Srinagarind Hosp Med J 1992; 7(1) 4-17

เปิดโฉมห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง

ตอนที่ 1 : รู้จักการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) กันเถอะ

ปนัดดา จันทราโชติวิทย์ วท.ม.(ชีวเคมี) *ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Open to Tissue Culture Laboratory
Part 1 : Introduction to cell culture

Panadda Juntrachotiwit, M.Sc. (Biochem)
Department of Radiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

The introduction of cell-tissue culture technology into the biological research since 1907 has been a further step forward towards the finding of answers to many problems important for the well-being of mankind. The achievement of cell culture depends on several factors : experiences of the cell biologists, sterile room, culture equipment, culture media recipes, and the utmost important is the basic understanding of the cell culture nature. They are all important for the setting up of cell culture laboratory for practical purpose. This article is the summary of the detail of basic knowledges on tissue culture laboratory practice. The topics to be covered are 1) cell biology, 2) type of cell culture (primary culture, established cell line culture, continuous cell line, finite cell line), 3) methodology (suspended cell culture, monolayer cell culture, microcarrier culture), and 4) factors affecting the culture techniques. Part two covers the culture media, sterilization procedure, laboratory equipments, biosafety, primary techniques, and its application in biomedical research. It may be useful for those who are going into this fascinating field of searching for knowledge to be applied later.

บทคัดย่อ

วิทยาการในปัจจุบันได้มีการนำเอาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองเข้ามาใช้เป็นบทเริ่มต้นในการวิจัยเพื่อสืบเสาะค้นหาสิ่งที่มนุษย์ยังสงสัยตลอดจนค้นคว้าต่อไปถึงสิ่งที่ดีที่สุดสำหรับมนุษย์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองนี้ต้องประกอบขึ้นด้วยปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญหลายประการ นับตั้งแต่ผู้ปฏิบัติ

ที่มีความชำนาญ, ห้องปราศจากเชื้อ, อุปกรณ์เสริมสำหรับเพาะเลี้ยงตลอดจนอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรต่าง ๆ และที่สำคัญที่สุดก็คือ ความเข้าใจถึงคุณสมบัติพื้นฐานบางประการของเซลล์ที่เลี้ยง ฉะนั้น หลักการเบื้องต้นที่ถูกต้องจึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่จะนำเอาการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองไปใช้งาน บทความนี้เป็นเพียงการรวบรวมความรู้โดยพื้นฐานของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองเพียงเพื่อเสนอให้ผู้สนใจได้ใช้เป็นบันไดเพื่อศึกษาค้นคว้าต่อไป

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง *(in vitro)* โดยใช้ภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม อาทิเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณพอเหมาะ อุณหภูมิ ตลอดจนการใช้ยาปฏิชีวนะช่วยป้องกันแบคทีเรียและราต่าง ๆ นั้น ได้พัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวางตั้งแต่ปี ค.ศ.1907 เป็นต้นมาจนกระทั่งถึงปัจจุบัน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลายแขนง โดยเทคนิคในการเลี้ยงแตกต่างกันตามลักษณะของงานที่ใช้ เช่น slide techniques ใช้สำหรับศึกษาโครงสร้างของเซลล์ (morphological studies), test-tube culture ใช้ในงานทางชีวเคมีและไวรัส ส่วน flask methods มักใช้ในกรณีที่ต้องการผลิตผลมาก ๆ (large-scale method) ซึ่งปัจจุบันงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้ก้าวสู่งานระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตวัคซีนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าช่วย การผลิต Monoclonal Antibody ต่อ antigen ต่าง ๆ จากนั้นนำไปทำน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย antigen นั้น ๆ ซึ่งให้ผลไวและน่าเชื่อถือกว่าการใช้ Polyclonal Antibody จากสัตว์ทดลอง เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเซลล์เข้าช่วยในงานทางวินิจฉัยโรคแล้ว ยังใช้ในงานค้นคว้าในการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ก่อนที่จะนำยาเหล่านั้นเข้ามาใช้ในมนุษย์ โดยการนำเอาเซลล์มะเร็งมาเลี้ยงและทดสอบยาตำรับต่าง ๆ ว่า ทำให้เซลล์มีการตอบสนองเป็นอย่างไร ในปัจจุบันหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการค้นคว้าวิจัยจึงมีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ขึ้น ฉะนั้นพื้นฐานความรู้ทางการเพาะเลี้ยงเซลล์ คุณสมบัติของเครื่องมือที่ใช้และอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนข้อปลีกย่อยที่สำคัญต่าง ๆ จึงจำเป็นสำหรับการเริ่มต้นงานเหล่านี้

ถ้าท่านเป็นผู้หนึ่งที่ต้องการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง ก็คงต้องเริ่มต้นด้วยการรู้จักชีววิทยาของเซลล์นั้น ๆ ก่อน

ชีววิทยาของเซลล์ (Cell Biology)

โครงสร้างของเซลล์ยูคาริโอต (Eucaryote) (รูปที่ 1) โดยทั่วไป แบ่งเป็น 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนนิวเคลียสและซัยโตพลาสม์ ในส่วนของซัยโตพลาสม์ประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญ ๆ หลายอย่าง ได้แก่ ไมโตกอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งเป็นแหล่งที่ผลิตพลังงานให้กับเซลล์จะพบอยู่ในเซลล์สัตว์กับเซลล์พืชเท่านั้น ไรโบโซม (ribosome) เป็นแหล่งผลิตโปรตีน และมีอยู่ในเซลล์ทุกชนิด เอ็นโดพลาสมิคเรติคูลัมชนิดเรียบ (smooth endoplasmic reticulum) ทำหน้าที่ช่วยการขนส่งสารต่าง ๆ ผ่านเซลล์ พบอยู่ในเซลล์สัตว์และเซลล์พืชเท่านั้น เอ็นโดพลาสมิคเรติคูลัมชนิดหยาบ (rough endoplasmic reticulum) ซึ่งก็คือเอ็นโดพลาสมิคเรติคูลัมชนิดเรียบที่มีไรโบโซมจับอยู่ ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน โกลใจ-แอพพาราตัส (Golgi apparatus) ทำหน้าที่ในขบวนการขนถ่ายและไลโซโซม (lysosome) ซึ่ง

ภายในจะมีเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยสาร เป็นต้น ส่วนในส่วนของนิวเคลียสจะมีโครโมโซม ซึ่งเป็นแหล่งรวมของ DNA อันเป็นรหัสพันธุกรรมของเซลล์ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ปกติ (somatic cell) จะมีการแบ่งตัวแบบไมโตสิส (mitosis) คือ แบ่งจาก 1 เป็น 2, 4, 8 ฯลฯ และเซลล์ที่ได้จะมีโครโมโซมเท่าเดิม ในขบวนการแบ่งตัว cell cycle จะมี 5 ขั้นตอน (รูปที่ 2)[1] คือ

