RESEARCH ARTICLE

Extraction of Primary Human Keratinocytes and Fibroblasts from Adult Foreskin

Khwandow Kunchana[1], Linda Chularojmontri[2], Wattanased Jarisarapurin[1], Wasan Sedtawong[3], Suvara Wattanapitayakul[1]

[1] *Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand*
[2] *Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani, Thailand*
[3] *Surgical Unit, Lerdsin Hospital, Bangkok, Thailand*

Abstract

Currently, the extraction of skin keratinocytes and fibroblasts for 2D and 3D cultures is an important tool for research in dermatology, including studies of activity and toxicity properties of agents that are in the process of skin product development. The objective of this study was to extract keratinocytes and fibroblasts from adult foreskin for research purpose. The foreskin samples were obtained from volunteer subjects who underwent foreskin surgery at Lerdsin Hospital. Following DPBS washing step, the skin samples were trimmed off fat and connective tissues. The foreskin was cut into small pieces and digested with dispase. The epidermis and dermis layers were separated and the epidermis layers were then trypsinized to obtain keratinocytes while the dermis was placed onto culture dish to extract fibroblasts. The keratinocytes in passage 1 and 2 grew normally in specific keratinocyte culture media. However, cells at passage 3 showed upward proliferation; thus, prohibiting further culture to increase cell number. On the other hand, fibroblasts proliferated well in normal culture media. In summary, the extraction of keratinocytes from adult foreskin is suitable for short-term cell culture experiment. If higher cell number is desired, pooled samples should be performed in order to obtain adequate cells for 3D skin model construction. In contrast, the extraction and cultivation of primary fibroblasts were easy for general cell culture laboratory.

Keywords: Foreskin, keratinocytes, cell culture, cell extraction, skin, epidermis

Address correspondence and reprint request to Suvara Wattanapitayakul, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand. E-mail address: suvara@gmail.com

การสกัดเคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่

ขวัญดาว คุณชนะ[1], ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี[2], วัฒนเศรษฐ์ จริศราภูริน[1], วสันต์ เศรษฐวงศ์[3], สุวรา วัฒนพิทยกุล[1]

[1] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ
[2] สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี
[3] กลุ่มงานศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลเลิดสิน กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน การสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์เพื่อเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติและ 3 มิติ เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการทำวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ และความเป็นพิษของสารที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่ เพื่อนำมาใช้สำหรับงานวิจัยด้านตจวิทยาต่อไป การสกัดเซลล์เริ่มจากนำตัวอย่างชิ้นหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่จากห้องผ่าตัดโรงพยาบาลเลิดสิน ส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ ล้างชิ้นเนื้อด้วย DPBS แล้วตัดเนื้อเยื่อไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ดิสเปส จากนั้นแยกชั้นผิวหนังกำพร้าและหนังแท้ออกจากกัน ชั้นหนังกำพร้าจะถูกนำไปสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์โดยการใช้เอนไซม์ทริปซิน ส่วนชั้นหนังแท้จะนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อแยกไฟโบรบลาสต์ต่อไป ผลการศึกษาลักษณะและการเจริญของเคอราติโนไซต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะ พบว่า เซลล์เคอราติโนไซต์ passage ที่ 1 และ 2 จะมีลักษณะและการเจริญที่ปกติ แต่ใน passage ที่ 3 จะเริ่มมีการแบ่งตัวขึ้นด้านบนทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไปได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้ในปริมาณมาก จึงเหมาะที่จะนำมาทำการทดลองต่อไป กล่าวโดยสรุปคือ การสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่เหมาะสำหรับนำเซลล์มาทำการศึกษาระยะสั้น แต่ถ้าต้องการเซลล์จำนวนมาก จำเป็นต้องสกัดรวบรวมจากตัวอย่างหลายตัวอย่างเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับสร้างเป็นโมเดลแบบ 3 มิติ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์แบบปฐมภูมิสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: หนังหุ้มปลายอวัยวะเพศ, เคอราติโนไซต์, การเลี้ยงเซลล์, การสกัดเซลล์, ผิวหนัง, หนังกำพร้า

บทนำ

ในปัจจุบันมีงานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังมากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพยาธิกำเนิดและการรักษาโรค รวมไปถึงการทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารสกัดสมุนไพรที่จะนำมาใช้กับผิวหนัง ซึ่งการศึกษาเหล่านี้เป็นสิ่งที่สำคัญที่นำไปสู่การรักษาและการป้องกันการเกิดโรคผิวหนัง รวมไปถึงการพัฒนานวัตกรรมหรือผลิตภัณฑ์ประเภทเวชภัณฑ์หรือเครื่องสำอาง เพื่อป้องกันการเกิดโรคผิวหนังจากแสงแดด หรือรังสียูวี และการบำรุงผิวพรรณให้มีสุขภาพดี อ่อนวัย และป้องกันการเกิดโรค รวมไปถึงการเกิดอาการแพ้ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับผิวหนัง ซึ่งนวัตกรรมเหล่านี้ล้วนมีมูลค่าอย่างมหาศาลต่อเศรษฐกิจในระดับประเทศ หรือระดับโลก

เซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิดเคอราติโนไซต์ (keratinocyte) เป็นทางเลือกหนึ่งในปัจจุบันที่มีนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านผิวหนังในลักษณะ *in vitro* ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่จะต่อยอดงานวิจัยในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ ตามลำดับ ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ร่วมกับเซลล์อื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของผิวหนัง เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ที่ทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) และคอลลาเจน ซึ่งจะรวมตัวกันเป็นกรอบโครงสร้าง (structural framework) ของเนื้อเยื่อในสัตว์และมนุษย์ กรอบโครงสร้างนี้เป็นองค์ประกอบหนึ่งในการสร้างโมเดลผิวหนังของมนุษย์แบบสามมิติ (human three-dimensional skin models) ซึ่งเป็นการสร้างผิวหนังเลียนแบบผิวหนังของมนุษย์ (skin equivalent) เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต้นก่อนที่จะนำไปศึกษาวิจัยต่อไปในขั้นคลินิก ซึ่งโมเดลนี้ได้รับการยอมรับและถูกนำมาใช้มากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับผิวหนังจริงของมนุษย์ และให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการทดลองในผิวหนังของมนุษย์ในทางคลินิก ซึ่งดีกว่าการใช้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง เนื่องจากผิวหนังของสัตว์นั้นแตกต่างจากผิวหนังของมนุษย์ค่อนข้างมาก ทำให้ผลที่ได้จากการทดลองในผิวหนังสัตว์ในบางครั้งไม่สามารถนำผลการทดลองไปประยุกต์ใช้กับมนุษย์ได้ นอกจากนี้ การใช้โมเดลผิวหนังของมนุษย์ยังเป็นทางเลือกหนึ่งของนักวิจัยที่จะช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองโดยไม่จำเป็น หรือให้ผลการทดลองที่ไม่ตรงเป้าหมาย ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อนโยบายลดการทดสอบสารเคมีในสัตว์ทดลอง (3R's: Reduce, Refine, Replace) ของประเทศในสหภาพยุโรป โดยมีข้อสรุปจาก 7th Amendment to EU Cosmetics Directive ให้ระงับการทดสอบองค์ประกอบของเครื่อง สำอางในสัตว์ทดลองตั้งแต่ปี ค.ศ. 2009 เป็นต้นไป ดังนั้น โมเดลผิวหนังมนุษย์จึงเป็นสิ่งที่ควรเลือกใช้สำหรับงานวิจัยทางตจวิทยาทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง

