1. GenBank accession numbers of M gene of PEDV isolated in Thailand from this study and the reference strains

Isolate	Accession number	province/country	Year
1. NIAH2013/95	EU581711	Ratchaburi, TH[a]	1995
2. NIAH380/98	EU581712	ND[b], TH	1998
3. NIAH1795/04	EU542415	Ratchaburi, TH	2004
4. NIAH116099/07	EU542417	Ratchaburi, TH	2007
5. NIAH116913/07	EU542419	Nakhonpathom, TH	2007
6. NIAH100541/08	EU542416	Ratchaburi, TH	2008
7. NIAH100542/08	EU542418	Ratchaburi, TH	2008
8. NIAH104812/08	FJ158546	Chachoengsao, TH	2008
9. CV777	AF353511	Belgium	1993
10. KPEDV-9	AF015888	South_Korea	1997
11. KPEDV-9	AF019893	South_Korea	1997
12. JMe2	D89752	Japan	1997
13. China	AY608890	China	2004
14. JS-2004-2	AY653204	China	2004
15. Chinju99	DQ845249	South_Korea	2006
16. CH/HNCH/06	EU033963	China	2006
17. CH/IMB/06	EU033962	China	2006
18. CH/HLJH/06	EU033964	China	2006
19. CH/IMT/06	EU033965	China	2006
20. CH/SHH/06	EU033966	China	2006
21. CH/JSX/06	EU033967	China	2006
22. Gansu/DX	EU031893	China	2007
23. HN-XYYYP-07	EU287429	Russia	2007
24.YM-07	EU302820	China	2007

[a] Thailand

[b] No data

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Viral RNA was extracted from infected cells using Qiagen RNA viral kit (Qiagen, Germany). The viral RNA was resuspended in diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water and stored at -70° C. The

RNA samples were reverse transcribed and amplified in a one-step RT-PCR assay using M gene specific primers as previously described by Chen *et al.*, 2008. Briefly, 5 µL of RNA were added in a 50 µL RT-PCR reaction containing 25 µL of 2x reaction buffer (Invitrogen), 1 µM of P1, 1 µM of P2, 1 µL SuperScript III/Platinum Taq High Fidelity enzyme mix (Invitrogen) and 17 µL of DEPC-treated water. The reaction conditions consisted of an initial incubation at 50°C for 30 min, then pre-PCR step at 94°C for 2 min 40 rounds of amplification cycles (denaturation at 94°C for 15 sec; annealing at 50°C for 30 sec and extension 68°C for 1.5 min) and final extension at 68°C for 15 min in MJ research PCR machine (Bio-Rad, U.S.A.). The PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, stained in 0.5 µg/ml ethidium bromide (EtBr), and visualized under ultraviolet translumination.

Sequencing and phylogenetic analysis

The PCR products were purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, Calif.). The concentration of the DNA fragment was determined using an ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) at 260 nm, and ligated into a pGEM®-T vector system (Promega, USA). The ligated plasmid was transformed into DH5α *E.coli* by using Gene Pulser (Bio-RAD, USA). The positive clones were determined using gene specific primers and Bigdye® Terminator version 3.1 chemistry (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. The reactions were run on a 3100 DNA analyser (Applied Biosystems, USA). Nucleotide sequencing was performed from both directions of M13 primers (pGEM®-T vector) in the PCR amplification. The sequences were assembled and low quality sequence data were removed by using SeqScape® solfware version 2.5 (Applied Biosystems, USA). Translation of nucleotide sequences and additional multiple sequence alignments and processing were performed using the Bioedit software version 7.0.4.1 with an engine based on the Clustal W algorithm (Thompson, 1994). The phylogenetic analysis based on full length of M gene and the deduced amino acid sequences were constructed using neighbor joining tree inference analysis with the Tamura-Nei model, with 1000 bootstrap replications provided in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, version 4) (Tamura *et al.*, 2007).