ระยะที่ 1 ระยะ Interphase เป็นระยะที่ใช้เวลานานที่สุด เป็นช่วงเวลาที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและสังเคราะห์ สาย DNA ขึ้น ระยะนี้สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนย่อย ๆ ได้ดังนี้

ระยะ G_0 phase เป็นระยะที่เซลล์อยู่อย่างปกติ (noncycling cells)

ระยะ G_1 phase (gap period) เป็นระยะที่เซลล์กำลังเริ่มต้นเคลื่อนไหวเพื่อการเจริญเติบโตเพื่อการแบ่งตัว

ระยะ S phase (synthesis) ช่วงนี้จะมี DNA replication

ระยะ G_2 phase เป็นระยะเจริญเติบโตของเซลล์ต่อไปในช่วงที่ 2 เพื่อสร้างส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ใหม่

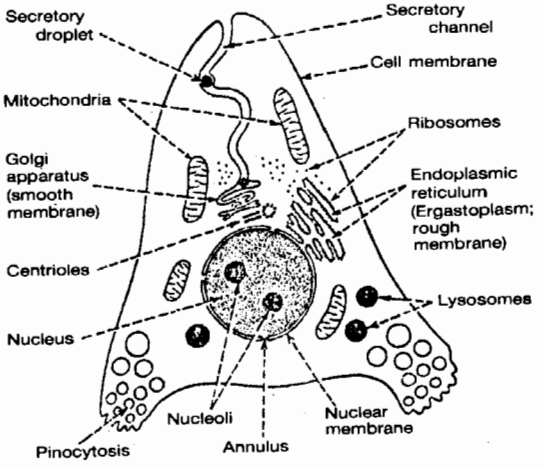
ระยะ M phase (mitosis) เป็นระยะที่เซลล์เริ่มแบ่งตัวแบบ mitosis โดยเริ่มแบ่งแยกส่วนต่าง ๆ ออกจากกัน

ระยะที่ 2 ระยะ Prophase แบ่งออกเป็น ช่วง early prophase จุด centromere วิ่งแยกไปคนละด้านของเซลล์ ช่วง late prophase ส่วนของ nuclear membrane แตกออกให้โครมาตินมาเรียงอยู่ตรงกลาง

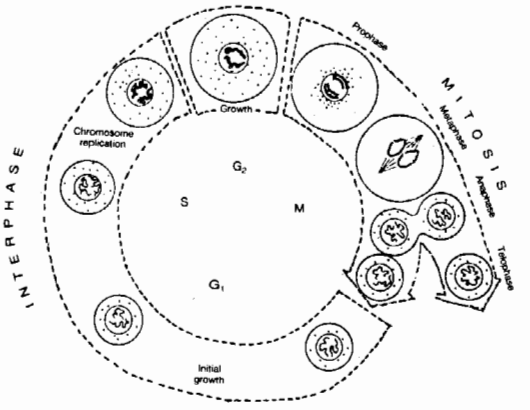
ระยะที่ 3 ระยะ Metaphase ส่วนของโครมาตินจัดเรียงตัวเป็นรูปตัว × กลางเซลล์ โดยมีสาย spindle fiber ยึดไปยังจุด centromere ทั้งสองด้าน

ระยะที่ 4 ระยะ Anaphase สาย spindle fiber หดสั้นลง เพื่อดึง chromatid ไปอยู่แต่ละด้านของเซลล์

ระยะที่ 5 ระยะ Telophase โครมาตินเริ่ม



รูปที่ 1 โครงสร้างของเซลล์ยูคารีโอต *(ดัดแปลงจาก Palul J, Cell and Tissue Culture, Churchill Livingstone, New York, 1975)*



รูปที่ 2 การแบ่งเซลล์แบบ mitosis *(ดัดแปลงจาก Palul J, Cell and Tissue Culture, Churghill Livingstone, New York, 1975)*

ยืดยาวออก และสร้าง nuclear membrane มาห่อหุ้ม หลังจากนั้นจึงสร้าง cell membrane เพื่อแบ่ง cytoplasm เป็น 2 เซลล์

ดังนั้นเมื่อเราจะเริ่มต้นนำเซลล์มาเลี้ยงนั้น ส่วนใหญ่แล้วเซลล์จะอยู่ในระยะ G_0 เราจึงต้องให้สิ่งกระตุ้นและสารที่จำเป็นแก่เซลล์ให้เพียงพอ เซลล์ที่เราต้องการเลี้ยงจึงจะสามารถแบ่งตัวและเจริญเติบโตต่อไปได้

นอกจากการรู้จักมักคุ้นกับโครงสร้างของเซลล์แล้ว การที่จะสามารถเลี้ยงเซลล์ให้โตวันโตคืนก็ยังต้องรู้ลึกลงไปอีกนิดว่า cell culture ของเราจัดเข้าข่ายใดต่อไปนี้

ชนิดของ cell culture[1,2]

1. Primary culture เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในช่วงระยะแรกของการเพาะเลี้ยง โดยตัวเซลล์ยังคงมีจำนวนโครโมโซมเหมือนกับเซลล์จากเนื้อเยื่อดั้งเดิม (Parent tissue) ดังนั้นยังคงคุณลักษณะเดิมของเซลล์นั้นอยู่

2. Established cell line culture เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ต่อจาก primary culture ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงภาวะของเซลล์ที่เลี้ยงจาก primary culture เป็น established cell line culture นี้ เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ[3] เช่น อาจเกิดจากการค่อย ๆ ปรับตัวของเซลล์เอง หรือเนื่องจากผลของสารเคมี ไวรัส ถ้าเซลล์ที่เลี้ยงนั้นมากกว่า 75% มีจำนวนโครโมโซมเท่าของเดิม (parent cell) คือมีจำนวนโครโมโซมปกติ เรียกว่า diploid cell lines แต่ถ้าเซลล์ที่เลี้ยงนั้นน้อยกว่า 75% ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่าของเดิม เรียก cell lines กลุ่มนี้ว่า heteroploid cell lines

เราอาจใช้คำเรียกชนิดต่าง ๆ ของ cell culture ได้อีก เช่น

Continuous cell line : เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแล้วสามารถ subculture ได้มากกว่า 70 ครั้งขึ้นไป

Finite cell line : เป็นเซลล์ที่สามารถ subculture ได้จำกัด ซึ่งปกติจะทำได้ประมาณ 50 ครั้ง แล้วเซลล์นั้นจะเสียคุณสมบัติหรือตายไป

นอกจากนี้ เราอาจแบ่ง cell culture ตามลักษณะการเลี้ยงได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

1. Suspended cell culture : เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดหรือขวดโดยให้เซลล์ลอยกระจายอยู่ในน้ำเลี้ยง

2. Monolayer cell culture : เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดหรือขวด โดยให้เซลล์เกาะอยู่กับผิวของภาชนะ เซลล์ปกติจะมีคุณสมบัติ Contact inhibition คือไม่เจริญซ้อนทับกัน เราจึงได้เซลล์เป็น monolayer