งานวิจัยทางตจวิทยาในปัจจุบันได้มีการนำเซลล์ผิวหนังของมนุษย์มาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ เช่น การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์ผิวหนังที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต การชักนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยสารในกลุ่มที่มีออกซิเจนว่องไวเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (reactive oxygen species, ROS)[1] รวมถึงการนำโมเดลผิวหนังแบบสามมิติไปใช้ในงานวิจัยอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาเรื่อง photo-aging[2] การศึกษาเรื่องการทำ skin grafting สำหรับประยุกต์ใช้ในผู้ป่วยแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก[3] การศึกษาด้านการกัดกร่อนและความระคายเคืองต่อผิวหนัง การศึกษาเรื่องการงอกของหลอดเลือดใหม่ที่ผิวหนัง[4] และการศึกษาด้าน

genotoxic กับผิวหนัง[5] เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์ผิวหนังของมนุษย์และโมเดลผิวหนังแบบสามมิติมีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาวิจัยทางด้านตจวิทยา และมีการประยุกต์ใช้ได้ในหลายด้าน

เซลล์ผิวหนังของมนุษย์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์สำหรับงานวิจัย มีจำหน่ายในรูปแบบ cell line และเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) จากผู้ผลิตหลายแห่ง ซึ่งเซลล์เหล่านี้ที่เป็น cell line มักมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไปจากเซลล์ดั้งเดิมที่ได้มาจากมนุษย์ เช่น มีอายุขัยมากว่าปกติ หรือมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการดัดแปลงเซลล์ดั้งเดิม ส่วนเซลล์ปฐมภูมินั้นเป็นเซลล์ที่สกัดได้จากมนุษย์และไม่ได้มีการดัดแปลง แต่ก็มีข้อจำกัดคือเซลล์เหล่านี้มีอายุขัยสั้นและมีราคาสูงมาก นอกจากเซลล์ข้างต้นที่ได้กล่าวไปแล้ว ยังมีผลิตภัณฑ์ผิวหนังแบบสามมิติจำหน่ายในปัจจุบันหลายชนิด เช่น EpiSkin™ model (L'Oréal, Lyon, France), EpiDerm™ model (MatTek Corporation, MA, USA), Reconstructed Human Epidermis (SkinEthic, Lyon, France), EST1000® skin model (CellSystems, Troisdorf, Germany), Phenion® Full-Thickness Skin Model, OS- REp (Open Source Reconstructed Epidermis) model (Henkel, Düsseldorf, Germany), Straticell model (Straticell, Les Isnes, Belgium), StrataTest® model (Stratatech, Madison, WI, USA), Labcyte model (Gamagori, Japan) และ Vitrolife-Skin™ model (Kyoto, Japan) เป็นต้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายทางการค้า แต่ข้อจำกัดคือราคาสูงมาก และต้องมีการขนส่งอย่างจำเพาะ เมื่อสืบค้นข้อมูลจนถึงปัจจุบัน ยังไม่พบตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย ดังนั้นการสกัดเซลล์ผิวหนังจากมนุษย์ และการสร้างโมเดลผิวหนังแบบสามมิติสำหรับนำมาใช้ในงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ จึงมีความจำเป็นเพื่อตอบสนองงานวิจัยทางด้านตจวิทยา และเพื่อให้การวิจัยในประเทศได้มีโอกาสพัฒนาขึ้นเทียบเคียงกับสากล รวมทั้งเพิ่มโอกาสในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับที่ใช้กับผิวหนังในเชิงพาณิชย์ ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญและมีตลาดด้านเครื่องสำอางทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จึงมีส่วนช่วยส่งเสริมงานวิจัยด้านตจวิทยาของประเทศได้ทางหนึ่ง โดยการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชายของผู้ใหญ่มาสกัดเคอราติโนไซต์และไฟโบบลาสต์เพื่อเลี้ยงให้ห้องปฏิบัติการสำหรับงานวิจัยทางด้านตจวิทยาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้สั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่ายผลิตภัณฑ์ของ Life Technologies (CA, USA) ได้แก่ DMEM (Dulbecco's modified eagle's media) high glucose, FBS (Fetal bovine serum), penicillin– streptomycin antibiotics, trypsin (2.5%) no phenol red, DPBS without calcium and magnesium ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะสำหรับเคอราติโนไซต์เป็นผลิตภัณฑ์ของ Lonza (Basel, Switzerland) ได้แก่ KBM-2 (keratinocyte basal medium-2), KGM-2 SingleQuots Kit supplements and growth factors เอนไซม์ dispase เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Life Technologies (CA, USA)

การขนส่งชิ้นเนื้อไปยังห้องปฏิบัติการ

โครงการนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลเลิดสิน (เลขที่ สธ 0306/13/130) ชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย (foreskin) ได้รับความอนุเคราะห์มาจากโรงพยาบาลเลิดสิน ภายหลังจากการผ่าตัดชิ้นเนื้อจะถูกใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มียาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินอยู่ร้อยละ 5 และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการขนส่งชิ้นเนื้อภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาที่ห้องปฏิบัติการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร

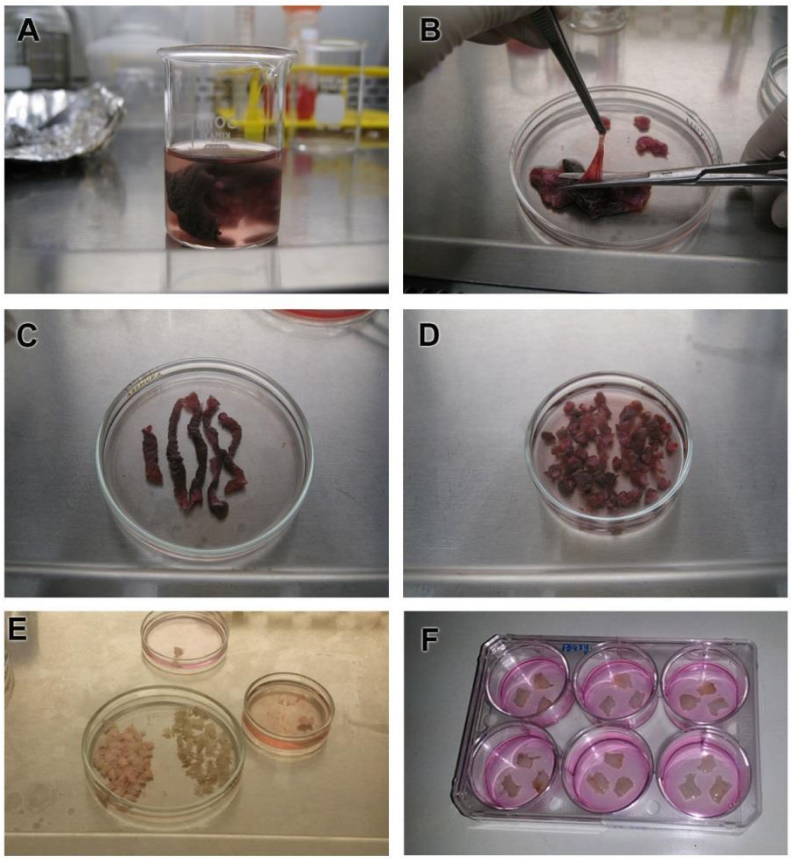
การเตรียมคอลลาเจนเคลือบภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำคอลลาเจนที่ได้มาจากการสกัดหางหนูมาเคลือบภาชนะเลี้ยงเซลล์เพื่อช่วยให้เซลล์สามารถยึดเกาะผิวภาชนะได้ดียิ่งขึ้น นำสารละลายคอลลาเจนที่ปราศจากเชื้อ มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 250, 1250 และ 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร แล้วเคลือบให้ทั่วภาชนะ ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายคอลลาเจนแต่ละภาชนะจะเท่ากับ 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร นำภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจนแต่ละความเข้มข้นไปบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายคอลลาเจนส่วนเกินที่ไม่เคลือบติดภาชนะเลี้ยงออกไป นำภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เปียกไปผึ่งลมให้แห้งภายใต้ตู้ปราศจากเชื้อ เก็บภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่แห้งแล้วไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน และควรล้างภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนด้วยสารละลาย 1X DPBS ปริมาณ 5 มิลลิลิตรก่อน 1 รอบก่อนนำมาเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์

การสกัดเซลล์และการเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง

การสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Aasen และ Izpisúa Belmonte[6] (รูปที่ 1) เริ่มต้นด้วยการล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลาย 1X DPBS ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินอยู่ร้อยละ 10 ใช้กรรไกรตัดส่วนของเนื้อเยื่อไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมดหรือให้เหลืออยู่น้อยที่สุด หลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดหรือกรรไกรตัดชิ้นเนื้อให้ได้ขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ dispase ใน Petri dish ขนาด 60 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 2.0 units/mL ที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืนหรือ 16-21 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนของ epidermis ออกจาก dermis โดยใช้คีมคีบนำ epidermis ที่แยกได้ใส่ลงไปใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีสารละลายทริปซินความเข้มข้นร้อยละ 2.5 อยู่ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน water bath เป็นเวลา 1 นาที ระหว่างที่ทำการบ่มต้องเขย่าและแกว่งหลอดทดลองเบา ๆ เพื่อให้เอนไซม์ ทริปซินทำงานได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงอย่างน้อย 6 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ผิวหนังหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของสารละลายด้านบนทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย

สารละลาย 1X DPBS ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200 g เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ แล้วนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 ทุก ๆ 3 วัน และเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 เซลล์จะถูกซับออกแล้วนำมาเลี้ยงใหม่ เป็น passage ถัดไป



รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย (A) ล้างชิ้นเนื้อด้วยสารละลาย 1X DPBS ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินอยู่ร้อยละ 10 ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จนกว่าเลือดที่ติดชิ้นเนื้อออกหมด (B) นำชิ้นเนื้อมาวางใน Petri dish ที่มีสารละลาย 1X DPBS อยู่พอท่วม ใช้กรรไกรและคีมคีบตัดเอาส่วนของเนื้อเยื่อไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกไปจากชิ้นเนื้อ (C) ใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อให้เป็นเส้น (D) ใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อให้ได้ขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ dispase (E) ใช้คีมคีบแยกส่วนของ epidermis ออกจาก dermis (F) นำส่วนของ dermis มาวางในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อยู่ เพื่อเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การสับและ seed เซลล์ผิวหนัง

เมื่อเซลล์เคอราติโนไซต์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 เซลล์จะถูกล้างด้วยสารละลาย 1X DPBS ในปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไปเปตดูดสารละลาย 1X DPBS ออกแล้วเติมเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ซึ่งผสมอยู่กับ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เซลล์จะถูกย่อยและหลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติม DMEM high glucose ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนเหลวด้านบนออก จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KGM-2 ลงไป ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน นำไปใส่ในภาชนะที่ถูกเคลือบด้วย collagen ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KGM-2 อยู่ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 ทุก ๆ 3 วัน และเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 เซลล์จะถูกสับออกมาแล้วนำไปเลี้ยงใหม่เป็น passage ถัดไป

การเก็บเซลล์ผิวหนัง

เซลล์เคอราติโนไซต์ที่มีความหนาแน่นร้อยละ 80 จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ซึ่งผสมอยู่กับ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเซลล์หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high glucose ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200 g เป็นเวลา 5 นาทีเทส่วนของสารละลายทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1X DPBS ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200 g เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ ผสมเซลล์เคอราติโนไซต์ใน freezing media ที่ประกอบไปด้วยสารละลาย DMSO และอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ตามลำดับ ดูดสารละลายใส่ cryogenic vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บในกล่องปรับอุณหภูมิ (freezing container) ทันที นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วแช่แข็งเซลล์ในถังไนโตรเจนเหลว

การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high glucose ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินอยู่ร้อยละ 1 ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม ๆ ละ 800 ไมโครลิตร จากนั้นใช้คีมคีบชิ้นเนื้อที่เป็นส่วนของ dermis มาวางลงบนหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 คอยสังเกตและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระดับที่พอดีชิ้นเนื้อ (200 ไมโครลิตร) ห้ามให้อาหารเลี้ยงเซลล์แห้งหรือใส่อาหารเลี้ยงเซลล์มากเกินไปจนชิ้นเนื้อลอย เมื่อเวลาผ่านไป 5-7 วัน นำภาชนะเลี้ยงเซลล์มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะสังเกตเห็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มเคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อและเกาะกับผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ ให้ใช้คีมคีบชิ้นเนื้อเยื่อ dermis ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ และล้างภาชนะเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมด้วย 1X DPBS จำนวน 2 รอบ

จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมบ่มเซลล์ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน และเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 เซลล์จะถูกย่อยออกมาแล้วนำมาเลี้ยงใหม่

การเก็บเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเซลล์หลุดออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีส่วนผสมของซีรั่มอยู่ร้อยละ 10 เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 125 g เป็นเวลา 5 นาทีเทส่วนของสารละลายด้านบนทิ้งและกระจายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ใน freezing media ที่ประกอบไปด้วยสารละลาย DMSO ซีรั่ม และอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ต่อ 5 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ cryogenic vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บในกล่องปรับอุณหภูมิทันทีนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสไว้ค้างคืน และเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

การกำจัดชิ้นเนื้อและเซลล์ที่เหลือหลังจากการทดลอง

หลังสิ้นสุดโครงการวิจัย ชิ้นเนื้อและเซลล์ที่เหลือจากการโครงการวิจัยจะถูกนำไปทำลายด้วยการ autoclave และถูกกำจัดตามระบบการกำจัดขยะของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลการทดลอง

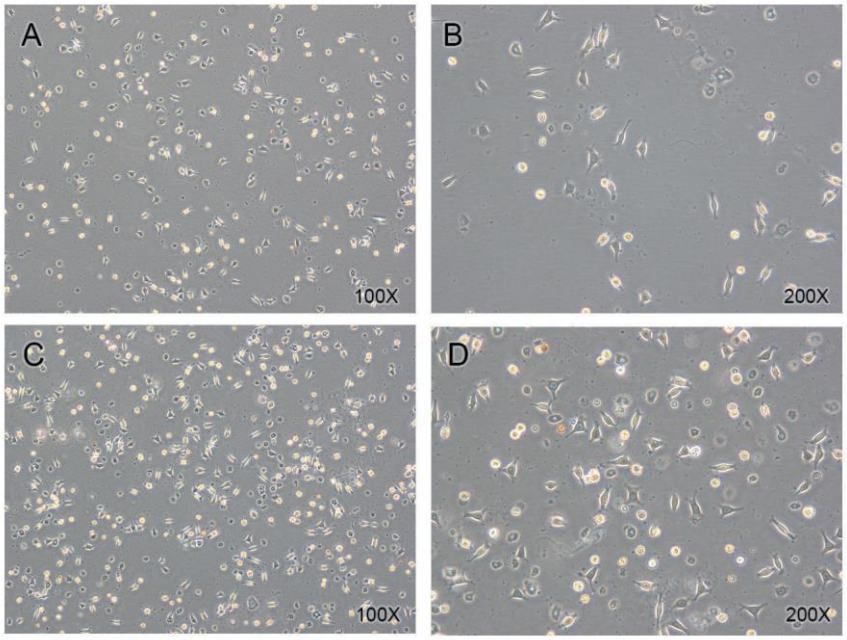
จากผลการทดลองสกัดชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลเลิดสิน จำนวนทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2559 ซึ่งอายุของอาสาสมัครที่ได้รับการผ่าตัดชิ้นเนื้ออยู่ระหว่าง 1-47 ปี โดยการสกัดจะนำชิ้นเนื้อมาย่อยด้วยเอนไซม์ dispase และทริปซินเพื่อสกัดเอาเซลล์เคอราติโนไซต์ออกมาและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ KBM-2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ประสบความสำเร็จในการสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์จากชิ้นเนื้อ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 31) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 54) โดยตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อรา 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 31) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดของการสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชายของกลุ่มตัวอย่างอายุระหว่าง 1-47 ปี จำนวนทั้งหมด 13 ตัวอย่าง

No.	Age (years)	Keratinocytes		Fibroblast	
		Cell passage no.	Thawing	Cell passage no.	Cell survival after thawing
1	20	Not survive		P.4	Yes
2	27	Not survive		P.3	Yes
3	15	Not survive		P.4	Yes
4	38	Not survive		P.3	Yes
5	19	Fungal Contamination			
6	1	Not survive		Not survive	
7	29	P.4	N/A	Not survive	
8	11	P.4	N/A	P.4	Yes
9	32	Fungal Contamination			
10	20	P.4	N/A	P.3	Yes
11	17	P.2	N/A	P.3	Yes
12	47	Fungal Contamination			
13	43	Fungal Contamination			

ผลของความหนาแน่นต่อการยึดเกาะและการกระจายตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์

เมื่อทำการสกัดเซลล์ผิวหนังออกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเคอราติโนไซต์โดยเฉพาะและบ่มเซลล์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 พบว่าเซลล์เริ่มเข้าเกาะกับภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งเซลล์จะเข้าเกาะและแผ่อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 3 ชั่วโมงภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ ยิ่งความหนาแน่นของเซลล์เริ่มแรกมีความหนาแน่นมากเท่าไหร่จะยิ่งเพิ่มโอกาสให้เซลล์เข้าเกาะกับผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ได้มากเท่านั้น โดยพบว่า การเริ่มต้นใส่เซลล์ในภาชนะให้ครอบคลุมพื้นที่มากกว่าร้อยละ 40 จะมีโอกาสทำให้เซลล์อยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าการใส่เซลล์เริ่มต้นที่ครอบคลุมพื้นที่ประมาณร้อยละ 20 (รูปที่ 2A, 2C) นอกจากนี้เซลล์ที่อยู่ใกล้กันจะไปเหนี่ยวนำให้เซลล์บริเวณข้างเคียงเกิดการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น จะสังเกตได้ว่าเซลล์ที่เกาะกันอยู่เป็นกลุ่มจะมีความสามารถในการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าเซลล์ที่เกาะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แต่เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มแรกมีน้อยจะทำให้การเลี้ยงเซลล์ในรุ่นแรกใช้ระยะเวลานานและเซลล์อาจมีความผิดปกติ แล้วหลุดลอยตายในที่สุด ดังนั้นปัจจัยในด้านความหนาแน่นของเซลล์ที่สกัดได้และถูกนำมาเลี้ยงจะส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์เป็นอย่างมาก (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการยึดเกาะและการกระจายตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ 10 passage 1 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง. A, B รูปภาพจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ 1 เมื่อเริ่มต้นใส่เซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ครอบคลุมพื้นที่ประมาณร้อยละ 20 ของภาชนะเลี้ยงเซลล์; C, D รูปภาพจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ 2 ครอบคลุมพื้นที่ประมาณร้อยละ 50 ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์ผิวหนังยึดเกาะกับผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์และมีการกระจายตัวได้ดี

