



บทความวิจัย (Research Article)

Volume 5, No. 1, Jan-June 2026, ISSN: 3088-2842 (Online)

การพัฒนาวิธีการแยกเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกของมนุษย์ให้ปราศจาก การปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์

Development of a Method for Separating Primary Cell Isolation from Human Gingival Tissue Free of Cell Cross-Contamination

ปิบูรณ์ เหง้าณี* ปราดา เพชรสุก และ ปาวีณี วิเศษศักดิ์

Piboon Ngaonee*, Porada Phetsuk and Pawinee Wisetsak

งานวิจัย บัณฑิตศึกษา และวิเทศสัมพันธ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Division of Research, Graduate Studies and International Affairs, Faculty of Dentistry,

Khon Kaen Province, 40002

* Corresponding author e-mail: pibong@kku.ac.th

Received: January 22, 2026/ Revised: March 10, 2026/ Accepted: March 25, 2026

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อปริภูมิจากเหงือกมนุษย์ให้ได้เซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ในครั้งแรก (P1) โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกจากอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 5 ราย ที่เข้ารับการรักษานอนหลับในคลินิกศัลยกรรมปริทันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Direct explant และแยกเซลล์ด้วยวิธีปั่น-อีดีทีเอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และ 0.05 ร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดเซลล์ พร้อมทั้งประเมินประสิทธิภาพของวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโดยการตรวจสอบลักษณะความสอดคล้องทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเซลล์มาตรฐาน

ผลการวิจัยพบว่าภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรกสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกได้สำเร็จในทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) โดยกลุ่มตัวอย่างจำนวน 4 ใน 5 (ร้อยละ 80) ปราศจากการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ อีกทั้งยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับเซลล์มาตรฐาน และมีความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 95 ขณะที่พบการปนเปื้อนข้ามชนิดเพียง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) สรุปได้ว่า วิธีการแยกเซลล์แบบผสมผสานที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแยก

เซลล์ปฐมภูมิให้มีความบริสุทธิ์สูง ช่วยลดต้นทุนและความสูญเสียจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ปนเปื้อน จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เป็นมาตรฐานการปฏิบัติงานประจำของห้องปฏิบัติการต่อไป

คำสำคัญ: การคัดแยกเซลล์ปฐมภูมิ เหงือกของมนุษย์ การปนเปื้อนข้ามชนิด ทริปซิน-อีดีทีเอ อาหารเพาะเลี้ยงจำเพาะ

Abstract

This study aimed to develop an optimized protocol for isolating and culturing human gingival fibroblasts and keratinocytes with high purity and minimal cross-contamination. Gingival tissue samples were collected from five healthy volunteers undergoing periodontal surgery at the Faculty of Dentistry, Khon Kaen University. Cells were cultured using the direct explant method, and cell types were separated using differential trypsinization with 0.25% and 0.05% Trypsin-EDTA, followed by cultivation in cell type-specific media. The efficiency of the method was evaluated by comparing the morphological characteristics of isolated cells with reference standards. All five tissue samples (100%) successfully yielded primary cell cultures by the first passage (P1). Four samples (80%) showed no cross-contamination between cell types, with isolated cells exhibiting morphological characteristics consistent with their respective cell types and achieving greater than 95% purity. Cross-contamination was observed in only one sample (20%).

This optimized method demonstrates improved efficiency for primary cell isolation from human gingival tissue, yielding highly purified cell populations with minimal cross-contamination. The protocol offers a cost-effective approach suitable for routine laboratory application, reducing potential losses associated with contaminated cell cultures.

Keywords: Primary cell isolation, Purity, Cross-contamination, Selective trypsinization, Selective media

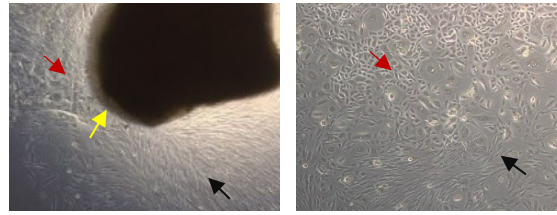
บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเทคนิคพื้นฐานที่มีความสำคัญในการวิจัยทางชีววิทยา และทางการแพทย์ (Freshney, 2015, p.2) โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (Primary culture) ซึ่งเป็นการแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรงจากเนื้อเยื่อ ที่สามารถรักษาสภาพทางสรีรวิทยา และพันธุกรรมของเซลล์ให้ใกล้เคียงกับแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติมากที่สุด เซลล์ปฐมภูมิที่แยกได้มักจะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2556, หน้า 81) เนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อในช่องปากที่สำคัญ ประกอบด้วย เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts) และเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cells) เป็นองค์ประกอบหลัก (de Abreu et al., 2019; Soi et al., 2018) การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเหงือกปฐมภูมิจึงมีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านชีววิทยาช่องปาก รวมถึงการศึกษากลไกของโรคปริทันต์ และการพัฒนาวัสดุทางทันตกรรม

อุปสรรคสำคัญที่พบได้บ่อยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิคือ การปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ (Cross-contamination) ซึ่งเกิดจากความต่างของอัตราการเจริญเติบโต โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์มักเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนบดบังเซลล์เยื่อบุผิว ส่งผลให้การแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก แม้ว่าจะมีการใช้เทคนิคที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกเซลล์ เช่น การใช้ความไวต่อทริปซินแตกต่างกัน (Selective trypsinization) การใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) (Hyun et al., 2019; Ladke et al., 2023) แต่หากเกิดการปนเปื้อนย่อมนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลการทดลอง (Markovic & Markovic, 1998) และส่งผลเสียต่อการประยุกต์ใช้ในทางคลินิก (Routray et al., 2016) ในทางกลับกัน การใช้เซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะช่วยยกระดับความแม่นยำในการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ให้สูงขึ้น (ISO, 2009)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการวิจัยเซลล์พันธุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้บริการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเนื้อเยื่อเหงือกเพื่อสนับสนุนงานวิจัยภายในคณะฯ อย่างไรก็ตาม ปัญหาการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ภายในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน (ภาพที่ 1) ยังคงเป็นอุปสรรคสำคัญ โดยพบอัตราการปนเปื้อนสูงถึงร้อยละ 70 ภายหลังจากถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (Passage 1, P1) ก่อให้เกิดภาระต้นทุนที่เพิ่มขึ้น ทั้งในด้านงบประมาณวัสดุสิ้นเปลือง เวลาที่สูญเสียจากการเพาะเลี้ยงซ้ำ รวมถึงความจำเป็นในการจัดซื้อเซลล์มาตรฐานจากต่างประเทศเพื่อทดแทนตัวอย่างที่คัดแยกไม่สำเร็จ ข้อจำกัดดังกล่าวนอกจากจะทำให้การให้บริการล่าช้าแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อความแม่นยำของผลการทดลองที่ต้องการความเฉพาะเจาะจงสูง เช่น การทดสอบฤทธิ์ของยาและชีววัสดุ แม้ว่าจะงานวิจัยของ Hyun et al. (2019), Khalili and Ahmad (2015) และ Ladke et al. (2023) จะอธิบายความแตกต่างของเซลล์แต่ละชนิดไว้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะในด้านความไวต่อทริปซินที่สัมพันธ์กับโครงสร้างการยึดเกาะพื้นผิว ซึ่งส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์หลุดออกได้ง่ายกว่าเซลล์เยื่อบุผิว ตลอดจนความจำเพาะต่อโกรทแฟกเตอร์ที่แตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิด อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวมักอาศัยการควบคุมเพียงตัวแปรเดียว ซึ่งอาจยังไม่ครอบคลุมคุณลักษณะเฉพาะของเนื้อเยื่อเหงือกที่มีความแข็งแรงในการยึดเกาะระหว่างเซลล์สูง ส่งผลให้ภายใต้ข้อจำกัดด้านทรัพยากร และเวลาในการปฏิบัติงานจริง การควบคุมอัตราการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ให้มีประสิทธิภาพอย่างสม่ำเสมอจึงทำได้ค่อนข้างจำกัด

งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาระบบการแยกเซลล์ปฐมภูมิแบบผสมผสาน (Combined isolation) ที่บูรณาการระหว่างการเพิ่มความเข้มข้นของทริปซิน-อีดีทีเอที่แตกต่างกัน (Selective trypsinization) ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) เพื่อลดการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ และเพิ่มความบริสุทธิ์ของกลุ่มเซลล์เป้าหมายให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีเป้าหมายหลักให้กระบวนการปฏิบัติงาน (Procedure) มีความรวดเร็ว คุ้มค่า และมีความแม่นยำจนสามารถนำไปใช้เป็นมาตรฐานที่ทำได้ซ้ำได้ (Reproducibility) ในห้องปฏิบัติการจริง



(1a)

(1b)

ภาพที่ 1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Direct explant

(1a) การเคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อเหงือกของเซลล์ (Cell outgrowth) (ลูกศรเหลือง) (1b) เซลล์มีการปนเปื้อนข้ามชนิดภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Nikon, Japan) กำลังขยาย 50 เท่า

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวปฐมภูมิจากเหงือกของมนุษย์ให้มีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์

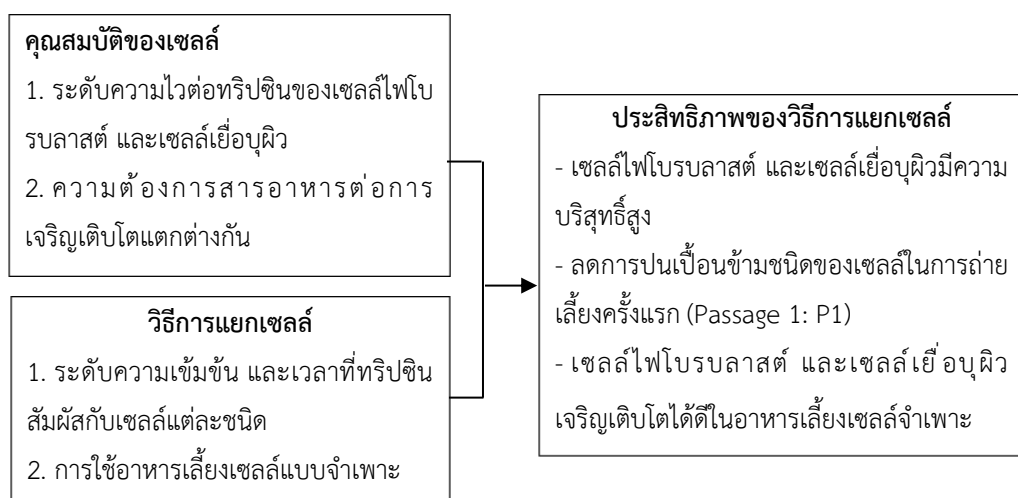
กรอบแนวคิด

การคัดแยกเซลล์ปฐมภูมิจากเนื้อเยื่อเหงือกเพื่อการวิจัยมักประสบปัญหาการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ โดยเฉพาะการที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าจนเข้าครอบครองพื้นที่เพาะเลี้ยงแทนเซลล์เยื่อบุผิว (Wanichpakorn & Kedjarune-Laggat, 2010) ส่งผลให้ได้เซลล์ที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ

งานวิจัยนี้จึงบูรณาการแนวคิดทางชีววิทยาของเซลล์ผ่าน 2 กลไกหลัก ได้แก่ การใช้ทรินชิน-อีดีทีเพื่อต่างความเข้มข้นเพื่อแยกเซลล์ตามความแข็งแรงของกลไกการยึดเกาะพื้นผิวที่จำเพาะต่อชนิดเซลล์ (Hyun et al., 2019; Khalili & Ahmad, 2015; Ladke et al., 2023) และการคัดเลือกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ผ่านการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) เพื่อยับยั้งเซลล์ปนเปื้อน และคัดเลือกเฉพาะเซลล์เป้าหมาย (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2556, หน้า 64) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์ปนเปื้อนตั้งแต่ระยะเริ่มต้น และเพิ่มความบริสุทธิ์ของเซลล์ให้ได้ตามมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 2

ตัวแปรต้น

ตัวแปรตาม



ภาพที่ 2 กรอบแนวคิดงานวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บเนื้อเยื่อเหงือก

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ HE642202) โดยอาสาสมัครทุกรายได้รับทราบรายละเอียด และลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการก่อนเริ่มการศึกษา ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี จำนวน 5 ราย ซึ่งไม่มีสภาวะการอักเสบ หรือการติดเชื้อในช่องปาก และเป็นผู้ที่เข้ารับการรักษาด้วยศัลยกรรมตัดเหงือก ณ คลินิกศัลยกรรมปริทันต์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ทั้งนี้ ตำแหน่งการเก็บเนื้อเยื่อครอบคลุมทั้งส่วนเหงือกอิสระ (Free gingiva) และเหงือกยึด (Attached gingiva) เพื่อให้ได้กลุ่มตัวอย่างเซลล์ที่มีความหลากหลาย และสามารถเป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อเหงือกได้อย่างสมบูรณ์ โดยภายหลังจากการทำการศัลยกรรมตัดเหงือก ชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกนำไปแช่ทันทีในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) ที่เติมยาต้านจุลชีพ (เพนนิซิลิน/สเตรพโตมัยซิน) (Gibco, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ตามวิธีการของ Hu et al. (2022) โดยจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อคงความมีชีวิตของเซลล์ และลดโอกาสการปนเปื้อนของจุลชีพ

