บทฟื้นฟูวิชาการ . Review Article

การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ เพื่อเป็นโมเดลสำหรับทดสอบยาระดับหลอดทดลองในงานวิจัยด้านมะเร็ง

ปริญญ์ สังข์วรรณ์[1,3], วันชนะ สืบไวย[2,3*]

[1]สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[3]สถาบันวิจัยมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Three-dimensional Cell Culture Model for *In-Vitro* Drug-Testing Platforms in Cancer Research

Prin Sungwan[1,3], Wunchana Seubwai[2,3*]

[1]*Biomedical Science program, Graduate School, Khon Kaen University*

[2]*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*

[3]*Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University*

Received: 18 September 2020 / Edit: 19 October 2020 / Accepted: 30 September 2021

เคมีบำบัดและยารังสีรักษาถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งหลายชนิดมักแสดงคุณสมบัติดื้อต่อวิธีการรักษาดังกล่าว ดังนั้นการหายารักษามะเร็งชนิดใหม่ ที่มีประสิทธิภาพและลดผลข้างเคียงของการรักษาจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบยาต้านมะเร็งและยารังสีรักษาในระดับหลอดทดลอง ด้วยการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งในสภาวะสองมิติยังมีข้อจำกัดหลายประการส่งผลให้การตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งและยารังสีรักษาในระดับหลอดทดลอง มีความแตกต่างกับการตอบสนองในระดับสัตว์ทดลองรวมถึงการทดสอบทางคลินิก จากเหตุผลข้างต้นจึงมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะสามมิติ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิตินี้มีคุณสมบัติหลายประการที่ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งที่ปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองหรือเซลล์มะเร็งที่อยู่ในร่างกายของผู้ป่วย บทความปริทัศน์ฉบับนี้จะกล่าวถึงข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะสองมิติ และการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะสามมิติ รวมไปถึงการประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในการศึกษามะเร็งในแง่มุมต่าง ๆ ได้แก่ การทดสอบยาเคมีบำบัดและยารังสีรักษา การศึกษากระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งและการศึกษาเมแทบอลิซึมของมะเร็ง

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ; การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติ; การค้นหาและพัฒนายา; การทดสอบในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง; มะเร็ง

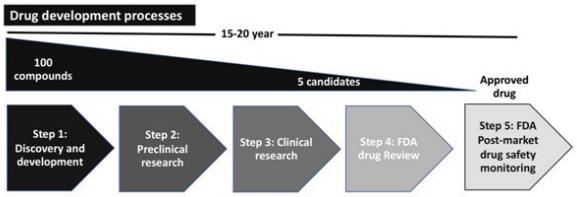
Chemotherapy and radiotherapy are widely used as a standard treatment regimen for many cancers. However, resistance to the standard treatment regimens usually occurs for several malignant tumors. Thus, searching for novel anticancer agents with high therapeutic effectiveness and less side effects is urgently needed. However, there are several evidences suggesting that two-dimensional (2D) cell culture models cannot recapitulate key characteristics of *in-vivo* tumor and do not provide *in-vivo* and clinically relevant data for anti-cancer drug discovery and development. Therefore, three-dimensional (3D) cell culture models have been developed. Cultured cells under 3D cell culture models provide several aspects of *in-vivo* solid tumor and offer better *in-vitro* models for anti-cancer drug screening and validation. This review article will clarify the limitations of 2D cell culture models and application of 3D cell culture models as a better *in-vitro* models for cancer research. Including, application 3D cell culture models in chemo- and radiotherapy testing, cancer metastasis, cancer stem cell and cancer metabolisms.

Keywords: 3D cell culture models; 2D cell culture models; drug discovery and development; *in-vitro* models; cancer

*Corresponding author : Wunchana Seubwai, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. E-mail: wunchanas@yahoo.com