3. Microcarrier culture : วิธีนี้ทำได้โดยใส่เม็ดพลาสติคลงเป็นทุ่นให้เซลล์เกาะและเพิ่มจำนวนบนเม็ดพลาสติกนั้น เกิดเป็น monolayer cell culture วิธีนี้เป็นวิธีที่นำหลักการในข้อ 1 และข้อ 2 มาใช้ร่วมกัน ทำให้เพาะเลี้ยงเซลล์ได้เป็นจำนวนมากในภาชนะที่มีปริมาตรจำกัด ดังนั้นวิธีการเลี้ยงแบบนี้จึงนิยมใช้ในเชิงอุตสาหกรรมในปัจจุบัน

เมื่อเรารู้จักลักษณะและชนิดของ cell culture ของเราแล้ว การที่จะทนุถนอมกล่อมเกลี้ยงเหล่าประดาเซลล์ให้อยู่รอดปลอดภัย และอ้วนท้วนสมบูรณ์ (แข่งกับคนเลี้ยง) ได้นั้น สิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวเซลล์ก็เป็นอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์[1,2,4]

1. อุณหภูมิ : สำหรับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 37°C–38.5°C ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 45°C

เซลล์จะตายภายใน 1 ชม. แต่มีเซลล์บางชนิดที่ชอบภาวะแวดล้อมของอุณหภูมิต่ำ เช่น skin epithelial cell, fish tissue และ amphibian tissue สำหรับในกรณีที่เราต้องการเก็บเซลล์ที่มีอยู่ไว้ที่อุณหภูมิเย็นจัด (-70°C หรือ -120°C) ต้องใส่สารป้องกันการเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งที่จะเกิดขึ้นใน cytoplasm ของเซลล์เนื่องจากการอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ไว้ด้วย สารดังกล่าวเช่น DMSO (Dimethylsulfoxide), glycerol เป็นต้น แล้วจึงค่อย ๆ slow cool ก็จะสามารถเก็บ cell line นั้น ๆ ไว้ได้นาน โดยที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้เมื่อนำออกมาเลี้ยงใหม่

2. ความดันออสโมติก : เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติ ณ อุณหภูมิ 38°C จะมีความดันออสโมติกประมาณ 7.6 บรรยากาศ (±10%) ความดันออสโมติกที่เกิดขึ้นในสารน้ำของร่างกาย (biological fluid) ส่วนใหญ่เกิดจากการละลายของพวกสาร crystalloid โดยเฉพาะ NaCl และกลูโคส ส่วนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็จะมีเกลือ NaCl เป็นตัวปรับความดันออสโมติกที่สำคัญร่วมกับอิออนอนินทรีย์ (inorganic ion) อื่น ๆ บางตัว ทั้งนี้น้ำตาลกลูโคสเองก็มีบทบาทสำคัญต่อความดันออสโมติกมาก ฉะนั้น พึงระวังปริมาณกลูโกสที่ใช้ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วน macromolecule อื่น ๆ เช่น โปรตีนมีผลกระทบต่อความดันออสโมติกน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่เป็น monolayer cell ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันออสโมติกได้มากกว่าเซลล์ที่เป็น suspension cell

3. pH : เซลล์สามารถเจริญเติบโตอยู่ในช่วง ph 6.0–7.8 แต่ pH ที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ pH ที่อยู่ระหว่าง 7.2–7.4 และในขณะที่เซลล์เจริญเติบโต metabolic products จากการที่เซลล์มี metabolism จะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ค่อนไปทางกรด ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องมี buffer system เพื่อช่วยให้ pH คงที่ buffer system ที่ใช้คือ bicarbonate/CO_2 แต่ในงานบางชนิด $NaHCO_3$ อาจเป็นพิษต่อเซลล์ที่เลี้ยงได้ ปัจจุบันจึงหลีกเลี่ยงไปใช้ HEPES buffer (N-2-hydroxy ethlpiperazine-N ethane-sulphonic acid) ซึ่งมี pK_a = 7.31 ที่ 37°C และไม่เป็นพิษต่อเซลล์แทน ส่วน buffer system อื่น ๆ เช่น tris buffer, sodium-phosphate buffer ไม่นิยมใช้นักในปัจจุบัน เนื่องจาก tris buffer มี pK_a 7.9 ที่ 37°C ทำให้มักได้ pH ที่สูงกว่า physiological pH แต่ก็มีข้อดีตรงที่สามารถเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเปิดได้ ถ้าใช้ tris เป็น buffer system ส่วน sodium-phosphate buffer นั้นมีข้อเสียที่ต้องปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย 5 N NaOH

4. อิออนอนินทรีย์ (Inorganic ion) : เซลล์ต้องการอิออนอนินทรีย์เหล่านี้ด้วย ได้แก่ Na^+, K^+, Ca^2, Mg^{2+}, Fe^{2+}, HCO_3^-, PO_4^{2-}, S โดยแต่ละตัวมีหน้าที่โดยสังเขปดังนี้

Na^+, K^+ : เพื่อรักษาความดันออสโมติกในอาหารเลี้ยงเซลล์

Ca^{2+}, Mg^{2+} : จำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นซัยม์ในเซลล์ และ Ca^{2+} จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนภาวะ sol เป็น gel ของ cytoplasm เพราะฉะนั้น Ca^{2+} และ Mg^{2+} จำเป็นสำหรับการแผ่ของเซลล์เป็น monolayer

Fe^{2+} : จำเป็นสำหรับ cytochromes ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการหายใจของเซลล์

HCO_3^- : จำเป็นสำหรับขบวนการทางชีวเคมี และยังช่วยรักษาสมดุลย์กรด–ด่างในอาหารเลี้ยงเซลล์

PO_4^{2-} : จำเป็นสำหรับ energy metabolism

เนื่องจากส่วนใหญ่ของพลังงานของเซลล์ส่งอยู่ในรูปของ high energy phosphate bonds นอกจากนี้ PO_4^{2-} ยังช่วยในด้านของ buffer system ด้วย

5. สารอาหารที่จำเป็น (Essential metabolites) :

คาร์โบไฮเดรต : แหล่งสำคัญของคาร์โบไฮเดรตคือกลูโคส อาจใช้ในรูปของ lactate หรือ pyruvate บ้างเมื่อระบบนั้นมี O_2 มากพอ

กรดอะมิโน : กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อเซลล์มี 12 ชนิด และมักใช้ในรูป L-form เนื่องจาก D-isomer บางชนิดจะยับยั้งปฏิกิริยาของเซลล์ได้ ได้แก่ Arg, Cyst, His, Ile, Met, Phe, Thr, Trp, Leu, Tyr, Lys และ Val ปัจจุบันพบว่า Glu ก็ต้องการด้วยเพื่อช่วยในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

วิตามิน : วิตามินที่จำเป็นต่อเซลล์ในหลอดทดลองได้แก่ choline, pyridoxal, folic acid, riboflavin, nicotinic acid, thiamin, pantothenic acid และ inositol