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือก (Primary culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจะใช้วิธี Direct explant (Diar-Bakirly & El-Bialy, 2021; Hyun et al., 2019; Ladke et al., 2023; Wanichpakorn & Kedjarune-Laggat, 2010) โดยปฏิบัติงานภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เริ่มต้นด้วยการล้างเนื้อเยื่อเหงือกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาล์น (PBS) ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เพื่อขจัดเลือด และสิ่งปนเปื้อน จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 15 หั่นเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 1-2 ตารางมิลลิเมตร ตามวิธีการของ Samira Diar-Bakirly and El-Bialy (2021) วางชิ้นเนื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร จำนวน 8-10 ชิ้นต่อจาน โดยให้ด้านใดด้านหนึ่งอยู่บนผิวจานเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 นาที เพื่อช่วยให้ชิ้นเนื้อยึดเกาะกับผิวจานได้ดียิ่งขึ้น พร้อมทั้งป้องกันไม่ให้เซลล์สูญเสียความชื้นที่มากเกินไป จากนั้นจึงค่อยๆ เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยหยดลงด้านข้างจานอย่างระมัดระวังเพื่อให้แรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเซลล์ค่อยๆ ไหลไปสัมผัสชิ้นเนื้อโดยไม่ทำให้ชิ้นเนื้อหลุดลอย โดยในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยกลูโคส 4.5 กรัม/ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 3.7 กรัม/ลิตร (Gibco, USA) เสริมด้วยซีรัมจากฟetusในท้องแม่วัว (Fetal Bovine Serum, FBS) ร้อยละ 10 (Gibco, USA) และยาต้านจุลชีพ (Antibiotic-Antimycotic) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ประกอบด้วย เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร สเตรพโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Gibco, USA) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่มีการควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 95 เพื่อป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยงเซลล์ เปลี่ยนถ่ายอาหาร เมื่อเซลล์เริ่มมีการเคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Cell outgrowth) และตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบชิ้นเนื้ออย่างต่อเนื่องระหว่างวันที่ 1-21 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับตามวิธีของ Ladke et al. (2023) เพื่อติดตามการเพิ่มจำนวนของเซลล์รอบ ๆ ชิ้นเนื้อ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 จะทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) ไปยังภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่

3. การแยกเซลล์จากเหงือก (Secondary culture)

3.1 การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts)

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ออกทั้งหมด ล้างเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงด้วย PBS ที่ปราศจากแคลเซียม และแมกนีเซียม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดซีรัมที่มีฤทธิ์ยับยั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Matinfar et al., 2022) จากนั้นเติมทริปซิน-อีดีทีเอ (Gibco, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร (Ladke et al., 2023) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3-5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลล์เชียส (ATCC, n.d.; Patil et al., 2020) ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อพบว่าเซลล์เริ่มมีการหดสั้นลง จึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ทรिพซิน-อีดีทีเอเป็นกลาง จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1)

3.2 การแยกเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cells)

ล้างจานเพาะเลี้ยงเซลล์ซ้ำอีก 1 ครั้ง ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเอาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ตกค้างออกให้หมด และดูดสารละลาย PBS ทั้ง จากนั้นเติมทริพซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5-10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (CELLnTEC, n.d.) เพื่อให้เซลล์เยื่อบุผิวหลุดจากจานเพาะเลี้ยง เติมดีฟายด์ทริพซินอินฮิบิเตอร์ (Defined Trypsin Inhibitor) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้เอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอเป็นกลาง ดูดสารแขวนลอยเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2)

นำหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (MPW, Poland) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ของหลอดที่ 1 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Gibco, USA) และนำตะกอนเซลล์ของหลอดที่ 2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเคอราติโนไซต์ (Keratinocyte-SFM) (Gibco, USA) ซึ่งเป็นอาหารสูตรปราศจากซีรัม ที่มีการเติมอาหารเสริมจำเพาะ ได้แก่ Bovine Pituitary Extract (BPE) และ Human Recombinant Epidermal Growth Factor (EGF) เพื่อกระตุ้นการแบ่งตัว (Proliferation) ของเซลล์เยื่อบุผิว อาหารสูตรนี้มีจุดเด่นคือ ปริมาณแคลเซียมต่ำ ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (Cell Differentiation) และรักษาฟีโนไทป์ของเซลล์ให้อยู่ในสภาวะที่พร้อมต่อการเพิ่มจำนวนมากกว่าการใช้ DMEM ที่มีแคลเซียมสูง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่มีการควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. การจำแนกชนิด และประเมินความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Microscopic assessment and Purity evaluation)

ผู้วิจัยทำการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เคลื่อนออกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Cell outgrowth) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) และบันทึกภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ NIS-Element Basic Research (Nikon, Japan) โดยใช้กำลังขยายรวม 50 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ 5X) การระบุชนิดของเซลล์ได้จากการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเซลล์มาตรฐาน ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิ (HGF-1 CRL-2014™) ซึ่งมีรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped) และเรียงตัวเป็นแนวขนาน (Parallel alignment) (ATCC, n.d.) และเซลล์เยื่อบุผิว (HGEP) ที่มีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม (Polygonal) และเรียงตัวคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) (CellnTEC, n.d.; Ladke et al., 2023; Patil et al., 2020; Wanichpakorn & Kedjarune-Laggat, 2010)

สำหรับการประเมินเชิงปริมาณ ผู้วิจัยคำนวณร้อยละความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับเซลล์มาตรฐานต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้จากการสุ่มเลือก 3 ขอบเขตของภาพ (Field of View, FOV) ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยกำหนดเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ (Quality control) ของเซลล์ให้มีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 ซึ่งถือเป็นระดับที่ยอมรับได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเซลล์เยื่อบุผิว

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

1. ผลการเก็บ และคุณภาพของตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือก

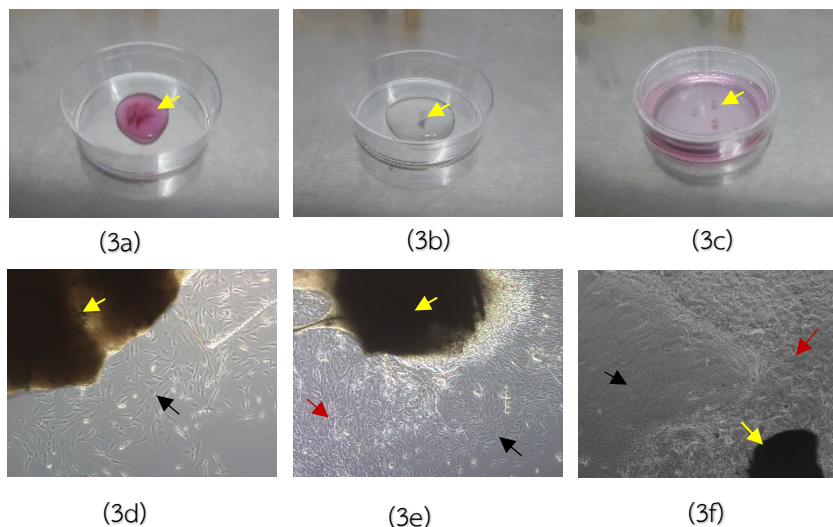
จากการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเหงือกจากอาสาสมัครจำนวน 5 ราย พบว่าชิ้นเนื้อทุกตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพที่สมบูรณ์ สด ไม่เปื่อยยุ่ย ซึ่งมีความพร้อมต่อการนำไปแยกเซลล์ ทั้งนี้ ไม่มีตัวอย่างใดถูกคัดออกเนื่องจากสภาพของเนื้อเยื่อไม่

เหมาะสมต่อการนำแยกเซลล์ และชิ้นเนื้อทั้งหมดสามารถนำเข้าสู่ขั้นตอนการแยกเซลล์ในห้องปฏิบัติการได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดอย่างครบถ้วน

2. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือก (Primary culture)

ภายหลังจากการเตรียม และล้างชิ้นเนื้อเหงือกในสภาวะปลอดเชื้อ (ภาพที่ 3a-3b) และนำไปวางบนจานเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Direct explant (ภาพที่ 3c) พบว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโต และเคลื่อนออกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Cell outgrowth) อย่างชัดเจนภายในวันที่ 3-7 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 3d, ลูกศรดำ) จากการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะแรก พบกลุ่มประชากรเซลล์ที่มีรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย (Spindle-shaped) ซึ่งระบุได้ว่าเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิ (ลูกศรดำ) และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จะเริ่มสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะรูปหลายเหลี่ยมเรียงตัวชิดกันคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) ของเซลล์เยื่อบุผิวปฐมภูมิเจริญปะปนอยู่ (ภาพที่ 3e, ลูกศรแดง) จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นจนเต็มพื้นที่ (Confluence) และสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) ได้ภายในวันที่ 15-21 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 3f)

ระยะเวลาของการเกิด Cell outgrowth มีระยะเวลาเฉลี่ยรวมทุกตัวอย่างอยู่ที่ 4.4 ± 1.6 วัน และสามารถเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเพาะเลี้ยง โดยมีระยะเวลาเฉลี่ยรวมทุกตัวอย่างอยู่ที่ 18.4 ± 2.4 วัน ทั้งนี้ การรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาใกล้เคียงกันในระยะเริ่มต้น ผู้วิจัยจึงแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยรวมของการเพาะเลี้ยงโดยไม่ได้แยกชนิดเซลล์ในขั้นตอนนี้ นอกจากนี้ เซลล์ปฐมภูมิจากอาสาสมัครทั้ง 5 ราย มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องจนสามารถถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) ได้สำเร็จครบทุกตัวอย่าง โดยที่ช่วงเวลาเข้าสู่ความหนาแน่นของเซลล์จะแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกด้วยวิธี Direct explant

(3a) ชิ้นเนื้อเหงือกในอาหาร DMEM เสริมด้วย Antibiotic-Antimycotic ร้อยละ 5 (3b) การล้างชิ้นเนื้อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (3c) ชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มม. โดยให้ด้านใดด้านหนึ่งอยู่บนผิวจานเพาะเลี้ยง (3d) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิ (ลูกศรดำ) เกิด Cell outgrowth จากชิ้นเนื้อเหงือก (ลูกศรเหลือง) (3e-3f) สัณฐานวิทยาของประชากรเซลล์แบบผสม (Mixed population) ประกอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped, ลูกศรดำ) และเซลล์เยื่อบุผิวที่มีลักษณะเป็นเหลี่ยมเรียงคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance, ลูกศรแดง)

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกด้วยวิธี Direct explant แสดงช่วงเวลาที่เซลล์เคลื่อนออกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Cell outgrowth) ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และชนิดของเซลล์ที่พบในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่าง	เซลล์เริ่มเคลื่อนที่ ^a (วัน)	ระยะเวลาดังความหนาแน่นร้อยละ 80 (วัน)	ชนิดเซลล์	^b ผลการเพาะเลี้ยง
S1	5	17	ไฟโบรบลาสต์	สำเร็จ
S2	3	19	เซลล์ผสม	สำเร็จ
S3	3	20	เซลล์ผสม	สำเร็จ
S4	4	15	เซลล์ผสม	สำเร็จ
S5	7	21	เซลล์ผสม	สำเร็จ
ค่าเฉลี่ยรวม	4.4 ± 1.6 วัน	18.4 ± 2.4 วัน	-	ร้อยละ 100

หมายเหตุ: ^aเซลล์เริ่มเคลื่อนที่ หมายถึง วันที่เริ่มสังเกตเห็นเซลล์เคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Cell outgrowth)
^bความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเซลล์ หมายถึง เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนต่อเนื่องจนถึง P1 อ้างอิงตามงานวิจัยของ Ladke et al. (2023) และ Wanichpakorn and Kedjarune-Laggat (2010)

3. ผลการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวปฐมภูมิจากเหงือก

3.1 ผลการแยกเซลล์ด้วยทริปซินความเข้มข้นแตกต่างกัน (Selective trypsinization)

3.1.1 การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยปริมาตร

ภายหลังการใช้ทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.25 พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มหลุด และหลุดออกจากพื้นผิวภายใน 3–5 นาที (ภาพที่ 4b, ลูกศรดำ) ในขณะที่เซลล์เยื่อบุผิวยังคงยึดเกาะกับพื้นผิวอย่างเหนียวแน่น (ภาพที่ 4b, ลูกศรแดง) ซึ่งสอดคล้องกับผลการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยทริปซิน (Selective trypsinization) ในตารางที่ 2 ที่แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์หลุดลอกมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้สามารถรวบรวมเป็นประชากรของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้อย่างจำเพาะ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร DMEM พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะกับภาชนะเพาะเลี้ยง และมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลในตารางที่ 3 ที่แสดงระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นร้อยละ 80 (80% Confluence) ภายในเวลา 3 วัน ภายหลังการแยกเซลล์ ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดให้เห็นว่าเซลล์ที่แยกได้ยังมีชีวิต (Cell viability) และมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิ (Primary Gingival Fibroblast, HGF-1 CRL-2014™) ที่ระบุว่าการแยกเซลล์ด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพจะช่วยลดความบอบช้ำของเซลล์ และส่งผลให้เซลล์สามารถฟื้นตัวเพื่อเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (ATCC, n.d.)