บทนำ

โรคมะเร็งถือว่าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่ยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีประชาการสูงถึง 18.1 ล้านคนถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็ง และมีการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 9.6 ล้านคนทั่วโลก[1] การรักษามะเร็งในปัจจุบัน ไม่ว่าจะรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด หรือการผ่าตัดร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดและยารังสีรักษา พบว่ามะเร็งหลายชนิดมักมีการตอบสนองต่อการรักษาต่ำ ดื้อต่อยาเคมีบำบัดและยารังสีรักษา อีกทั้งมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติสูง ด้วยเหตุผลดังกล่าว การพัฒนายารักษามะเร็งชนิดใหม่ ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ปัจจุบันกระบวนการพัฒนายาชนิดใหม่เป็นกระบวนการที่ใช้เวลายาวนานและใช้งบประมาณอย่างมาก โดยอาจใช้งบประมาณมากถึง 2.6 พันล้านดอลลาร์ในการพัฒนายาหนึ่งชนิดจนได้รับอนุญาตให้ใช้และวางขายในท้องตลาด[2] การพัฒนายาชนิดใหม่ประกอบด้วยขั้นตอนคร่าว ๆ ดังนี้ (1) การค้นหาและพัฒนา (discovery and development) ถือเป็นขั้นตอนแรกสุด และใช้เวลาค่อนข้างยาวนาน เป็นการรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับโครงสร้าง การออกฤทธิ์ของยา หรือกลุ่มของสารประกอบที่มีฤทธิ์ตามที่ต้องการจะศึกษา เช่น ฤทธิ์ในการต้านกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (2) การศึกษาในระดับพรีคลินิก (preclinical study) เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยา ความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลข้างเคียง เป็นต้น ก่อนที่จะทำการศึกษาในมนุษย์ต่อไป โดยในการศึกษาในระดับพรีคลินิกนี้ สารประกอบหลายพันชนิดจะถูกทดสอบในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (*in-vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in-vivo*) สารประกอบที่ผ่านการทดสอบจะถูกนำไปทดสอบในมนุษย์ต่อไป (3) การทดสอบในมนุษย์ หรือการวิจัยทางคลินิก (clinical trials) เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ศึกษาว่าสารประกอบเหล่านั้นสามารถออกฤทธิ์ในร่างกายของมนุษย์และมีความปลอดภัยหรือไม่ โดยมีเพียงจำนวนไม่กี่ชนิดในจำนวนสารประกอบเริ่มต้นหลายพันชนิด ที่สามารถผ่านการวิจัยทางคลินิก ได้[3] (4) การตรวจสอบและการขึ้นทะเบียนยา (FDA drug review) หลังจากสารประกอบผ่านการวิจัยทางคลินิกแล้ว ลำดับถัดมาจะเป็นการตรวจสอบข้อมูลและผลที่ได้โดยละเอียดอีกครั้งโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) เพื่อพิจารณาให้สามารถใช้สารประกอบดังกล่าวเป็นยาและออกขายสู่ท้องตลาด และ (5) กระบวนการเฝ้าระวังหลังจากที่ยาได้รับอนุญาตให้ใช้ (FDA post-market drug safety monitoring) (รูปที่ 1) หนึ่งในกระบวนการสำคัญของการค้นหาและพัฒนายารักษามะเร็งชนิดใหม่คือ การทดสอบยาในระดับพรีคลินิกโดยการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งในสภาวะสองมิติ อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งภายใต้สภาวะสองมิติที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองหรือผู้ป่วย และนำไปสู่การแสดงออกของจีนและการตอบสนองต่อยาที่ไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จากสัตว์ทดลองหรือการทดสอบทางคลินิก[4] ด้วยเหตุผลข้างต้นส่งผลให้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ ซึ่งมีคุณสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งในร่างกายมากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสภาวะสองมิติ ด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมา การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการทดสอบการตอบสนองต่อยาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง[5,6]