Results

Analysis and comparison of the deduced amino acid sequences

In this present study, the M gene of the 8 Thai PEDV isolates consists of 681 nucleotides. The deletion or insertion within the ORFs of these 8 isolates was not found. The comparisons of nucleotide and deduced amino acid are demonstrated in Table 2. We found that the 8 Thai PEDV isolates were separated into 2 groups. The first group consisted of 3 isolates (NIAH2013/95, NIAH380/98 and

NIAH1795/04) sharing 98.3-99.4% nucleotide sequence and 98.6-99.1% amino acid homology within strains and the second group consisted of 5 isolates (NIAH116099/07, NIAH116913/07, NIAH100541/08, NIAH100542/08 and NIAH104812/08) sharing a 99.5-100% nucleotide sequence and 95.5-100% amino acid homology within strains. The first group has 97.7-98% nucleotide and 97.3-98.6% amino acid sequence similarities with strain CV777, while the second group has 98.8-99.1% nucleotide and 99.1-99.5% amino acid sequence similarities with Chinese strain JS-2004-2.

The M proteins of 8 Thai PEDV isolates contain 226 amino acids. The M proteins of 7 isolates have 2 potential N-linked glycosylation sites (NGS at aa3-5 and NFT at aa19-21) in theirs exposed amino acid domain. However NIAH380/98 has only one N-glycosylation site because a nucleotide at position 7 was changed from adenosine to guanine in amino acid change (from N to D at position 3) (data not shown) which eliminates the N-linked glycosylation site. The glycosylation sequence, Asn-Phe-Thr (NFT), is highly conserved in the M protein of 8 isolates. M protein is highly hydrophobic and has 4 hydrophobic domains alternating with short hydrophobic regions in the amino-terminal half of the protein. The locations of 3 main transmembrane regions are aa20-38, aa43-65 and aa75-97, respectively. In this study, the fourth hydropholic domain was found as shown in Figure 4. In the center of the M protein, directly adjacent to the third hydrophobic domain. There is a stretch of 8 amino acids (SWWSFNPE at aa108-aa115) (Figure 1), which is well conserved in the coronavirus M protein. We found differences of amino acid sequences of PEDV isolates. In comparisons of the first and the second groups of Thai isolates, there are 5 amino acid changes (E 13 Q, V 42 A, F 64 L, S 92 G and A 214 S) found in most isolates. (Figure 1).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of M genes of 24 PEDV isolates was performed in which 8 isolates were from Thailand and while 16 isolates were obtained from GenBank database. M genes of PEDV are clustered into 4 major groups. The first cluster (Group I) consists of 3 Korean isolates and one Japanese isolate, the second cluster (Group II) comprises the prototype isolate, CV777, the third cluster (Group III) composes of 10 Chinese isolates, one Russian isolate and 5 Thai isolates, and the fourth cluster (Group IV) consists of 3 Thai isolates (Figure 2).

Table 2. Comparison of specific nucleotide and deduced amino acid of M gene of Thai PEDV (nt. 1-681 of M protein)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. NIAH2013/95	***	98.6	99.1	97.3	97.3	96.9	97.3	96.9	96.9	97.7	97.7	98.6
2. NIAH380/98	99.4	***	97.7	96.0	96.0	95.5	96.0	95.5	95.5	96.4	96.4	97.3
3. NIAH1795/04	98.6	98.3	***	97.3	97.3	96.9	97.3	96.9	96.9	97.7	97.7	98.6
4. NIAH116913/07	96..9	96.6	96.7	***	100	99.5	100	99.5	98.6	99.5	99.5	98.6
5. NIAH116099/07	96.9	96.6	96.7	100	***	99.5	100	99.5	98.6	99.5	99.5	98.6
6. NIAH100542/08	96.7	96.4	96.6	99.8	99.8	***	99.5	99.1	98.2	99.1	99.1	98.2
7. NIAH100541/08	96.9	96.6	96.7	100	100	99.8	***	99.5	98.6	99.5	99.5	98.6
8. NIAH104812/08	96.6	96.3	96.4	99.7	99.7	99.5	99.7	***	98.2	99.1	99.1	98.2
9. KPEDV-9 *	96.7	96.4	96.6	97.5	97.5	97.3	97.5	97.2	***	99.1	98.2	98.2
10. JMe2 *	97.6	97.3	97.5	98.3	98.3	98.2	98.3	98.0	98.8	***	99.1	99.1
11. JS-2004-2 *	96.9	96.6	97.0	99.1	99.1	98.9	99.1	98.8	97.5	98.3	***	99.1
12. CV777 *	98.0	97.7	97.9	98.2	98.2	98.0	98.2	97.9	98.3	99.2	98.5	***