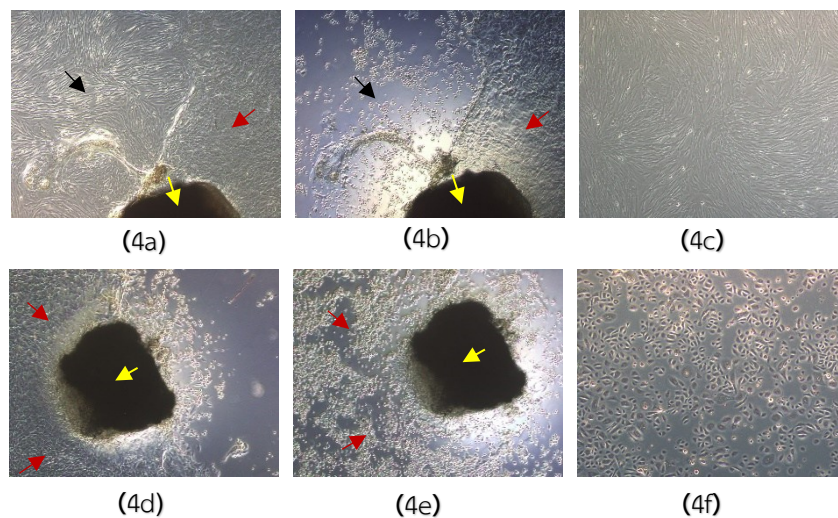
3.1.2 การแยกเซลล์เยื่อบุผิวด้วยทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร

ภายหลังการกำจัดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และล้างด้วย PBS การใช้ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.05 พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวหลุด และหลุดลอกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ได้ภายใน 8–10 นาที (ภาพที่ 4e, ลูกศรแดง) ซึ่งสอดคล้องกับผลการแยกเซลล์ในตารางที่ 2 ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุผิวมีความทนทานต่อทริปซินสูงกว่า จึงต้องใช้ระยะเวลาในการแยกเซลล์ที่นานกว่าเพื่อให้เซลล์หลุดลอกอย่างสมบูรณ์ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารชนิด Keratinocyte-SFM พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะ และแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการจัดเรียงตัวชิดกันคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4f) โดยผลในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุผิวที่แยกด้วยวิธีนี้มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นร้อยละ 80 (80% Confluence) ภายในเวลา 7 วัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการใช้ทริปซินความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 0.05) ช่วยรักษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) และคงไว้ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ

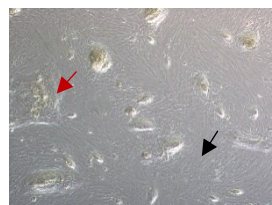
เซลล์เยื่อผิว (Human Gingival Epithelial Cells, HGEF) ที่ระบุว่าเซลล์เยื่อผิวปฐมภูมิควรมีการจัดเรียงตัวชิดกันคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) ภายหลังการแยก (CellInTEC, n.d.)

3.2 ผลการแยกเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media)

ภายหลังการเพาะเลี้ยง พบว่า 4 ใน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) ไม่พบการปนเปื้อนข้าม โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์แสดงรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped) ในอาหารชนิด DMEM (ภาพที่ 4c) และเซลล์เยื่อผิวมีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมเรียงคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) ในอาหารชนิด Keratinocyte-SFM (ภาพที่ 4f) และพบการเจริญเติบโตแบบผสมในอาหารชนิด DMEM จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) ที่มีลักษณะรูปร่างเหลี่ยมเรียงคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance, ลูกศรแดง) เจริญเติบโตปะปนกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped, ลูกศรดำ) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อผิวด้วยทริปซินความเข้มข้นแตกต่างกัน (Selective trypsinization) และอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) (4a) ลักษณะประชากรเซลล์แบบผสม (Mixed cell population) ก่อนเริ่มขั้นตอนการแยกเซลล์แบบผสมผสาน (Combined isolation) (4b) การใช้ทริปซินร้อยละ 0.25 พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มหดตัว และหลุดออก (ลูกศรดำ) ขณะที่เซลล์เยื่อผิวยังคงยึดเกาะ (ลูกศรแดง) (4c) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) ในอาหารชนิด DMEM (4d) เซลล์เยื่อผิวที่เหลืออยู่หลังแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ออก (4e) การใช้ทริปซิน-อีทีทีเอ ร้อยละ 0.05 พบเซลล์เยื่อผิวหดตัว และหลุดออก (4f) การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อผิวหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Keratinocyte-SFM



ภาพที่ 5 ประชากรของเซลล์ผสม (Mixed cell population) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM พบกลุ่มเซลล์เยื่อผิวที่มีลักษณะเหลี่ยมเรียงคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance, ลูกศรแดง) เจริญเติบโตปะปนกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped, ลูกศรดำ)

ตารางที่ 2 ผลการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวด้วยทริปซิน (Selective trypsinization)

ความเข้มข้นทริปซิน	เวลาที่เซลล์หลุด (นาที)	เซลล์ที่ถูกแยก	ผลการแยก
ทริปซิน 0.25 %	3-5	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	สำเร็จ
ทริปซิน 0.05 %	8-10	เซลล์เยื่อบุผิว	สำเร็จ

ตารางที่ 3 ผลการแยกเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) ภายหลังการถ่ายเลี้ยงครั้งแรก (P1)

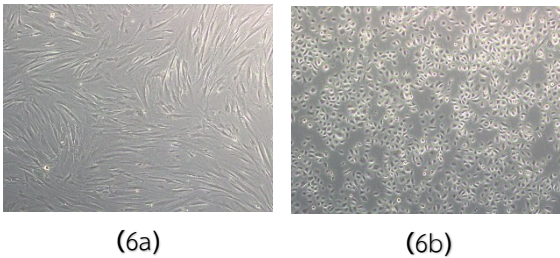
อาหารเลี้ยงเซลล์	เซลล์ที่เจริญเติบโต	ระยะเวลาถึงความหนาแน่น ร้อยละ 80 (วัน)	การปนเปื้อนข้ามชนิด
DMEM + 10%FBS	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	2-3	1/5
Keratinocyte-SFM	เซลล์เยื่อบุผิว	5-7	0/5