โปรตีนและเปปไทด์ : เปปไทด์ที่จำเป็น คือ Glutathione ซึ่งช่วยในปฏิกริยา oxidation-reduction ในการ ย้าย-SH group ของเซลล์ เปปไทด์ที่จำเป็นสำหรับการแผ่ของ monolayer cell อีกตัวหนึ่งได้แก่ fetuin หรือบางทีอาจเรียกว่า flattening factor

Dissolved gas : สำหรับก๊าซนั้นเซลล์จำเป็นต้องใช้ทั้ง O_2 และ CO_2 โดยใช้ O_2 เพื่อให้เกิด aerobic glycolysis ส่วน CO_2 นั้นใช้เป็น buffer system ร่วมกับ HCO_3^- ซึ่งจริง ๆ ผลิตผลของเซลล์ก็จะให้ CO_2 ดังนั้นถ้าไม่ใช้ CO_2 incubator จะใช้วิธีการปิดจุกให้แน่น ๆ แทน ซึ่งมักใช้ในกรณี short-term culture

6. สารอาหารเพิ่มเติม (Supplementary metabolites)

กรดอะมิโน : ถึงแม้เซลล์จะต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อเซลล์ทั้ง 12 ชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ในกรณีที่จำนวนของเซลล์ที่ต้องการเลี้ยงมีจำนวนน้อย เราจำเป็นต้องเพิ่ม Ser และ Pro เพื่อช่วยให้เซลล์นั้นสามารถเจริญเติบโตขึ้นได้

วิตะมิน : สำหรับเซลล์บางชนิด เช่น ciliated columnar epithelium cell line ต้องการวิตะมินเอ สำหรับการ differentiate ถ้าไม่มีวิตะมินเอ เซลล์จะเปลี่ยนเป็นลักษณะ keratinised from ซึ่งเราไม่ต้องการ

7. ฮอร์โมนและสารเร่งการเจริญเติบโต (Hormones & growth factors) : ซึ่งจริง ๆ แล้วเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนี้สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องอาศัยผลของฮอร์โมน ดังนั้นฮอร์โมนที่ใส่เพิ่มลงไปก็เพียงเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น เช่น ใช้ insulin, corticosteroid ซึ่งพบว่าสำหรับ hepatoma cell นั้น corticosteroid จำเป็นในการชักนำให้มีการสังเคราะห์เอ็นซัยม์ tyrosine aminotransferase ซึ่งเป็น hepatic enzyme ที่สำคัญ

สำหรับในภาคแรกนี้เป็นการแนะนำตัวแบบเบา ๆ ให้ท่านผู้อ่านได้คุ้นเคยกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเริ่มจากได้รู้จักโครงสร้างทั่ว ๆ ไปของเซลล์, ลักษณะเฉพาะตัวต่าง ๆ ตลอดจนสิ่งที่มีอิทธิพลที่จะทำให้เซลล์นั้นเจริญเติบโตเป็นที่ชื่นอกชื่นใจของผู้เลี้ยง ซึ่งนอกจากสิ่งละอันพันละน้อยเหล่านี้แล้ว ภาวะโภชนาการที่ถูกสุขอนามัย, สถานที่ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์และการเตรียมเซลล์ให้เหมาะสมกับการเลี้ยง จะได้กล่าวให้ฟังในภาคต่อไป โปรดติดตามตอนที่ 2 : แง้มประตูดูการเตรียม tissue culture laboratory ในหน้าต่อไป

ตอนที่ 2 : แง้มประตูดูการเตรียมห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์

Part 2 : Tissue Culture Laboratory

สำหรับในตอนที่ 1 : "มารู้จัก cell culture กันเถอะ" นั้นเป็นเพียงการเปิดตัวสั้น ๆ (แต่อ่านแล้วยาว) ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจทำให้ผู้อ่านอึมครึมในอารมณ์ไปบ้าง เนื่องจากไม่จบในตอนนี้ จึงพยายามเล่าขานสิ่งจำเป็นและปัจจัยสำคัญที่ยังมิได้กล่าวถึงสำหรับการที่จะจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อในหน่วยงานของท่าน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเหล่านี้ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media), วิธีการที่ทำให้ปราศจากเชื้อ, (sterilization procedure) ตลอดจนวิธีการเบื้องต้นในการเตรียมเซลล์ (primary technique in tissue culture) ท้ายสุดเป็นการประยุกต์ใช้งานเพาะเลี้ยงเซลล์ในด้านต่าง ๆ ตามแต่จุดประสงค์ของแต่ละหน่วยงาน

อาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture media)[4,5]

หน้าที่ของอาหารเลี้ยงเซลล์นอกจากช่วยปรับสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น pH, ความดันออสโมติก ฯลฯ แล้ว ยังเป็นตัวให้สารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์แต่เซลล์สังเคราะห์ไม่ได้อีกด้วย เช่น กรดอะมิโน, วิตามิน, คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น

อาหารเลี้ยงเซลล์แบ่งได้เป็นหลายชนิด ได้แก่

1. Natural media : คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น chick embryo extract, placental cord serum ที่ยังคงใช้ในปัจจุบัน โดยใช้ร่วมกับ defined media ได้แก่ serum (fetal calf serum) ซึ่งทำให้ปลอดเชื้อได้โดยการกรองผ่าน millipore filter

2. Defined media : คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มนุษย์เป็นผู้คิดค้นส่วนผสมของสารต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ natural media มีข้อเสียคือ เราไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของสารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์นั้น ๆ ซึ่งทำให้มีปริมาณสารไม่คงที่ในการเตรียม natural media แต่ละครั้ง ดังนั้นจึงมีการคิดสูตรส่วนผสมของ defined media ขึ้นแล้วจึงเติม serum ที่ปราศจากเชื้อลงไปทีหลัง defined media ยังแบ่งออกได้เป็น

– Basic defined media : เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ขั้นพื้นฐานที่ประกอบขึ้นด้วยสิ่งที่จำเป็น 5 ชนิด (ได้แก่ NaCl, inorganic ion ต่าง ๆ เพื่อช่วยในการรักษาความดันออสโมติค, Buffer system ที่เหมาะสม carbohydrate source และก๊าซ ทั้งนี้ได้กล่าวถึงสารทั้ง 5 ชนิด อย่างละเอียดในตอนที่ 1) เพื่อให้เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ media ชนิดนี้ได้แก่ Balance salt solution (BSS) อาจเป็น Hank's BSS หรือ Earle's BSS เป็นต้น

– Complete synthetic media : เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสิ่งจำเป็นต่าง ๆ เหมือนกับ basic defined media แต่เพิ่ม essential amino acid และวิตะมินลงไป ซึ่งจริง ๆ แล้วการที่จะทราบว่าเซลล์ของเรานั้นสมควรจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดใดจัดเป็นการลองผิดลองถูกในการเลือกทดลองใช้ (trial and error) แต่พอมีหลักดังนี้ Fischer media เหมาะกับงานทางไวรัส, RPMI media เหมาะกับเซลล์จากระบบ reticuloendothelial system เช่น lymphocytes และเหมาะกับการเลี้ยงเซลล์ในขณะที่เซลล์ยังคงเป็น primary cell line และสำหรับ Eagle's media