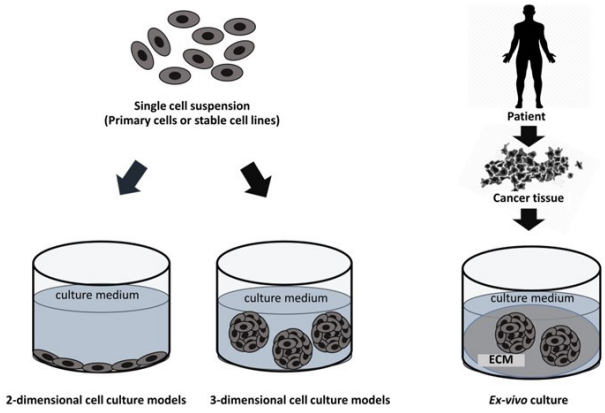


รูปที่ 1 กระบวนการพัฒนาและค้นพบยาใหม่ (drug development processes) ประกอบด้วยขั้นตอนย่อยเป็นลำดับขั้นตอนการศึกษาดังนี้ (1) การค้นพบและพัฒนา (2) การทดลองก่อนการทดสอบในมนุษย์ หรือการศึกษาในระดับพรีคลินิก (3) การศึกษาระดับคลินิก (4) การตรวจสอบและการขึ้นทะเบียนยา และ (5) กระบวนการเฝ้าระวังหลังจากที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ (ดัดแปลงจาก Barnes และคณะ 2015)[3,18,19]

แบบจำลองการศึกษาในหลอดทดลองสำหรับทดสอบและพัฒนายาต้านมะเร็ง

in-vitro มีความหมายมาจากภาษาละตินว่า “in glass” หมายถึง การศึกษาในหลอดทดลอง หรือ การศึกษาทางชีวภาพภายนอกร่างกายของสิ่งมีชีวิต[7] โดยการศึกษา *in-vitro* มีบทบาทสำคัญอย่างมากในงานทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและวิทยาศาสตร์สุขภาพ เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ ทั้งเซลล์ที่อยู่ภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพ[8] ปัจจุบันเซลล์เพาะเลี้ยงถูกนำมาใช้ในการศึกษาด้านมะเร็งวิทยาอย่างแพร่หลาย อาทิ การศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระดับชีววิทยาโมเลกุล การเจริญเติบโตและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การทดสอบบทบาทของสารเคมีในการเหนี่ยวนำการเกิดมะเร็ง รวมไปถึงการคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งของยาหรือสารประกอบต่าง ๆ ก่อนนำไปทดสอบในสัตว์ทดลองหรือการทดสอบทางคลินิกเป็นลำดับถัดไป[9] โดยแบบจำลองการศึกษาในหลอดทดลองสำหรับทดสอบและพัฒนายาต้านมะเร็งได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสองมิติ (2-dimensional cell culture models), การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสามมิติ (3-dimensional cell culture models) และ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วย (ex-vivo tissue culture)[10] (รูปที่ 2)

เป็นระยะเวลากว่าศตวรรษที่การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาเซลล์มะเร็งในระดับพรีคลินิก[11] อันเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะสองมิติมีค่าใช้จ่ายน้อย ง่ายต่อการวิเคราะห์ผล และสามารถทำในปริมาณมาก (high throughput platform) โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งมีการเจริญเติบโตแบบชั้นเดียว (monolayer) โดยยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะ (anchorage dependence) โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งแต่ละชนิด เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะนี้มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว[12] เนื่องจากแต่ละเซลล์สามารถได้รับอาหารอย่างทั่วถึงและใกล้เคียงกัน เอื้อต่อการศึกษาพฤติกรรมและการ



รูปที่ 2 รูปแบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในระดับ *in-vitro* ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาและมะเร็งวิทยา ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติ การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ และ *ex-vivo* culture เป็นการนำเอาเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากสิ่งมีชีวิตโดยตรง นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ง่ายภายนอกร่างกาย (ดัดแปลงจาก Gaebler และคณะ 2017)[43]

ตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อสิ่งเร้า ยาหรือสารเคมีต่าง ๆ จึงทำให้รูปแบบการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ได้รับความนิยมและใช้อย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการศึกษาจำนวนมากรายงานไปในทิศทางเดียวกันว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ไม่สามารถจำลองสภาวะของมะเร็งภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ อาทิ การที่ก้อนมะเร็งในสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดและหลายสภาวะ (tumor architecture and heterogeneity) การสื่อสารระหว่างเซลล์และเซลล์กับเมทริกซ์ (cell to cell and cell to extracellular matrix interaction) เป็นต้น อันส่งผลถึงพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งและการตอบสนองต่อยารักษามะเร็ง[13 - 16] การศึกษาของ Birgersdotter และคณะ[17] พบว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงแบบสองมิติมีการแสดงออกของจีนที่เปลี่ยนแปลงไปจากเนื้อเยื่อต้นกำเนิดของเซลล์นั้น ๆ ตัวอย่างเช่น จีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และเมแทบอลิซึมมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ส่วนจีนที่เกี่ยวข้องกับการ รับส่งสัญญาณที่ผิวเซลล์ มีการแสดงออกที่ลดลง ด้วยข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสองมิตินี้ อาจส่งผลให้ผลของการทดสอบยาระดับเซลล์เพาะเลี้ยงไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในสัตว์ทดลอง หรือการทดสอบในระดับคลินิก เป็นเหตุให้สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจำนวนมากที่ถูกทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง ประสบความล้มเหลวหรือถูกถอนออกเป็นจำนวนมากในระหว่างทำการศึกษาในสัตว์ทดลองและระดับคลินิก โดยมีเพียงประมาณร้อยละ 5-10 ของสารประกอบที่ผ่านการทดสอบในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง เท่านั้นที่ผ่านการทดสอบในระดับคลินิกและน้อยกว่านั้นที่ได้รับอนุญาตให้ใช้และออกสู่ท้องตลาด[18]