หมายเหตุ: ภายหลังจากการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) พบการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM จำนวน 1 ตัวอย่าง ขณะที่อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Keratinocyte-SFM สามารถคงความจำเพาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวได้ครบทุกตัวอย่าง (n = 5)

4. การจำแนกชนิด และประเมินความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Microscopic assessment and Purity evaluation)

จากการสังเกตลักษณะพื้นฐานวิทยาของการเกิด Cell outgrowth จากเนื้อเยื่อเหงือกภายหลังการถ่ายเลี้ยงเซลล์ครั้งแรก (P1) และเพาะเลี้ยงในอาหารจำเพาะเป็นเวลา 2-3 วัน พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะสอดคล้องกับเซลล์มาตรฐาน (Reference cells) โดยประชากรเซลล์ในแต่ละกลุ่มมีความสม่ำเสมอทางพื้นฐานวิทยา สำหรับกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM แสดงรูปร่างแบบกระสวย (Spindle-shaped) และมีการเรียงตัวเป็นแนวขนาน (Parallel alignment) (ภาพที่ 6a) ในขณะที่กลุ่มเซลล์เยื่อบุผิวในอาหาร Keratinocyte-SFM แสดงรูปร่างหลายเหลี่ยม (Polygonal) และจัดเรียงตัวคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance) (ภาพที่ 6b)

เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ในกลุ่มตัวอย่างที่สามารถคัดแยกชนิดเซลล์ออกจากกันได้โดยปราศจากการปนเปื้อนข้าม (ร้อยละ 80 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด) พบว่าทุกตัวอย่างมีค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้คือ ร้อยละ 95 โดยมีค่าความบริสุทธิ์เฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 95.4-98.7 สำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และร้อยละ 95.6-98.9 สำหรับเซลล์เยื่อบุผิว ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 6 การจำแนกชนิดของเซลล์ปฐมภูมิตามลักษณะทางพื้นฐานวิทยา

(6a) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหารชนิด DMEM แสดงลักษณะเป็นรูปกระสวย (Spindle-shaped) และมีการจัดเรียงตัวเป็นแนวขนาน (Parallel alignment) (6b) เซลล์เยื่อบุผิวในอาหาร Keratinocyte-SFM แสดงลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม (Polygonal) จัดเรียงตัวคล้ายหินกรวด (Cobblestone-like appearance)

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกชนิด และร้อยละความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Microscopic assessment and Purity evaluation)

ตัวอย่าง	การเจริญในอาหาร	การเจริญในอาหาร	ร้อยละความบริสุทธิ์		การปนเปื้อน
	DMEM	Keratinocyte-SFM	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์เยื่อบุผิว	ข้ามชนิด
S1	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	N/A ^a	98.7	N/A ^a	ไม่พบ ^b
S2	เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ เซลล์เยื่อบุผิว	เซลล์เยื่อบุผิว	47.6	98.9	พบ
S3	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์เยื่อบุผิว	98.3	95.6	ไม่พบ ^b
S4	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์เยื่อบุผิว	95.4	98.1	ไม่พบ ^b
S5	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์เยื่อบุผิว	95.8	96.2	ไม่พบ ^b

หมายเหตุ: ^aN/A หมายถึง ไม่พบการเจริญของเซลล์เยื่อบุผิวในระยะเริ่มต้น (P0) จึงไม่นำมาคำนวณค่าร้อยละความบริสุทธิ์
^bไม่พบการปนเปื้อน หมายถึง มีความบริสุทธิ์ทางสัณฐานวิทยาสูงกว่าร้อยละ 95 ตามเกณฑ์ที่ผู้วิจัยกำหนด (ถือว่าไม่พบการปนเปื้อนของเซลล์เยื่อบุผิว)

การพัฒนาวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกมนุษย์ในการศึกษานี้ มุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ประชากรเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ (Cross-contamination) โดยผู้วิจัยขออภิปรายผลในประเด็นสำคัญ ดังนี้

1. ผลการแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ จากการศึกษาพบว่า เซลล์เริ่มเคลื่อนที่ออกจากชิ้นเนื้อ (Cell outgrowth) ในช่วงวันที่ 3–7 และสามารถทำการถ่ายเลี้ยงครั้งแรก (P1) ได้ภายในวันที่ 15–21 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สอดคล้องกับรายงานของ Ladke et al. (2023) โดยทุกตัวอย่างในการศึกษานี้สามารถเพาะเลี้ยงได้สำเร็จจนถึงระยะ P1 คิดเป็นอัตราความสำเร็จร้อยละ 100 ทั้งนี้ ปัจจัยด้านเพศ และอายุของอาสาสมัครไม่ส่งผลต่ออัตราความสำเร็จดังกล่าว สอดคล้องกับข้อค้นพบของ Wanichpakorn and Kedjarune-Laggat (2010)

ในด้านลักษณะของประชากรเซลล์ พบว่ากลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ (4 ใน 5 ตัวอย่าง) มีลักษณะประชากรของเซลล์ผสม (Mixed cell population) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิวภายในจานเพาะเลี้ยงเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ de Abreu et al. (2019) และ Soi et al. (2018) อย่างไรก็ตาม มี 1 ตัวอย่างที่พบเพียงกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่านั้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากชิ้นเนื้อที่ได้รับจากการตัดยกรรมตัดเหงือกนั้น ประกอบด้วยส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยไม่มีส่วนของชั้นเยื่อบุผิว (Epithelium) ติดมาด้วย (Ladke et al., 2023)

2. แนวทางการแยกเซลล์ด้วยทริปซิน-อีดีทีเอต่างความเข้มข้น ประสิทธิภาพในการแยกเซลล์อาศัยหลักการความแตกต่างของความไวต่อทริปซินซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะโครงสร้างไซโทสเกเลตอน (Cytoskeleton) และระดับความแข็งแรงของพันธะยึดเกาะระหว่างเซลล์ที่มีความเฉพาะตัวในเซลล์แต่ละชนิด ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ตอบสนอง และหลุดลอกออกได้เร็วกว่าเซลล์เยื่อบุผิว (Ladke et al., 2023) ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยเลือกใช้ทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ในระยะเวลาจำกัดเพียง 3–5 นาที เพื่อแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกก่อน เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีความไวต่อเอนไซม์สูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิว แนวทางดังกล่าวมุ่งเน้นการกำจัดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกจากจานเพาะเลี้ยงให้ได้มากที่สุดตั้งแต่ระยะเริ่มต้น เพื่อป้องกันปัญหาการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเกินไปจนบดบังเซลล์เยื่อบุผิว (Fibroblast overgrowth) ในขณะที่เซลล์เยื่อบุผิวมีพันธะระหว่างเซลล์ที่แข็งแรงกว่าจึงไม่พบการหลุดลอกออกมาปนเปื้อน การกำหนดลำดับความเข้มข้นของเอนไซม์จากสูงไปต่ำร่วมกับการจำกัดเวลาที่เหมาะสม จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เตรียมเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงได้ตามต้องการ สำหรับการคัด