Nucleotide identity (%) in lower triangle; Deduced amino acid identity (%) in upper triangle

* References strains

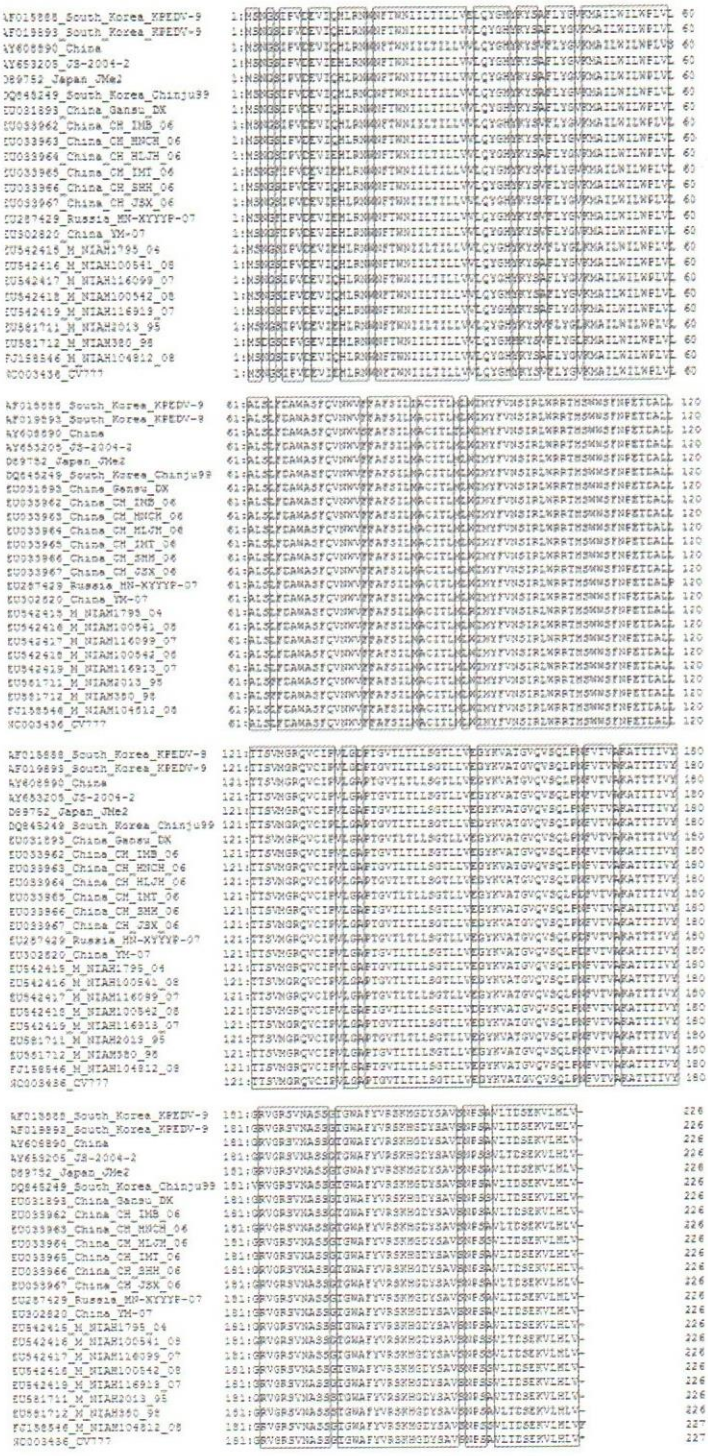


Figure 1. Comparison of the deduced amino acid sequences of the membrane glycoprotein genes of 8 Thai PEDV isolates and reference PEDV strains by Genetyx-win V 4.0 software. The frame indicate regions where the sequences are identical