ผลของคอลลาเจนต่อการยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์

เซลล์ผิวหนังที่สกัดออกมาในรุ่นแรกนั้น จะถูกนำมาเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบหรือไม่เคลือบด้วยคอลลาเจน เพื่อสังเกตดูลักษณะของเซลล์ว่าคอลลาเจนมีส่วนช่วยในการเข้าเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์หรือไม่ จากการทดลองพบว่า ภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนจะช่วยให้เซลล์ผิวหนังเข้าเกาะได้ดีกว่าภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เคลือบคอลลาเจน ทั้งนี้เนื่องจากคอลลาเจนเป็นส่วนหนึ่งของเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ที่พบในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยยึดเกาะเซลล์ไว้ด้วยกัน จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอลลาเจนที่จะนำมาใช้เคลือบภาชนะเลี้ยงเซลล์ต่อการยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง โดยใช้ความเข้มข้นของคอลลาเจนในการทดสอบ 3 ความเข้มข้นได้แก่ 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่า ประสิทธิภาพการเข้าเกาะของเซลล์ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์นาน 3 ชั่วโมง จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของคอลลาเจน นั่นคือความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ใช้เคลือบภาชนะเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร จะช่วยให้เซลล์เกาะได้ดีที่สุด แต่เลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เซลล์ผิวหนังสามารถแบ่งตัวได้ดีที่สุด และที่ความเข้มข้นของ

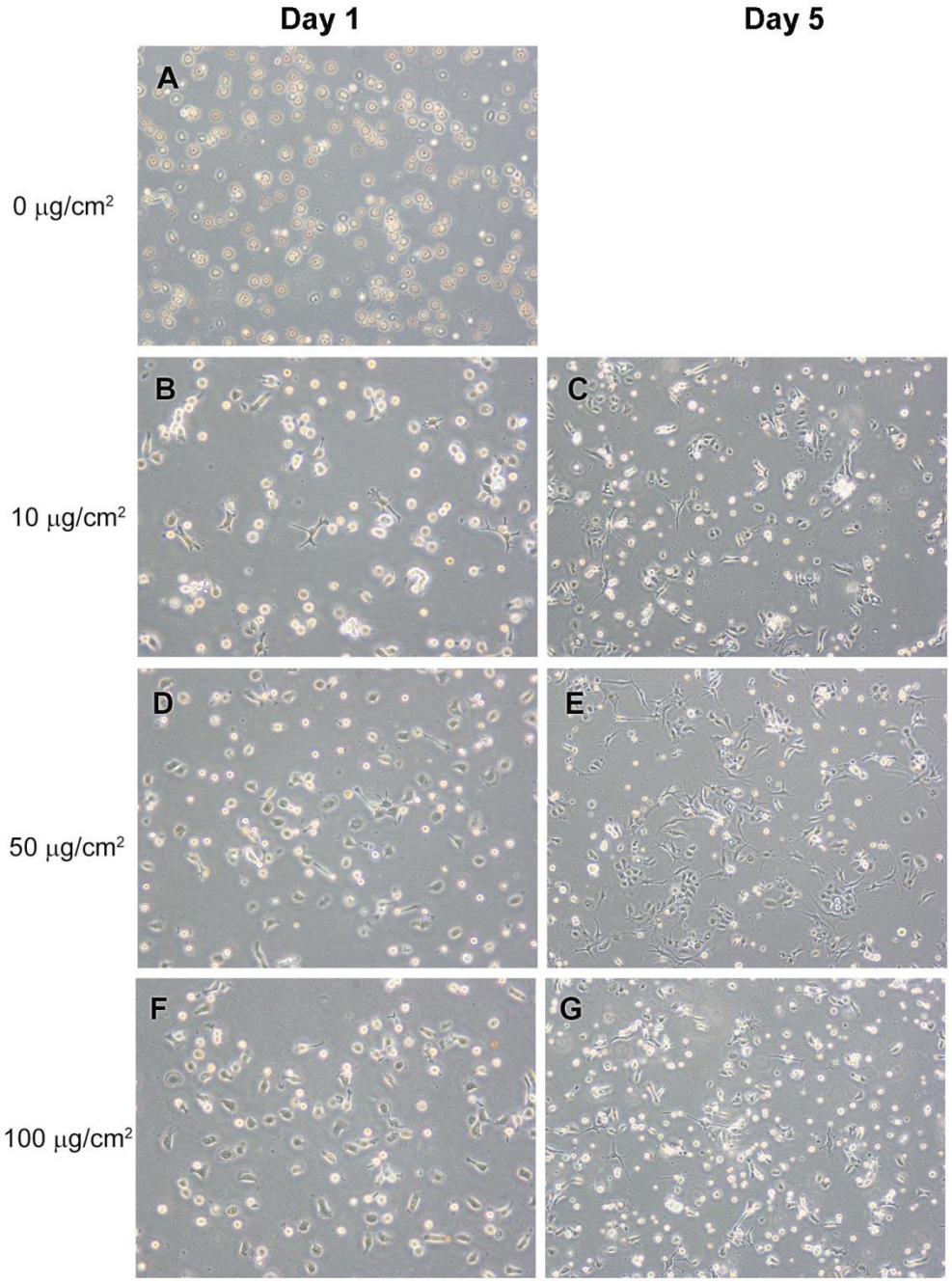
คอลลาเจนสูง ๆ หรือ 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยมาก เซลล์เคอราติโนไซต์มีรูปร่างผิดปกติและเซลล์ลอยตายอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าเซลล์ผิวหนังที่สกัดออกมาเลี้ยงในรุ่นแรก จะต้องเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะส่งเสริมให้เซลล์เคอราติโนไซต์เข้าเกาะกับผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์และแบ่งตัวได้ดีที่สุด (รูปที่ 3)