แยกเซลล์เยื่อบุผิว พบว่ามีการตอบสนองต่อทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ภายใน 8-10 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hyun et al. (2019) และ Wanichpakorn and Kedjarune-Laggat (2010) ที่ยืนยันว่าการเลือกใช้ความเข้มข้น และระยะเวลาสัมผัสเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้การแยกเซลล์ประสบความสำเร็จ

3. บทบาทของอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อการคัดเลือกชนิดเซลล์ และส่งเสริมการเจริญเติบโต อาหารชนิด Keratinocyte-SFM ที่ปราศจากซีรัมมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และรักษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวได้อย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากมีส่วนประกอบสำคัญคือ Epidermal Growth Factor (EGF) และ Bovine Pituitary Extract (BPE) ที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์เยื่อบุผิวอย่างเฉพาะเจาะจง (CELLnTEC, n.d.) ในขณะที่อาหาร DMEM เสริมด้วย FBS ร้อยละ 10 เอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผ่านโกรทแฟกเตอร์กลุ่ม Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) และ Fibroblast Growth Factor (FGF) ซึ่งเป็นสารสำคัญในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ATCC, n.d.)

อย่างไรก็ตาม การพบเซลล์เยื่อบุผิวปะปนในอาหาร DMEM (ร้อยละ 20) ชี้ให้เห็นว่าอาหารชนิดนี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์มากกว่าการยับยั้งเซลล์เยื่อบุผิว เนื่องจากใน FBS ยังคงมีปัจจัยที่เพียงพอต่อการอยู่รอดของเซลล์เยื่อบุผิว (Khalili & Ahmad, 2015) โดยความแปรผันที่พบอาจเกิดจากปัจจัยเฉพาะตัวของอาสาสมัคร เช่น ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง ความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อเหืองอก และคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อพฤติกรรมการยึดเกาะ และการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Patil et al., 2020; Routray et al., 2016)

แม้การศึกษานี้จะดำเนินการในกลุ่มตัวอย่างจำนวนจำกัด แต่ผลการศึกษาที่ได้แสดงความสอดคล้องกัน โดยสามารถแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ได้สำเร็จครบทุกตัวอย่าง และมีอัตราการปนเปื้อนต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ใช้กลุ่มตัวอย่างขนาดใกล้เคียงกัน (Hu et al., 2023; Hyun et al., 2019; Ladke et al., 2023; Patil et al., 2020) ทั้งนี้ การใช้กลุ่มตัวอย่างขนาดเล็กเป็นแนวทางที่พบได้ทั่วไปในการวิจัยด้านเซลล์วิทยา เพื่อควบคุมความแปรผันจากปัจจัยเฉพาะตัวของอาสาสมัคร เช่น อายุ ความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อเหืองอก และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง ให้เหลือน้อยที่สุด (Routray et al., 2016)

จุดเด่นของแนวทางการแยกเซลล์แบบผสมผสาน (Combined isolation approach) ในการศึกษาครั้งนี้ คือการบูรณาการเทคนิคความแตกต่างของความไวต่อทริปซิน (Selective trypsinization) ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) ซึ่งแตกต่างจากแนวทางของ Hyun et al. (2019) และ Ladke et al. (2023) ที่เลือกใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยผู้วิจัยอาศัยความแตกต่างของกลไกการยึดเกาะพื้นผิวระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อบุผิว มากำหนดขั้นตอนการใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อกำจัดเซลล์ปนเปื้อนตั้งแต่ระยะเริ่มต้น (Initial step) ก่อนจะเพิ่มความบริสุทธิ์ของประชากรเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะในลำดับถัดไป แนวทางแบบผสมผสานนี้ไม่เพียงแต่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตที่เหนือกว่าของไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast overgrowth) ได้อย่างมีประสิทธิภาพตั้งแต่การถ่ายเลี้ยงเซลล์ระยะแรก (P1) แต่ยังสามารถให้ได้ประชากรเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 95 วิธีการดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกที่คุ้มค่า ลดความซับซ้อน และเหมาะสมสำหรับเป็นมาตรฐานการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด

อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ กล่าวคือ อัตราความสำเร็จ (Success rate) ของวิธีการคัดแยกเซลล์ยังขึ้นอยู่กับทักษะของผู้ปฏิบัติงานที่ต้องมีประสบการณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และความชำนาญในการใช้งานเครื่องมือ รวมถึงความพร้อมของเครื่องมือ และอุปกรณ์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (สมพงษ์ บุญให้ และอุดม ตังค้อย, 2562) นอกจากนี้ ยังมีข้อจำกัดด้านชนิดของเซลล์ เนื่องจากวิธีการนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อเหืองอกเป็นหลัก หากนำไปประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่อชนิดอื่นที่มีองค์ประกอบของเซลล์ต่างออกไป ประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์อาจแปรผันตามพารามิเตอร์ของเอนไซม์ที่ใช้ในส่วนของการจำแนกชนิดของเซลล์นั้น งานวิจัยนี้อาศัยการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเซลล์มาตรฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นหลัก โดยไม่ได้ยืนยันด้วยเทคนิคทางโมเลกุล (Molecular markers) หรือภูมิคุ้มกัน (Immunocytochemistry) ซึ่งมีความแม่นยำสูงกว่า แต่เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการปฏิบัติงานประจำที่ต้องการความรวดเร็ว และความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ การประเมินทางสัณฐานวิทยาที่แสดงความแตกต่างชัดเจนระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด จึงถือว่ามีความเพียงพอ และเหมาะสมสำหรับการใช้งานในเบื้องต้น