นั้นมีสารอาหารพอเพียงสำหรับเซลล์ที่เป็น establishd cell line แล้ว แต่ถ้าเซลล์ยังอยู่ในลักษณะของ primary cell line อยู่ ถ้าจะให้ Eagle's media เลี้ยงต้องเพิ่มสารอาหารบางตัว เช่น nonessential amino acid, growth factor เป็นต้น

เมื่อเรารู้ว่าเราควรจะเลือกอาหารชนิดใดให้เซลล์ของเราแล้ว การที่จะนำอาหารเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ตลอดจนเครื่องมือเครื่องไม้ที่จะนำมาใช้กับงานเพาะเลี้ยงเซลล์ก็ต้องถูกหลักสุขอนามัย คือต้องสะอาดและปราศจากเชื้อ ซึ่งวิธีที่จะทำให้ปราศจากเชื้อนั้นทำได้หลายทาง แต่ละทางก็เหมาะสมกับสิ่งต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน ดังจะได้กล่าวต่อไปนี้

การทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization procedure)

1. ใช้วิธีทางฟิสิกส์ (Physical method) ได้แก่

– dry heat : โดยการนำภาชนะที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 160°C, นาน 90 นาที ดังนั้นข้อเสียของวิธีนี้คือความร้อนที่สูงขนาดนี้มักทำให้ภาชนะทนความร้อนไม่ไหว

– moist heat : ใช้การ autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์, 20 นาที ในกรณีที่ต้องการทำให้ภาชนะ, ปิเปตต์หรือเครื่องแก้วต่าง ๆ ปราศจากเชื้อ แต่ถ้าเป็นพวกสารละลายถ้าต้องการทำให้ปราศการเชื้อโดยวิธีนี้จะใช้เวลาเพียง 15 นาที ซึ่งจริง ๆ แล้วเชื้อโรคต่าง ๆ เมื่อได้รับความร้อนขนาดนี้มักตายภายใน 1 นาที แต่ที่ต้อง autoclave นานถึง 15 นาที เนื่องจากอาจมี air packet เหลืออยู่ซึ่งมีเชื้อโรคอยู่ในฟองอากาศนั้น ๆ หรือความร้อนที่ให้อาจจะยังเข้าไม่ทั่วถึงถ้าใช้เวลาน้อยเพียง 1 นาที

– การฉายรังสี : ใช้รังสีจากแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (UV light) ซึ่งมักติดหลอดไฟที่ให้แสง UV ไว้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำให้ห้องนั้นปราศจากเชื้อหรือใช้กับภาชนะพลาสติกที่ไม่สามารถทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนได้ ปัจจุบันใช้รังสีแกมมา (gamma ray) 2.5 Mrad จาก Cobalt-60 แทน แต่มีข้อควรระวังคือถ้าจะใช้การฉายรังสีนี้ทำให้สารที่ต้องการปราศจากเชื้อนั้นพึงระวังการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (chemical change) ที่จะเกิดขึ้นในสารที่ได้รับการฉายรังสีนั้น ๆ ด้วย

2. ใช้วิธีทางเคมี (Chemical method)

– antibiotics : ใช้ยาปฏิชีวินะ penicillin G 20-50 unit/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะทำอันตรายเฉพาะแบคทีเรีย และมักใช้ streptomycin ร่วมด้วยเพื่อป้องกันจุลชีพที่ดื้อต่อ penicillin ส่วนเชื้อรานั้นในสมัยก่อนป้องกันได้โดยใช้ mycostatin (mystatin) 20 ug/ml แต่สารตัวนี้ไม่มีความคงตัว จะสลายตัวภายใน 2–3 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C ปัจจุบันจึงหันมาใช้ amphotericin B (Fungizone) 2.5 ug/ml แทน สำหรับ mycoplasma จุลชีพหน้าใหม่ซึ่งมักทำความปวดหัวให้แก่ผู้เลี้ยงเซลล์เป็นอย่างยิ่งนั้นนิยมใช้ kanamycin 100-200 ug/ml

3. ใช้หลักการกรอง : ใช้สำหรับต้องการทำให้สารละลายปราศจากเชื้อ ได้แก่ การใช้ sintered glass filter (No.5) ซึ่งเหมาะกับกรณีสารน้อย แต่มีข้อเสียคือ กรองช้ามาก และ millipore membrane ซึ่งเป็น porous cellulose acetate หรือ cellulose nitrate filter เป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้ปลอดเชื้อที่สะดวก, รวดเร็ว และไม่เป็นพิษกับผู้ใช้ ขนาดของ millipore ที่ใช้ประมาณ 0.45 ไมครอน

ฉะนั้นถ้าท่านต้องการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อท่านจึงต้องจัดเตรียมอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ปราศจากเชื้อดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้อุปกรณ์หลักที่จำเป็นสำหรับงานของท่านและความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานก็เป็นสิ่งสำคัญ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture laboratory)

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องประกอบด้วยสิ่งต่อไปนี้

1. เป็นห้องปฏิบัติการที่อยู่ภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ (disinfection condition) : คือสามารถป้องกันไม่ให้มีการติดเชื้อจากภายนอกเข้าไปยังงานที่เลี้ยงไว้ หรือในกรณีงานที่ทำเป็นเชื้อติดต่อได้ ก็ต้องสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อจากตัวอย่างนั้นกระจายออกมาสู่ผู้ปฏิบัติงานหรือสิ่งแวดล้อมภายนอกได้

2. 37°C, CO_2 incubator : ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่เซลล์เจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 37°C และเพื่อให้สภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่ จึงนิยมใช้ก๊าซ CO_2 เข้าช่วยในการปรับสภาพเป็น carbonate buffer system ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพ pH ไว้ได้ แม้ว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตจะสร้างสาร metabolite ที่มีสภาพเป็นกรดออกมาก็ตาม

3. ที่เก็บรักษาเซลล์ภายใต้อุณหภูมิต่ำ : ได้แก่ถังไนโตรเจนเหลว (−120°C) หรือเครื่องแช่แข็ง (deep freezer, −70°C) ซึ่งจำเป็นเมื่อต้องการเก็บเซลล์ โดยปกติจะต้องแบ่งเซลล์ที่เลี้ยงไว้เก็บเข้าเป็นสต๊อกเป็นระยะ ๆ เพื่อสำรองไว้เผื่อมีการแปดเปื้อนแบคทีเรียในเซลล์ที่เรากำลังเลี้ยงอยู่ จะได้นำเซลล์ที่ดีกลับมาเพาะเลี้ยงต่อไปได้อีก

ส่วนความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานนั้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้มักจะเกี่ยวข้องกับการเพาะเชื้อโรคต่าง ๆ Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) แห่งประเทศอังกฤษได้จัดแบ่งระดับความรุนแรงของสิ่งตัวอย่างที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไว้ดังนี้