การแบ่งตัวและการพัฒนาของเซลล์ผิวหนังมนุษย์

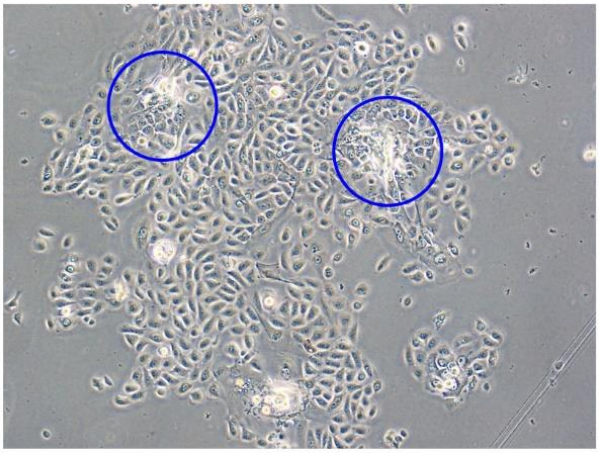
โดยปกติแล้วเซลล์เคอราติโนไซต์ที่สกัดมาได้จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่มและเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดกระบวนการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์ เซลล์จึงเกิดกระบวนการแบ่งตัวเพียงชั้นเดียวและแบ่งตัวออกทางด้านข้างเท่านั้น แต่เซลล์ผิวหนังที่สกัดมาได้ในการศึกษานี้เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์โดยเฉพาะ จากการสังเกตดูลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่มีขอบเขตอยู่ด้านนอกจะสังเกตเห็นว่าเซลล์ผิวหนังจะมีการแบ่งตัวและกระจายออกมาทางด้านข้างในลักษณะที่เซลล์จะเรียงตัวกันเพียงชั้นเดียว (monolayer) ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างขนาดเล็ก หลายเหลี่ยมและมีมิติ แต่เซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ในบริเวณภายใน เนื่องจากไม่มีพื้นที่ด้านข้างเหลือให้เซลล์แบ่งตัวและกระจายออกมา เซลล์จึงแบ่งตัวหนาแน่นและเบียดกันขึ้นทางด้านบน จึงทำให้เห็นลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในลักษณะหลายชั้น และเซลล์เคอราติโนไซต์เหล่านี้เกิดกระบวนการพัฒนา ทำให้เซลล์ที่อยู่ชั้นบนสุดมีลักษณะแบนบาง ไม่มีมิติ รูปร่างของเซลล์มีขนาดใหญ่และรูปร่างไม่แน่นอน ทั้งนี้เกิดจากไซโทพลาสซึมมีการขยายตัวแต่ขนาดของนิวเคลียสยังคงเท่าเดิม ซึ่งเหมือนกับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ที่อยู่ในชั้นนอกที่มีสารเคอราตินเคลือบอยู่ ในท้ายที่สุดแล้วเซลล์ที่อยู่ชั้นบนสุดนี้จะเกิดกระบวนการตายและหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่อยู่ด้านล่างถัดลงมาก็จะแบ่งตัวขึ้นมาทดแทน (รูปที่ 4)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เคอราติโนไซต์

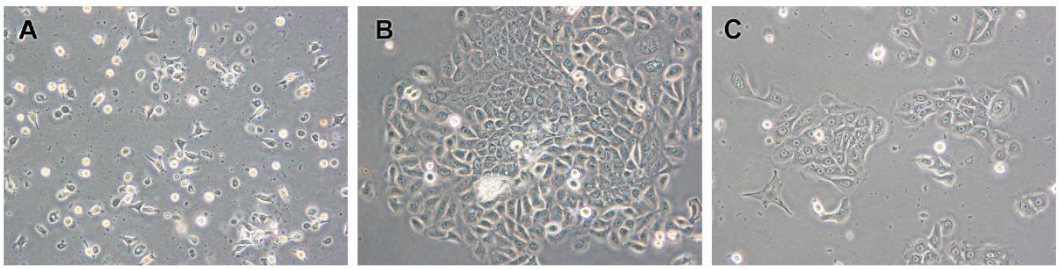
หลังจากสกัดเซลล์ผิวหนังจากชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชายออกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เฉพาะต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งปราศจากซีรั่ม พบว่าเซลล์ที่เกาะที่ผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์และเจริญเติบโตได้นั้นไม่ได้มีเซลล์เคอราติโนไซต์เพียงชนิดเดียว แต่มีเซลล์ชนิดอื่นปะปนมาด้วย ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของเซลล์เหล่านั้นได้อย่างแน่ชัด ทำให้เซลล์ที่สกัดมาได้และนำมาเลี้ยงนั้นมีลักษณะไม่เป็น homogeneous ที่ประกอบไปด้วยเซลล์แปลกปลอมต่าง ๆ เซลล์เหล่านี้จะเกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ และเจริญเติบโตไปพร้อมกับเซลล์ผิวหนังในรุ่นแรก อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์นั้นมีความจำเพาะต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ จึงช่วยคัดเลือกให้มีเพียงเซลล์เคอราติโนไซต์เท่านั้นที่จะสามารถอยู่รอดได้ แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดอื่น ทำให้เซลล์แปลกปลอมเหล่านั้นไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และหลุดลอยตายไปในที่สุด ทำให้การเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ในรุ่นที่ 2 และ 3 พบว่าลักษณะของเซลล์ผิวหนังมีความเป็น homogeneous มากยิ่งขึ้น ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่พบนั้นมีลักษณะเป็นหลายเหลี่ยม (polygonal) ขนาดเล็กและมีหลายนิวเคลียส (รูปที่ 5)



รูปที่ 3 การยึดเกาะและการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ passage 1 วันที่ 1 และวันที่ 5 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เคลือบหรือเคลือบสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างกัน (A) เซลล์เคอราติโนไซต์ที่ไม่ได้เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจน (เซลล์ตายตั้งแต่วันที่ 0); (B, C) เซลล์เคอราติโนไซต์ที่เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยสารละลายคอลลาเจนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร; (D, E) 50 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ (F, G) 100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร



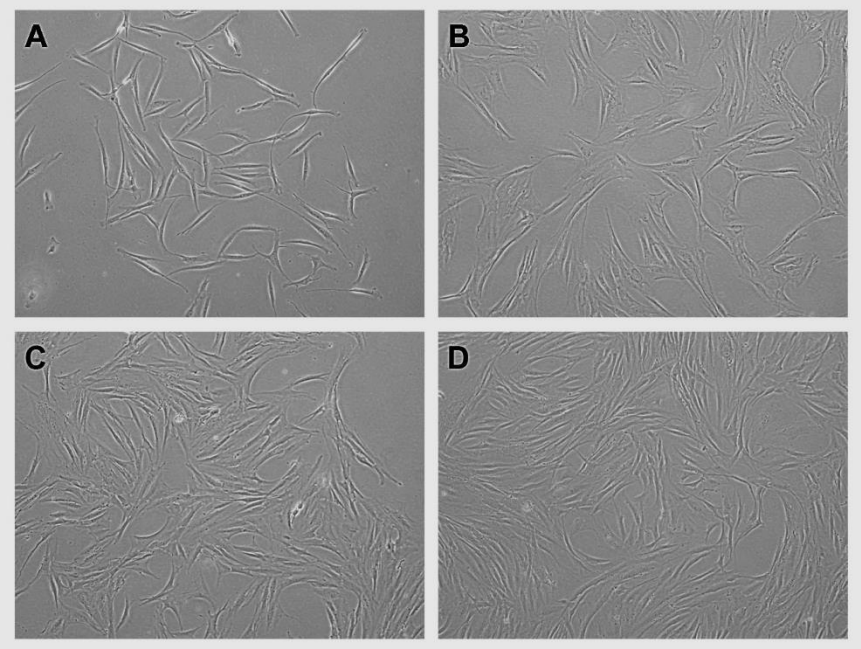
รูปที่ 4 ขอบเขตของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เจริญเติบโตอยู่เป็นกลุ่ม ซึ่งแบ่งตัวและพัฒนาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ 10, passage 2 วันที่ 10 กำลังขยาย 100 เท่า (ในวงกลมคือเซลล์ที่มีการแบ่งตัวขึ้นด้านบน และเกิดกระบวนการพัฒนา)