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า กระบวนการพัฒนาและค้นพบยาใหม่นั้นเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลายาวนานและใช้งบประมาณเป็นจำนวนมาก สารประกอบจำนวนมากที่ผ่านการศึกษาระดับเซลล์เพาะเลี้ยง ประสบความล้มเหลวเมื่อนำมาศึกษาต่อในระดับสัตว์ทดลอง และการทดสอบในระดับคลินิก อันแสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสองมิติ ทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติที่มีความใกล้เคียงกับสภาวะที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ถูกพัฒนาขึ้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสามมิติ

การเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติถูกพัฒนาครั้งแรกในช่วงปีคริสต์ศักราช 1970 โดย Sutherland และคณะ[19] พบว่าเมื่อเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติจะมีการเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ที่มีลักษณะทรงกลม ซึ่งถูกเรียกว่า “Spheroid” หรือ “multicellular tumor spheroid (MCTS)” [15] MCTS มีรูปแบบการเจริญเติบโต (growth pattern) ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งที่ปลูกถ่ายในหนูทดลอง โดยเซลล์บริเวณรอบนอกของ MCTS มีการแบ่งตัวมากกว่าเซลล์ที่อยู่ภายในก้อน MCTS นอกจากจะมีรูปแบบการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับมะเร็งภายในร่างกายแล้ว เซลล์มะเร็งใน MCTS ยังถูกล้อมรวบด้วยเซลล์ข้างเคียง อันส่งเสริมการสื่อสารของเซลล์ในทุกทิศทางใกล้เคียงกับเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตมากกว่าเซลล์ที่ยึดเกาะกับพื้นผิวพลาสติกหรือแก้วภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ จากรายงานการศึกษาของ Holliday และคณะ[20] พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) ภายใต้สภาวะแบบสามมิติ มีการจัดเรียงของเซลล์แต่ละชนิดรวมไปถึงพฤติกรรมการทะลุผ่านเยื่อพื้นฐาน (basement membrane) ใกล้เคียงกับมะเร็งดังกล่าวในสิ่งมีชีวิต ในขณะที่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ นอกจากนี้การศึกษาของ Sandberg และ Emberg[21]รายงานว่าการแสดงออกของจีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งภายใต้สภาวะสองมิติ มีการแสดงออกที่แตกต่างกับตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งจากผู้ป่วยประมาณร้อยละ 30 โดยจีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์และกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ รวมไปถึงกระบวนการเมแทบอลิซึมมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่จีนที่เกี่ยวข้องกับการรับ-ส่งสัญญาณที่ผิวเซลล์ (membrane signaling) และ cell adhesion molecules มีการแสดงออกที่ลดลง รวมไปถึงการจัดเรียงของโครงร่างเซลล์ (cytoskeleton) ที่ผิดแปลกไป[22,23]ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งภายใต้สภาวะสองมิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วย การแสดงออกของจีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจส่งผลให้การตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติต่อยารักษามะเร็งแตกต่างไปจากก้อนมะเร็งในร่างกายได้ นอกจากนี้ Jung และคณะ[24] พบว่าจีนที่แสดงออกของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติทั้งการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ชนิดเดียว และเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ตัวอย่างเช่น Mcl-1, ERK, AKT, TGFA เป็นต้น รวมไปถึงกลุ่มของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา มีความใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อมะเร็งตับจากผู้ป่วยมากกว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติรวมไปถึงการตอบสนองต่อยารักษามะเร็งของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติ แสดงลักษณะดื้อต่อยา doxorubicin และ และยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า sorafenib สูงกว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงสภาวะสองมิติอีกด้วย

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติมีการจับตัวกันเป็นก้อนทรงกลม ซึ่งประกอบไปด้วย

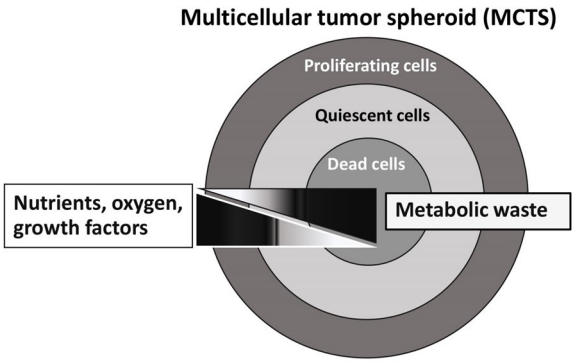
เซลล์หลายสภาวะและมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งในผู้ป่วยมากกว่า (ตารางที่ 1) โดยเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบนอกของ MCTS จะได้รับอาหาร น้ำตาล โกรทแฟคเตอร์ ออกซิเจน และปัจจัยต่าง ๆ ในการดำรงชีวิตโดยตรงจากอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เซลล์บริเวณรอบนอกนี้มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวที่รวดเร็ว (high proliferating cells) ขณะที่เซลล์ที่อยู่ในลำดับถัดมาจะได้รับอาหารและปัจจัยต่าง ๆ ลดหลั่นลงไป เป็นผลให้เซลล์บริเวณนี้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีการแบ่งตัวหรือมีการแบ่งตัวช้า (quiescent cells) ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์บริเวณนี้ยังมีการกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่ตอบสนองต่อสภาวะพร่องออกซิเจน เช่น HIF-1∝ อีกด้วย ในขณะเซลล์ที่อยู่ส่วนกลางของ MCTS ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ตาย (necrotic cells) เนื่องจากไม่ได้รับอาหารและปัจจัยต่าง ๆ อีกทั้งยังมีการสะสมของเสียจากเมแทบอลิซึม (metabolic waste) ในบริเวณนี้อีกด้วย[25] ดังแสดงในรูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างภายในของ MCTS มีความใกล้เคียงกับโครงสร้างของก้อนมะเร็งภายในร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะบริเวณระหว่างหลอดเลือดภายในก้อนมะเร็ง (intervascular region) และ ก้อนมะเร็งขนาดเล็กที่แพร่กระจายไปยังส่วนอื่นของร่างกาย (micrometastasis)[16] การที่เซลล์ภายในก้อนมะเร็งประกอบไปด้วยหลายสภาวะเช่นนี้ส่งผลต่อการตอบสนองของยาที่แตกต่างกันในเซลล์แต่ละสภาวะ เช่น ยาเคมีบำบัดโดยทั่วไปจะออกฤทธิ์กับเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งอยู่บริเวณรอบนอกของก้อนมะเร็ง ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ภายในก้อนมะเร็งอาจจะได้รับผลของยาเคมีบำบัดน้อยหรือไม่ได้รับผลกระทบจากยา ส่งผลให้เซลล์บริเวณนี้กลับมาแบ่งตัวและทำให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง (tumor recurrence) ซึ่งตรงกันข้ามกับพฤติกรรมของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งที่ถูกเพาะเลี้ยงแบบสภาวะสองมิติ ซึ่งเซลล์มีพฤติกรรมที่แบ่งตัวเร็วเนื่องจากได้รับอาหารอย่างทั่วถึงดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้เซลล์ในสภาพนี้มีแนวโน้มที่จะตอบสนองไวต่อยารักษามะเร็งมากกว่าที่ควรจะเป็นเมื่อเปรียบเทียบกับก้อนมะเร็งในร่างกายมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ ยังมีข้อจำกัดบางประการเช่น ไม่สามารถจำลองสภาวะของมะเร็งชนิดที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นก้อน (non-solid tumor) เช่น มะเร็งเม็ดเลือดได้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสามมิติจำนวนมากถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วโดยสามารถจำแนกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสามมิติได้สองประเภท ดังนี้ scaffold-based techniques และ scaffold-free techniques[13,14] (รูปที่ 4) โดยแต่ละเทคนิคมีจุดเด่นและข้อจำกัดที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติแบบไม่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold-free techniques)