Biosafety level[6]

Group 4 : Extremely hazards เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนอย่างรุนแรงสามารถกระจายออกสู่ชุมชนได้และไม่มีการรักษาที่ได้ผล เชื้อเหล่านี้ได้แก่

- Simian herpes (B) virus
- Marburg virus
- Ebola virus
- Small pox virus
- Crimea (Congo) haemorragic Fever H.E. virus
- Lassa Fever virus
- Rabies virus
- Machupo H.F. virus
- Janin H.F. virus
- Janin H.F. virus
- Venezuelan Equine Encephalitis virus

Group 3 : Special hazards เชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในคน สามารถแพร่กระจายไปสู่ชุมชนได้ แต่สามารถทำการรักษาโรคให้หายขาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อเหล่านี้ได้แก่

- Bartonella spp.
- Brucella spp.
- Pseudomonas mallei
- Pseudomonas pscudomallci
- Clostridium botulinum
- Francisella tublarensis
- Mycobacterium tuberculosis & pathogenic spp.

- Salmmonella typhi, paratyphi A
- Yersinia pestis
- Blastomyces dermatitidis
- Coccidioides immitis
- Cryptococcus neoformans
- Histoplasma capsulatum
- Paracoccidioides braxiliensis
- Chamydia psittaci
- Coxiella burneti and other pathogenic rickettsaiae
- Arbovirus except Semliki Forest
- Langat, Yellow Fever 170 vaccine strain and Sindbis viruses
- Pathogenic amoebae
- เสมหะ หรือ specimens ที่มี tubercle bacili
- specimens หรือ reagent ที่มี Hepatitis B virus
- เนื้อสมองหรือเนื้อไขสันหลังของผู้ป่วย Creatzfeldt Jakob disease และ Multiple sclerosis

Group 2 : เชื้อราที่สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้ แต่ไม่สามารถแพร่กระจายออกไปสู่ชุมชนได้ และมีวิธีการรักษาโรคที่เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Group 1 : จุลชีพอื่น ๆ ที่ไม่เป็นอันตรายกับผู้ปฏิบัติงาน

ดังนั้นในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเซลล์พวกนี้ จึงได้มีการแบ่งระดับความปลอดภัยและมาตรการในการป้องกันโดยหน่วยงาน The centre for disease control (CDC) ในสหรัฐอเมริกาได้แบ่งระดับห้องปฏิบัติการที่ทำงานกับสิ่งติดเชื้อออกเป็น 4 ระดับ คือ

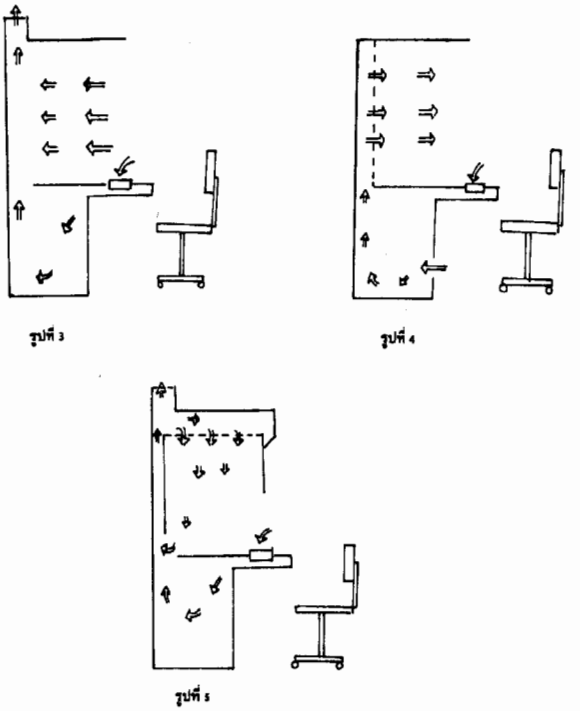
ระดับ P_1 เป็นห้องปฏิบัติการที่ทำงานกับสิ่งติดเชื้อทั่ว ๆ ไป โดยเชื้อต่าง ๆ ใน group 1 และ 2 ไม่จำเป็นต้องมีผู้เชี่ยวชาญพิเศษประจำ หลักการระวังและป้องกันการกระจายของเชื้อไปสู่ผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ใช้ Universal Precaution เช่น ไม่กินอาหาร ดื่มสุราหรือสูบบุหรี่ขณะทำงาน ใส่ถุงมือขณะปฏิบัติงาน ทำลายเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) ฯลฯ Bio-safety cabinet ที่ใช้เป็นชนิด class I, II

ระดับ P_2 เป็นห้องปฏิบัติการที่ทำงานกับสิ่งติดเชื้อที่เป็นอันตรายกับผู้ปฏิบัติงานในหมวด group 1-3 ข้อปฏิบัติเหมือนกัน P_1 level เพียงแต่ต้องมีผู้ชำนาญงานประจำอยู่ด้วยหลักการระวังป้องกันก็คล้ายกันเพียงแต่ห้องปฏิบัติการจะเป็นระบบ isolated โดยมีของใช้แยกต่างหากไม่ปนกับผู้อื่น ของที่จะนำออกมาข้างนอกจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อก่อน Biosafety cabinet ที่ใช้อาจเป็นชนิด class I, II

ระดับ P_3 เป็นห้องปฏิบัติการที่ต้องทำงานกับเชื้ออันตรายใน group 1-3 ในด้านงานวิจัยหรือต้องใช้เชื้อเป็นจำนวนมาก ห้องปฏิบัติการจะมีลักษณะปิดมิดชิด ความดันอากาศต่ำกว่าภายนอก ดังนั้นอากาศภายนอกจะไหลเข้าไปข้างในได้ทางเดียวเท่านั้น แต่อากาศด้านในจะต้องผ่านการกรองก่อนไหลออกไปข้างนอก การทำลายสิ่งปนเปื้อนเหมือนกับ P_2 level และใช้ Biosafety cabinet ชนิด class II, III

ระดับ P_4 เป็นห้องปฏิบัติการที่ทำงานกับเชื้ออันตรายมากใน group 3-4 เป็นห้องปิดมิดชิด ความดันต่ำกว่าบรรยากาศทางเข้าวน 3-4 ชั้น และใช้ Biosafety cabinet ชนิด class II

ทั้งนี้ Biosafty cabinet ที่กล่าวถึงนั้นคือตู้กรองอากาศให้เป็นอากาศปราศจากจุลชีพ โดยอาศัยการกรองอากาศผ่าน HEPA filter (High efficiency particulate air) อนุภาคที่มีขนาดใหญ่



Horizontal laminar flow

รูปที่ 3 ชนิดดูดลมเข้า และรูปที่ 4 ชนิดพ่นลม sterile ออก Vertical laminar flow รูปที่ 5

กว่า 0.4 หรือ 0.2 มิลลิไมครอนจะติดอยู่บนตัวกรอง HEPA ดังนั้นอากาศที่ลอดผ่าน HEPA จะเป็นอากาศบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 class คือ