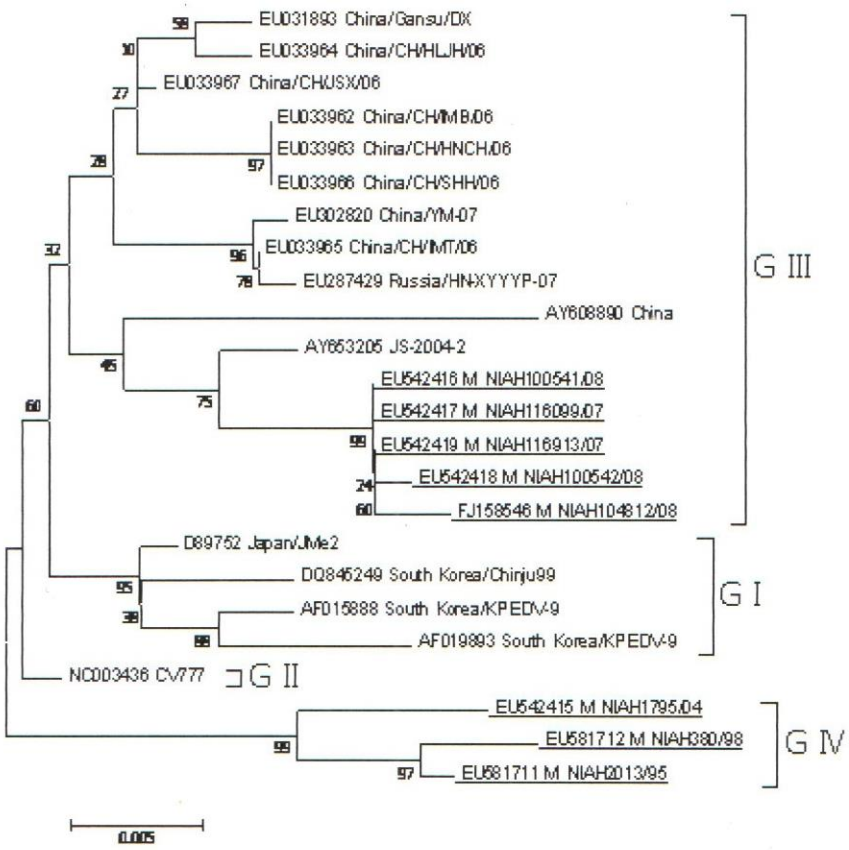


Figure 2. Phylogenetic relationships of the M genes of PEDV isolated from Thailand and the sequences deposited in GenBank. Tree was generated by using MEGA 4 program using neighbor-joining analysis method and with Tamura nei model. Numbers below branches indicate bootstrap values from 1000 replicates. Analysis was based on nucleotides 1 to 681 of M protein.