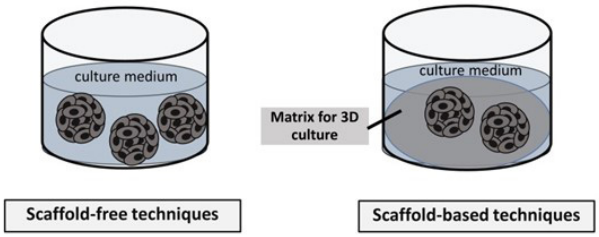
เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติแบบไม่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ อาศัยหลักการป้องกันการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการจับกันระหว่างเซลล์ด้วยกันเอง ตัวอย่างเช่น (1) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในภาชนะที่มีการเคลือบด้วยสารที่มีความเฉื่อย ไม่มีประจุเพื่อลดแรงยึดเกาะ (ultralow attachment) เช่น poly hydrogel หรือ (2) เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโตภายในหยดของอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้แรงโน้มถ่วงของโลกเพื่อหลีกเลี่ยงการยึดเกาะของเซลล์กับ



รูปที่ 3 เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติได้รับอาหาร ออกซิเจน และปัจจัยต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน โดยเซลล์บริเวณรอบนอกได้รับสารอาหารและปัจจัยต่าง ๆโดยตรงจากอาหารเพาะเลี้ยง และเซลล์ที่อยู่ภายในได้รับสารอาหารลดหลั่นลงไป ตาม physiological gradient ของก้อน MCTS ในทางตรงกันข้ามบริเวณตรงกลางของ MCTS มีการสะสมของของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้โครงสร้างของ MCTS ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีอัตราการแบ่งตัวเร็ว (proliferating cells) เซลล์ที่อยู่สภาวะที่นิ่งไม่มีการแบ่งตัวหรือมีการแบ่งตัวช้า (quiescent cells) และเซลล์ตาย (ดัดแปลงจาก Verjans, 2014)[44]

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติ และ สามมิติ (ดัดแปลงจาก Edmondson, 2014)[16]

ลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์	เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ	เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติ
การเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์	มักมีการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วกว่า *in-vivo*	มีการเจริญเติบโตที่กใกล้เคียงกับ *in-vivo* และช้ากว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ
สันฐานวิทยาของเซลล์	เซลล์มีลักษณะแบนและยืดตัวออกมีการจัดเรียงตัวเพียงชั้นเดียว	เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมใกล้เคียงกับสภาพในธรรมชาติ
การแสดงออกของยีน	มักมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างออกไปเมื่อเปรียบเทียบกับ *in-vivo*	มีการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับ *in-vivo* มากกว่า
สถานะของเซลล์ในระยะการแบ่งเซลล์	เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในสถานะแบ่งตัวเช่นเดียวกัน	ประกอบด้วยเซลล์ในหลายสถานะ (proliferating, quiescent, dead)



รูปที่ 4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติแบบไม่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ และใช้โครงเลี้ยงเซลล์ ที่มีคุณสมบัติการอุ้มน้ำและความยืดหยุ่นคล้ายเนื้อเยื่อ (ดัดแปลงจาก Edmondson, 2014)[16]

ภาชนะเพาะเลี้ยง ซึ่งเรียกว่าวิธี hanging drop (3) อาจทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีการหมุนวนของอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ spinner flask เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวของภาชนะ (4) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นเช่น magnetic levitation โดยให้เซลล์ซึมซับแม่เหล็กนาโนเข้าภายในเซลล์ จากนั้นใช้สนามแม่เหล็กเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการจับกันเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้โครงเลี้ยงเซลล์ นี้อาจจะเหมาะสมกับเซลล์มะเร็งที่ฟอร์มตัวเป็นก้อน MCTS ได้ง่าย และมีการหลั่ง extracellular matrix (ECM) เป็นจำนวนมากโดยไม่มีการเติม ECM เข้าไปรบกวนองค์ประกอบของการหลั่งสาร ECM ดังกล่าว[13]