Class I : ตัวตู้เปิดด้านหน้า (รูปที่ 3-4) แบ่งเป็น 2 ระบบ คือ ถ้าในงานที่ทำมีเชื้ออันตรายและป้องกันการกระจายของเชื้อมาสู่ผู้ทำ หรือกระจายสู่สิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องกังวลว่าของนั้นจะติดเชื้อจากภายนอกปะปนไป เช่น การย้อมเชื้อหรือเพาะเชื้อจากเสมหะผู้ป่วยจะใช้ cabinet ชนิด class I ซึ่งมีลักษณะดูดลมจากภายนอกเข้าไป (รูปที่ 3) ผ่านของที่ทำแล้วจึงกรองผ่าน HEPA filter ก่อนจึงพ่นอากาศปราศจากเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีอันตราย เช่น ในงานผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี้ นี้ มีความจำเป็นต้องป้องกันการติดเชื้อลงไปในอาหารที่เลี้ยงเชื้อ แต่ไม่ต้องป้องกันอันตรายกับผู้ปฏิบัติงาน จึงใช้ cabinet ชนิด class I ซึ่งเป็นชนิดพ่นลมออก (รูปที่ 4) โดยเครื่องจะดูดอากาศภายนอกกรองผ่าน HEPA filter แล้วจึงพ่นอากาศบริสุทธิ์ผ่านงานที่ทำออกมาสู่ผู้ปฏิบัติงาน

Class II : ตัวตู้ด้านหน้าเปิดสำหรับปฏิบัติงาน โดยตู้ชนิดนี้จะเป็นแบบ Biohazard คือป้องกันทั้งผู้ปฏิบัติงานไม่ให้ติดเชื้อจากงานที่ทำและป้องกันงานที่ทำไม่ให้ติดเชื้อปนเปื้อนจากภายนอก (รูปที่ 5) ลักษณะการทำงานของเครื่องจะดูดอากาศจากภายนอกผ่าน HEPA filter เป็นอากาศบริสุทธิ์ผ่านงานที่ทำลงไปขณะที่ด้านหน้าจะดูดอากาศผ่านตัวผู้ทำเข้าไปในช่วงหน้าตู้

กระแสลมนี้จะป้องกันการกระเด็นของสิ่งติดเชื้อมาหาผู้ปฏิบัติงาน จากนั้นอากาศทั้งหมดจะถูกกรองผ่าน HEPA filter อีกตัวหนึ่ง เพื่อพ่นลมสะอาดออกสู่บรรยากาศ

Class III : ตู้ชนิดนี้ใช้กับงานกับสิ่งแวดล้อมติดเชื้ออันตราย โดยหน้าตู้ปิดมีถุงมือติดอยู่หน้าตู้สำหรับให้ผู้ปฏิบัติงานสอดมือเข้าไปในถุงมือเพื่อทำงานในตู้ ความดันอากาศภายในตู้ต่ำกว่านอกตู้ อากาศก่อนเข้าและออกจะถูกกรองด้วย HEPA filter

เมื่อท่านเตรียมห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ต่าง ๆ ไว้เรียบร้อยแล้ว ก็มาถึงขั้นตอนสำคัญ คือ การเตรียมเซลล์เพื่อจะได้เพาะเลี้ยงต่อไป ซึ่งก็มีเทคนิคเล็ก ๆ น้อย ๆ ในแต่ละขั้นตอน

Primary technique in tissue culture[1,2,4]

1. การเตรียม cell suspension จาก fresh tissue

ในการที่จะเลี้ยงเซลล์ให้เป็น Cell line นั้น เมื่อได้เนื้อเยื่อของเซลล์ที่ต้องการเลี้ยงมา จะต้องนำมาทำให้เซลล์ที่ต้องการจากเนื้อเยื่อนั้น ๆ หลุดออกจากพวกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆเซลล์ที่ต้องการจะได้เจริญเติบโตต่อไปในน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมได้ วิธีการดังกล่าวได้แก่

1.1 Physical disruption : เช่น ใช้กรรไกรตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วกรองให้เซลล์ที่ต้องการผ่านตะแกรง ข้อเสียของวิธีนี้คือ เซลล์ช้ำและมักไม่ได้เซลล์ที่ต้องการ

1.2 Enzymatic digestion[7] : คือการใช้เอ็นไซม์ช่วยย่อย เอ็นไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่ trypsin ซึ่งอาจมี collagenase ร่วมด้วย เหมาะสำหรับ adult animal cell, papain เหมาะสำหรับ beef cell และ chitinas เหมาะกับเนื้อเยื่อของแมลง

1.3 Treatment with chelating agents : เนื่องจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะ epithelial tissue ต้องการพวก divalent cation โดยเฉพาะ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในการรวมกันเป็นเซลล์ ดังนั้น ถ้าอิออนเหล่านี้ถูกเอาออกโดยมีสารที่เข้ามาจับออกไป เนื้อเยื่อเหล่านี้ก็จะถูกทำให้หลุดออกมาเป็นเซลล์ได้ง่ายขึ้น ที่นิยมได้แก่ E.D.T.A. (Ethylene-diamine- tetra-ac etic acid) แต่มักใช้ไม่ค่อยได้ผลกับ fresh tissue จะใช้ได้ผลดีในกรณีที่เป็น established cell line แล้ว

2. การเตรียม cell suspension จาก culture cell

2.1 Physical method ใช้เคาะข้างขวดหรือภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ วิธีนี้เหมาะสำหรับ suspension culture ไม่เหมาะกับ monolayer culture

2.2 Chemical method ใช้เอ็นไซม์และ chelating agent คือ trypsin + E.D.T.A. ช่วย วิธีนี้เหมาะกับ monolayer culture

3. การเก็บ cell และเนื้อเยื่อ (Preservation and storage of cells and living tissue)

เซลล์สามารถเก็บอยู่ที่ภาวะอุณหภูมิต่ำ ๆ ได้นาน (-70°C – -120°C) ได้ ส่วนในตู้เย็นธรรมดาจะเก็บได้แค่เป็น short-term maintenance เท่านั้น

ในการเก็บเซลล์ให้มี Viability ดีนั้น ข้อสำคัญคือ อุณหภูมิที่ใช้และสารอาหารที่ใส่ลงในเซลล์ ในกรณีที่ต้องการเก็บชิ้นเนื้อในตู้เย็นธรรมดา ควรตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณพอดี เพื่อให้อาหารและความเย็นเข้าไปได้ทั่วถึง แต่ถ้าต้องการเก็บชิ้นเนื้อหรือเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ใน liquid N_2 tank (-120°C) ต้องเติมสารที่ป้องกันการเกิด ice crystall เช่น DMSO อีกทั้งต้องป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ osmotic pressure ที่เร็วเกินไป ซึ่งจะทำให้