รูปที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่สกัดมาจากชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ 10 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เฉพาะต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ (A) เซลล์เคอราติโนไซต์ใน passage 1 วันที่ 2; (B) เซลล์เคอราติโนไซต์ใน passage 2 วันที่ 9 และ (C) เซลล์เคอราติโนไซต์ใน passage 3 วันที่ 13 (กำลังขยาย 200 เท่า)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

จากการสกัดเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย แล้วเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนผสมของ FBS ร้อยละ 10 พบว่าเซลล์มีรูปร่างเรียวและแบนยาว มีแขนงสองข้าง คล้ายกระสวย เซลล์ที่สกัดได้สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี ในแต่ละ passage เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีรูปร่างที่เหมือนกัน และไม่เห็นความเปลี่ยนแปลงหรือเกิดความผิดปกติของเซลล์ เมื่อเทียบกับ passage แรกที่สกัดได้ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สกัดมาจากชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ 10 ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (A) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน passage 1 วันที่ 7; (B) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน passage 2 วันที่ 15; (C) เซลล์ไฟโบร-บลาสต์ใน passage 3 วันที่ 20 และ (D) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน passage 4 วันที่ 28 ซึ่งรูปทั้งหมดมีกำลังขยาย 100 เท่า

วิจารณ์

ผิวหนังของมนุษย์เป็นอวัยวะขนาดใหญ่ที่ห่อหุ้มร่างกายของมนุษย์ และเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยป้องกันร่างกายโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมภายนอก หรือสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ร่างกาย หรือแม้แต่รังสีอัลตราไวโอเลตที่เป็นอันตราย ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย หรือเกิดโรค เช่น ติดเชื้อ ภูมิแพ้ หรือแม้แต่โรคมะเร็ง ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง ในปัจจุบันสามารถป้องกันผิวหนังจากรังสีชนิดนี้ได้ด้วยผลิตภัณฑ์กันแดดต่าง ๆ ที่ผ่านการคิดค้นวิจัย ในองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์กันแดดเหล่านี้มีส่วนผสมแตกต่างกันออกไปตามผู้ผลิตที่ได้วิจัยและพัฒนา ซึ่งปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเลต ทั้งที่เริ่มศึกษาในห้องทดลองไปจนถึงสัตว์ทดลอง และการศึกษาในมนุษย์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ และวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดและเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่ในห้องปฏิบัติการเพื่อนำมาสร้างเป็นโมเดลผิวหนังสามมิติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยต่าง ๆ จากผลการทดลองพบว่าสามารถสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศผู้ใหญ่ได้ โดยมีอัตราความสำเร็จในการสกัดไฟโบรบลาสต์มากกว่าเคอราติโนไซต์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเคอราติโนไซต์มีขั้นตอนและกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยากกว่าการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงเคอราติโนไซต์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับการนำไปใช้สร้างโมเดลผิวหนังสามมิติ ควรจะรวบรวมจากตัวอย่างหลาย ๆ ตัวอย่าง ส่วนการสกัดและเลี้ยงไฟโบรบลาสต์สามารถทำได้ง่ายและเพาะเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป

จำนวนความชุกของตัวอย่างที่เก็บได้จากโรงพยาบาลเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสกัดเซลล์ให้ได้ปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยที่มาผ่าตัดเอาหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศออกในภาวะที่ไม่มีพยาธสภาพของโรคค่อนข้างน้อยคือ มีเพียง 13 ตัวอย่างในระยะเวลา 1 ปีและตัวอย่างที่ได้มานั้น แม้จะไม่มีรอยโรค แต่ก็มักมีการติดเชื้อราค่อนข้างหนาแน่น ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเซลล์ต่อไปหลังจากสกัดเซลล์ได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อราถึง 1 ใน 3 ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากการเก็บตัวอย่างจากต่างประเทศที่มีประชากรที่นับถือศาสนาอิสลาม มีการขลิบหนังปลายอวัยวะเพศหลังแรกคลอดไม่นาน และเป็นกระบวนการที่ทำในโรงพยาบาลทั้งหมด ทำให้มีแหล่งตัวอย่างที่เพียงพอต่อการทำวิจัย[7] นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยด้านจำนวนของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่นำมาเลี้ยงจะต้องมีความหนาแน่นที่เหมาะสมจึงจะทำให้เซลล์ในรุ่นแรกเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ดี ซึ่งความหนาแน่นของเซลล์เคอราติโนไซต์มีผลต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากการศึกษาใน HaCaT cells ซึ่งเป็นเซลล์เคอราติโนไซต์ที่มีความคล้ายคลึงกับเซลล์เคอราติโนไซต์ในผิวหนังของมนุษย์เป็นอย่างมาก พบว่า HaCaT cells จะตอบสนองต่อ chemokine ได้ดีขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) ซึ่งจัดเป็น chemoattractant ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ถูกตรวจพบในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งการตอบสนองต่อ chemo-attractant เหล่านี้ของเซลล์เคอราติโนไซต์จะช่วยส่งผลทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้น[8] นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของเซลล์เคอราติโนไซต์ส่งผลต่อการกระจายตัวของเซลล์แต่จะไม่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์[9] ทั้งนี้เมื่อเคลือบภาชนะเลี้ยงเซลล์ด้วยคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรพบว่าเซลล์สามารถเข้าเกาะกับผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์และแบ่งตัวได้ดีที่สุด เช่นเดียวกันกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนส่งผลให้เซลล์เคอราติโนไซต์มีประสิทธิภาพในการเข้าเกาะกับผิวภาชนะมากถึงร้อยละ 70[10] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายคอลลาเจนจัดเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ที่เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดกลไก cell-to-matrix interaction ในการช่วยให้เซลล์เคอราติโนไซต์เข้าเกาะ เนื่องจากในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะประกอบไปด้วยโปรตีน integrin ที่แทรกตัวอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ ซึ่งจะประกอบไปด้วย α และ β subunits integrin สามารถถูกกระตุ้นได้สองทิศทางด้วยกัน ได้แก่ การกระตุ้นจากภายในเซลล์โดยการเข้าจับของโปรตีนในบริเวณหางของตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึม และการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์นั้นสามารถถูกกระตุ้นโดยลิแกนที่หลากหลายซึ่งจะเข้ามาจับกับตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ ซึ่งกลไกการตอบสนองของเซลล์ดังที่กล่าวไปนี้เรียกว่า Inside-out and outside-in signaling ซึ่งผลของการกระตุ้น integrin นั้นจะส่งผลทำให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวน กระจายตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์[11] แต่ทั้งนี้เมื่อเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นสูง (100 ไมโครกรัมต่อ