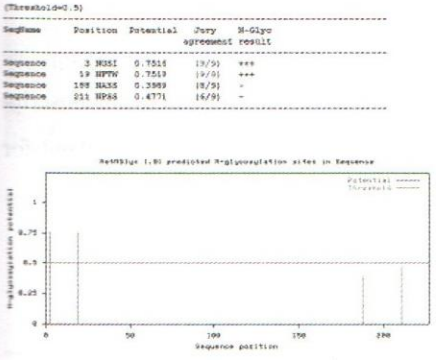


Figure 3. Predicted *N*-glycosylation site in M protein of Thai PEDV isolates

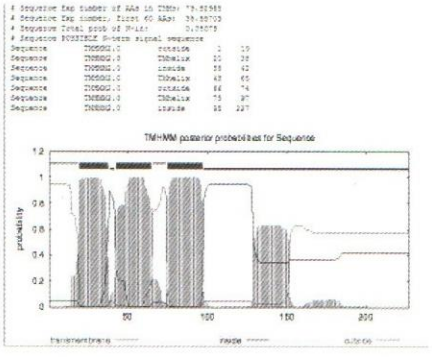


Figure 4. Predicted transmembrane region in sequence of the Thai PEDV isolates

Discussion

In this study, the complete nucleotide and deduced amino acid sequences of M protein genes from 8 Thai PEDV isolates were determined and compared with those of PEDV isolates available in GenBank database in order to find genetic diversity among prevailing PEDVs in Thailand. Although PEDV is known to have only one serotype at present, the genome of PEDV shows a wide genetic diversity, according to molecular biology analysis (Yeo, 2003, and Chen, 2008). The 8 Thai PEDV isolates are divided into 2 groups. The first group is in Group III which consists of PEDV isolates from late 2007 to 2008 (NIAH116099/07, NIAH116913/07, NIAH100541/08, NIAH100542/08 and NIAH104812/08). This group shared 98.8-99.1% similarities with the Chinese isolate JS-2004-2. The second group is in Group IV which comprises PEDV isolates during 1995 to 2004 (NIAH2013/95, NIAH380/98 and NIAH1795/04), This group shared 97.7-98% similarities with the prototype PEDV isolate, CV777.

This is the first report of the nucleotide sequences of the M gene of Thai PEDV isolates. The PEDV Group IV is separated from the other PEDV and forms an independent branch. The PEDV in group III have occurred in several outbreaks in Thailand during late 2007 until 2008. This group also includes one Chinese isolate, JS-2004-2, a new genotype in China (Chen, 2008). Up to date, the disease still causes outbreaks in some areas of Thailand. Here, we provide useful molecular epidemiological data to understand the dynamics of PEDV evolution and support earlier phylogenetic observations. Furthermore, to prevent of the PEDV outbreaks more effectively, the result of this study may provide a resource necessary for the development of an edible vaccine against PEDV infection by selection the PEDV isolate that matches with that currently present in Thailand.

Acknowledgments

We thank Dr. Thinnarat Srisuvan for the editing and the English-proofreading of the manuscript and our colleagues of Virology Section, National Institute of Animal Health, Bangkok, Thailand for laboratory assistance.

References

Bridgen, A., Duarte, M., Tobler, K., Laude, H. and Ackermann, M., 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* 74: 1795 - 804.

Cavanagh, D., Brian, D.A., Enjuanes, L., Holmes, K.V., Horzinek, M.C., Lai, M.M.C., Laude, H., Plagemann, P.G.W., Siddell, S.G., Spaan, W., Taguchi, F. and Talbot, P.J., 1994. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera. Arch. Virol. 135: 227 -

Chen, J.F., Sun, D.B., Wang, C.B., Shi, H.Y., Cui, X.C., Liu, S.W., Qiu, H.J. and Feng, L., 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. Virus Genes. 36: 355 - 364.

Duarte, M. and Laude, H., 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhea virus. *J. Gen. Virol.* 75:1195 - 200.

Jinghui, F and Yijing, L., 2005. Cloning and Sequence Analysis of the M gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus LJB/03. Virus Genes. 30: 69 - 73.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J., 1999. Viral taxonomy and nomenclature Veterinary Virology. In: Academic Press. San Diego. p. 23 - 42.

Pensaert, M.B. and Debouck, P., 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch. Virol. 58: 243 - 247.

Pensaert, M.B., Straw, B.E., Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J., 1999. Porcine epidemic diarrhea. In: Disease of swine, 8th ed. p.179 - 185.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. And Kumar, S. 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) soflware version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596 - 1599.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673 - 4680.

Yeo, S.G., Hernandez, M., Krell, P.J. and Nagy, E., 2003. Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. Virus Genes. 26: 239 - 246.