เกิดการเปลี่ยนแปลงของ lipoprotein complex ที่บริเวณเซลล์เมมเบรณ ทำให้เซลล์แตกได้

ทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นเพียงหลักการเบื้องต้นสำหรับการที่จะจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้ถึงแม้ว่าเราจะมีห้องปฏิบัติการที่เลอเลิศเพียงใด ประสบการณ์และความชำนาญของผู้ปฏิบัติก็มีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน แต่สิ่งดังกล่าวก็ไม่ได้ยากเกินความสามารถไปได้สำหรับเรื่องสุดท้ายคงจะเป็นการเกริ่นเล็ก ๆ สำหรับการนำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปประยุกต์ใช้ซึ่งจริง ๆ แล้วมีมากมายในปัจจุบัน เท่าที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้น

การประยุกต์ใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในทางการแพทย์

(Application in Biomedical research)

– Genetic study : ตัวอย่างเช่น ในแง่ของการทำนายทารกในครรภ์ของมารดาว่ามีความผิดปกติทางพันธุกรรมหรือไม่ จากมารดาที่มีประวัติของครอบครัวหรือมารดาที่มีอายุเกินกว่า 35 ปี โดยการเจาะเอาเซลล์จากน้ำคร่ำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แล้วย้อมดูโครโมโซมจากเซลล์นั้น ๆ หรือใช้เป็นหนทางในการบอกถึง heriditary metabolic disorder ในผู้ป่วย เช่น G-6-PD deficiency syndrome โดยนำ skin fibroblast ของผู้ป่วยคนนั้นมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

– Immunological study : ที่คุ้นเคยและรู้จักกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ใช้ในการผลิต monoclonal antibody ซึ่งทุกขั้นตอนต้องทำในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งนั้น ซึ่งในปัจจุบันเราไม่ได้ใช้ monoclonal antibody[8,9] ในแง่ของการวินิจฉัยเท่านั้น ยังได้มีการพยายามนำมาใช้ในทางรักษาด้วย เช่น การผลิตออกมาในรูปของ chimeric antibody เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงเซลล์เข้ามาช่วยทดสอบสารก่อมะเร็งต่าง ๆ เพื่อดูกลไกของการเกิดมะเร็งตลอดจนทดสอบว่าสารใดก่อให้เกิดเป็นโรคมะเร็งได้

– Virology : ในการแยกเชื้อและพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดใดนั้น ใช้การเลี้ยง cell line แล้ว infect ไวรัสลงไป ไวรัสแต่ละชนิดจะทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงในลักษณะต่าง ๆ กัน นอกจากนี้ที่เป็นฮือฮากันในปัจจุบัน ก็คือ ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองนี้ผลิตวัคซีนป้องกันโรคต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงไวรัสตัวร้ายนั้น แล้วแยกให้บริสุทธิ์ จากนั้นสกัด Ag เฉพาะ epitope ที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้าง protective antibody ได้ออกมา ซึ่งอาจนำมาทำการตัดต่อยีนส์ที่สร้าง Ag นั้น โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่อเข้าเซลล์อื่นที่ขยายพันธุ์ได้เร็วและไม่เป็นอันตรายสร้าง Ag นั้น ๆ ต่อ ก็จะได้วัคซีนปริมาณมากและมีคุณภาพคงเดิมนำมาฉีดให้กับคนต่อไป

– Cancer research[3] : เช่น ใช้ในการศึกษา mutagenesis, chemical carcinogenesis, cytotoxicity test และใช้เป็นตัวแทนลักษณะของเซลล์มะเร็งในคน เพื่อจะนำมาศึกษาต่อว่ายาชนิดใดที่มีผลต่อมะเร็งนั้น ๆ

สรุป

แต่อย่างไรก็ตาม พึงระลึกไว้เสมอว่า การใช้งานเพาะเลี้ยงเซลล์ในการศึกษา in vitro นี้มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อดีก็คือ เราสามารถควบคุมสิ่งที่จะเกิดขึ้นได้ง่าย ทั้งในแง่ของจำนวนเซลล์, จำนวนยาที่ใช้ทดลอง หรือสามารถดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงได้ทันที ฯลฯ แต่ข้อเสีย ซึ่งจะ

ทำลืมเสียมิได้ก็คือบางครั้ง cell line ที่ใช้นั้นไม่ได้แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่แท้จริงใน in vivo เนื่องจากก่อนจะเป็น cell line ได้ เซลล์ก็ต้องมีการปรับตัวซึ่งทำให้ลักษณะบางส่วนของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เช่น surface Ag, chromosome ต่าง ๆ เป็นต้น ฉะนั้นจึงไม่ได้หมายความว่าผลการทดลองจาก cell culture ใน in vitro system จะได้ผลเหมือนกัน ถ้านำไปใช้ใน in vivo system อีกประการหนึ่ง ก็คือ cell line ที่มีในปัจจุบันนั้นมักได้มาจากเซลล์สัตว์ ที่ผลิตได้จากคนนั้นมักไม่ค่อยคงตัว

ที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น ในปัจจุบันได้ขยายงานเพาะเลี้ยงเซลล์เข้ามาในทางอุตสาหกรรม โดยทำในรูปของ large-scale cell culture[10] ซึ่งก็มีข้อจำกัดและปัญหาในการทำพอสมควรได้แก่ การป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียและรา, การใช้ยาปฏิชีวนะ, ความเปราะของ cell line ที่ใช้ ตลอดจนการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อและ serum ที่ใช้ ดังนั้นผู้ที่จะปฏิบัติงานในส่วนลักษณะดังกล่าวจึงควรคำนึงถึงและป้องกันสิ่งเหล่านี้ไว้ด้วย

References

1. Jakoby W.B. and Pastan I.H. (1979). Cell culture. In Methods in Enzymology, Academic press. New York.
2. Palul J. (1975). Cell and tissue culture. Churchill Livingstone, New York.
3. Ames, B.N. (1980). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 204 : 587-593.
4. Freshrey R.I. (1987). Culture of Animal cells. A manual of basic technique 2nd edition. Wiley-Liss, New York.
5. Han, R.G., Mckeehan, W.L. (1979). Media and growth requirements. In Jakoby, W.B., Pastan, I.H. (eds) : "Methods in Enzymology, Volume LVIII, Cell Culture." Academic Pren, New York : 44-93.
6. วัฒนะ พันธ์ม่วง : การเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้นจากการประชุมเชิงปฏิบัติการ การประยุกต์ใช้โมโนโคลปิลแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการ
7. Waymouth (1974). To disaggregate on not to disaggregate. Injury and cell disaggregation, transient or permanent? In Vitro 10 : 97-111.
8. St. Oroth SF and Scheidegger D (1980). Production of monoclonal antibodies : strategy and tacties. I Immunol Methods : 35, 1-21.
9. Harlow E and Lane D (1988). Monoclonal antibodies. In : Antibodies A laboratory manual. Cold spring harbor : 150.
10. Arathoon W.R. and Birch J.R. (91989). Large-Scale cell culture in Biotechnology. Science : 23, 1390-1395.