ตารางเซนติเมตร) โครงสร้างของคอลลาเจนอาจจะโยงยึดกับเซลล์ได้ดีเกินไปทำให้โครงสร้างของเซลล์ไม่เหมาะต่อการแบ่งตัว นอกจากนี้ ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่นำมาใช้ในการละลายคอลลาเจนอาจจะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ทำให้เซลล์เกิดรูปร่างผิดปกติ ลอยตาย และมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการแบ่งตัวได้เช่นกัน

ในการสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์พบว่าใน passage ที่ 1 และ 2 เซลล์ยังมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตปกติ ทั้งในรูปร่างและลักษณะของเซลล์ แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ถึง passage ที่ 3 พบว่าเซลล์มีรูปร่างลักลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป รวมไปถึงมีการพัฒนาของเซลล์ โดยที่เซลล์มีการแบ่งตัวซ้อนกันขึ้นไปชั้นบนและเปลี่ยนรูปร่าง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Soroka และคณะ ที่พบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ KGM-2 ที่ปราศจากซีรั่ม และมีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำ เซลล์ใน passage ต้น ๆ คือ 1 และ 2 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปกติ แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ถึง passage หลัง ๆ คือ 4 และ 5 เซลล์มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติไป และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง รวมไปถึงเกิดการพัฒนาของเซลล์ทำให้เกิดการชราของเซลล์[12] ทั้งนี้สาเหตุที่เซลล์เกิดกระบวนการพัฒนาอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนของการสกัดเซลล์นั้นได้มีการใส่เอนไซม์ทริปซินเพื่อย่อยเซลล์ผิวหนังให้หลุดออกจากเนื้อเยื่อ epidermis นั้น จะต้องมีกระบวนการหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซินโดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีส่วนผสมซีรั่มอยู่ในปริมาณร้อยละ 10 แล้วล้างออกด้วย DPBS ซึ่งการที่ใช้ซีรั่มนั้นอาจมีส่วนชักนำให้เกิดกระบวนการพัฒนาของเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างและการแบ่งตัวผิดปกติ แล้วทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่การทำงานและตายในที่สุด นอกจากนี้ ในการสกัดเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในครั้งต่อไป ควรจะสกัดมาจากชิ้นเนื้อหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศชายของเด็กแรกเกิด แต่เก็บตัวอย่างได้ยากในประเทศไทย และควรจะทำการขนส่งชิ้นเนื้อมายังห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ หรือภายในระยะเวลาที่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง และควรจะใส่ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แต่ก็อาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์ด้วย

สำหรับการสกัดไฟโบรบลาสต์ เซลล์มีโอกาสรอดชีวิตสูงกว่าเคอราติโนไซต์ และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทั่วไปชนิด DMEM ที่มีซีรั่มเป็นองค์ประกอบเสริมในปริมาณร้อยละ 10 เซลล์มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ดี ซึ่งในแต่ละ passage เซลล์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญเติบโตที่เป็นแบบแผนเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการสกัดเซลล์ไฟโบบลาสต์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยต่อไปได้

สรุป

การสกัดเคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์จากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศในผู้ใหญ่สามารถทำได้ แต่อาจจำเป็นต้องใช้คอลลาเจนเคลือบที่ภาชนะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มการเกาะติดและการอยู่รอดของเซลล์เมื่อทำการสกัดในวันแรก ส่วนการสกัดไฟโบรบลาสต์ทำได้ง่ายและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้มากเพียงพอเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (2558) และทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเศก (คปก.) (PHD58K0048 และ PHD57K0036)

เอกสารอ้างอิง

1. Kim HB, Yoo BS. Propolis inhibits UVA- induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells by scavenging ROS. Toxicol Res. 2016;32(4):345-51.
2. Duval C, Cohen C, Chagnoleau C, Flouret V, Bourreau E, Bernerd F. Key regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging. PloS One. 2014;9(12):e114182.
3. Guerret S, Govignon E, Hartmann DJ, Ronfard V. Long- term remodeling of a bilayered living human skin equivalent (Apligraf) grafted onto nude mice: immunolocalization of human cells and characterization of extracellular matrix. Wound Repair Regen. 2003;11(1):35-45.
4. Black AF, Hudon V, Damour O, Germain L, Auger FA. A novel approach for studying angiogenesis: a human skin equivalent with a capillary- like network. Cell Biol Toxicol. 1999;15(2):81-90.
5. Claus S, Fischer J, Megarbane H, Megarbane A, Jobard F, Debret R, et al. A p. C217R mutation in fibulin- 5 from cutis laxa patients is associated with incomplete extracellular matrix formation in a skin equivalent model. J Invest Dermatol. 2008;128(6):1442-50.
6. Aasen T, Izpisua Belmonte JC. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2010;5(2):371-82.
7. Lowenau LJ, Zoschke C, Brodwolf R, Volz P, Hausmann C, Wattanapitayakul S, et al. Increased permeability of reconstructed human epidermis from UVB-irradiated keratinocytes. Eur J Pharm Biopharm. 2017;116:149-54.
8. Szabo I, Wetzel MA, Rogers TJ. Cell-density-regulated chemotactic responsive-ness of keratinocytes *in vitro*. J Invest Dermatol. 2001;117(5):1083-90.
9. Malcovati M, Tenchini ML. Cell density affects spreading and clustering, but not attachment, of human keratinocytes in serum- free medium. J Cell Sci. 1991;99 (Pt 2):387-95.
10. Liu SC, Karasek M.Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. J Invest Dermatol. 1978;71(2):157-62.
11. O'Toole EA.Extracellular matrix and keratinocyte migration. Clin Exp Dermatol. 2001;26(6):525-30.

12. Soroka Y, Ma'or Z, Leshem Y, Verochovsky L, Neuman R, Bregegere FM, et al. Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. Exp Gerontol. 2008;43(10):947-57.