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การประยุกต์ใช้วิธีการแยกเซลล์แบบผสมผสาน (Combined isolation) โดยอาศัยเทคนิคความแตกต่างของความไวต่อทริปซิน (Selective trypsinization) ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะ (Selective media) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และความบริสุทธิ์ของเซลล์ในกระบวนการแยกเซลล์ปฐมภูมิจากเหงือกมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการนี้ช่วยลดอัตราการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์ภายหลังการถ่ายเลี้ยงครั้งแรก (P1) ให้เหลือเพียงร้อยละ 20 และได้ประชากรเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 95 จากการประเมินทางสัณฐานวิทยา แนวทางดังกล่าวนอกจากจะช่วยลดต้นทุนจากการจัดซื้อเซลล์มาตรฐาน และลดความสูญเสียของตัวอย่างแล้ว ยังถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นมาตรฐานการปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure) ของห้องปฏิบัติการต่อไป

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อยกระดับมาตรฐานงานวิจัยภายในห้องปฏิบัติการวิจัยเซลล์พันธุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยการจัดทำเป็นมาตรฐานการปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure: SOP) ที่ระบุพารามิเตอร์สำคัญไว้อย่างชัดเจน ได้แก่ ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มทริปซิน-อีดีทีเอ รวมถึงการเลือกใช้ระบบอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดเซลล์ เพื่อให้กระบวนการคัดแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และสามารถควบคุมคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานเดียวกันในทุกการทดสอบ

ข้อเสนอแนะสำหรับทำวิจัยครั้งต่อไป

1. การยืนยันคุณลักษณะของเซลล์ในระดับโมเลกุล ควรมีการตรวจสอบยืนยันเอกลักษณ์ของเซลล์เพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางโมเลกุล (Molecular markers) หรือปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันทางเซลล์วิทยา (Immunocytochemistry) ซึ่งเป็นการยืนยันชนิดของเซลล์ด้วยวิธีที่มีความจำเพาะสูง เพื่อความแม่นยำสูงสุด โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อชนิดเซลล์ ได้แก่ การใช้ Pan-cytokeratin สำหรับยืนยันเซลล์เยื่อบุผิว และ Vimentin สำหรับยืนยันเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Hyun et al., 2019)
2. การศึกษาความคงตัว และความเสถียรในระยะยาว ควรมีการติดตามความคงตัวของฟีโนไทป์ (Phenotype) เพื่อประเมินประสิทธิภาพ และความเสถียรในระยะยาว และเฝ้าระวังอัตราการปนเปื้อนข้ามชนิดของเซลล์อย่างต่อเนื่องในระหว่างการถ่ายเลี้ยงเซลล์ช่วง Passage 2 ถึง Passage 8 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานจริงในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้เนื่องจากการได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการวิจัยการพัฒนาประสิทธิภาพงานประจำ (Routine to Research) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอขอบคุณคลินิกศัลยกรรมปริทันต์ โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินการเก็บตัวอย่างเหงือกจากอาสาสมัคร

เอกสารอ้างอิง

- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2556). *หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). โอเดียนสโตร์.
- สมพงศ์ บุญให้ และอุดม ตังต้อย. (2562). การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์: ประวัติความเป็นมา พื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในงานบริการโลหิต. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร*, 1(5), 543–553. <https://doi.org/10.14456/chulamedbull.2019.46>
- ATCC. (n.d.). *Primary gingival fibroblast; normal, human, adult (HGF)*. Retrieved February 26, 2026 from <https://www.atcc.org/products/crl-2014>
- CELLnTEC. (n.d.). *Primary human gingival keratinocytes*. Retrieved February 26, 2026, from <https://cellntec.com/products/epithelia/oral-cells/>

- Diar-Bakirly, S., & El-Bialy, T. (2021). Human gingival fibroblasts: Isolation, characterization, and evaluation of CD146 expression. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2518–2526.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.053>
- de Abreu, F. A. M., Reis, I. D. G., Silva, G. A. B., & Jorge, E. C. (2019). Collection and culture of human connective tissue cells from gingival explant technique for oral tissue bioengineering. *International Journal of Morphology*, 37(4), 1229–1233. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000401229>
- Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (7th ed.). John Wiley & Sons.
- Hu, Z., Chen, Y., Gao, M., Chi, X., He, Y., Zhang, C., Yang, Y., Li, Y., Lv, Y., Huang, Y., & Deng, X. (2023). Novel strategy for primary epithelial cell isolation: Combination of hyaluronidase and collagenase I. *Cell Proliferation*, 56(1), e13320. <https://doi.org/10.1111/cpr.13320>
- Hyun, S.-Y., Mun, S., Kang, K.-J., Lim, J.-C., Kim, S.-Y., Han, K., & Jang, Y.-J. (2019). Amelogenic transcriptome profiling in ameloblast-like cells derived from adult gingival epithelial cells. *Scientific Reports*, 9(1), 3736. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40091-x>
- International Organization for Standardization. (2009). ISO 10993-5:2009—*Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
- Khalili, A. A., & Ahmad, M. R. (2015). A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18149–18184.
<https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- Ladke, V. S., Kumbhar, G. M., Joshi, K., Kheur, S., Bhonde, R., & Raut, C. (2023). Isolation, culture and morphological assessment of primary cell lines from human primary oral squamous cell carcinoma using explant technique. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(1), 257–266.
<https://doi.org/10.31557/APJCP.2023.24.1.257>
- Markovic, O., & Markovic, N. (1998). Cell cross-contamination in cell cultures: *The silent and neglected danger*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 34(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s11626-998-0040-y>
- Matinfar, A., Dezfulian, M., Haghighipour, N., Kurdtabar, M., & Pourbabaei, A. A. (2022). Replacement of trypsin by proteases for medical applications. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 21(1), 1–9.
<https://doi.org/10.5812/ijpr-126328>
- Patil, R., Kale, A. D., Mane, D. R., & Patil, D. (2020). Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 24(1), 68–75. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_282_19
- Routray, I., Mahmood, A., Ngwa, N. E., Tasleem, M., Sahin, K., Kucuk, O., & Ali, S. (2016). Cell line cross-contamination and accidental co-culture. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 1(5), 179–185.
<https://doi.org/10.15406/jsrt.2016.01.00031>

Soi, S., Bains, V. K., Jhingran, R., Madan, R., & Srivastava, R. (2018). Gingiva tissue is the issue: An overview.

Asian Journal of Oral Health and Allied Sciences, 8, 15–24.

<https://ajohas.com/archive/volume/8/issue/1/article/25271#article>

Wanichpakorn, S., & Kedjarune-Laggat, U. (2010). Primary cell culture from human oral tissue: Gingival

keratinocytes, gingival fibroblasts, and periodontal ligament fibroblasts. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32(4), 327–331. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/SONG/10610588.pdf>