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติแบบใช้โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold-based techniques)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติแบบใช้โครงเลี้ยงเซลล์ เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยง MCTS โดยอาศัย scaffold หรือ เมทริกซ์ (matrix) ซึ่งเป็นโครงข่ายของโพลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ หรือสังเคราะห์ขึ้น ในการอุ้มน้ำและยืดหยุ่นคล้ายเนื้อเยื่อ (tissue-like elastic properties) ตัวอย่าง scaffold ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติ เช่น hydrogel ซึ่งทำหน้าที่ช่วยเสริมการจัดเรียงกันของเซลล์เป็น MCTS (รูปที่ 4) อีกทั้งยังส่งเสริมการสื่อสารระหว่างเซลล์และเซลล์ รวมไปถึงการรับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงจากสภาพแวดล้อมภายนอกอันส่งผลถึงพฤติกรรมของเซลล์[26]

การประยุกต์ใช้เทคนิคการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในงานวิจัยด้านมะเร็ง

ด้วยข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสองมิติ ที่ไม่สามารถจำลองสภาวะที่ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งภายในร่างกายมนุษย์ และนำไปสู่ผลการศึกษาในระดับหลอดทดลองที่ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในสัตว์ทดลองหรือผลในร่างกายมนุษย์ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติ ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาในเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง ตัวอย่างเช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อยาเคมีบำบัดและยารังสีรักษา การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เป็นต้น

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในการทดสอบยาเคมีบำบัด

การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารต้านมะเร็งอย่างแพร่หลาย โดยส่วนใหญ่แล้วเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติมักจะตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดหรือสารต้านมะเร็งต่ำกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ ทั้งนี้เนื่องด้วย ปัจจัยต่าง ๆ ของเซลล์ที่อยู่ในรูปแบบ MCTS อันได้แก่ การสื่อสารระหว่างเซลล์กับเซลล์ข้างเคียงและเซลล์กับเมทริกซ์ในทุกทิศทาง, การแสดงออกของจีน, การที่เซลล์ภายใน MCTS ประกอบไปด้วยเซลล์หลายสภาวะ (high proliferating cells, quiescent cells, necrotic or dead cells) หรือ tumor heterogeneity, การแทรกซึมของยาเข้าสู่ก้อน MCTS เป็นต้น จากการศึกษาของ Lovitt และคณะ[27] พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกเพาะเลี้ยงแบบสภาวะสามมิติ มีการตอบสนองต่อยารักษามะเร็ง doxorubicin น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบสภาวะสองมิติโดยเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในแบบสภาวะสามมิติมีค่า IC50 สูงถึง 636.0 ± 160.3 μM ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติมีค่าดังกล่าวเพียง 87.7 ± 10.6 μM เท่านั้น โดยพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ anti-apoptotic proteins โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Bcl-2 และ Bcl-xL เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติ จากการการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติต้านทานต่อยา doxorubicin ผ่านการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ anti-apoptotic proteins นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ Beta1 integrins ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่รับส่งสัญญาณการเปลี่ยนแปลงจากบนผิวเซลล์ภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ส่งผลให้ก้อน MCTS มีขนาดเล็กลงและมีผลต่อรูปร่างของ MCTS อย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้น MC สามารถจำลองการแทรกซึมของยาเข้าสู่ก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองได้อีกด้วย การแทรกซึมของยาเข้าสู่ก้อนมะเร็งนั้นถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการออกฤทธิ์ของยาต้านมะเร็ง Yang และคณะ[5] พบว่า การแทรกซึมของ Nano-particle ที่เชื่อมต่อกับสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง podophyllotoxin (PPT) ใน MCTS ให้ผลสอดคล้องกับการแทรกซึมของสารดังกล่าวเข้าสู่ก้อนมะเร็งในหนูทดลอง อีกทั้งการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อ PPT ภายใน MCTS ให้ผลในทิศทางเดียวกันกับการตอบสนองของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง ไม่เฉพาะเพียงต้านทานต่อยาต้านมะเร็งมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามในบางงานวิจัยยังแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติมีความไวในการตอบสนองต่อยาสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติอีกด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลไกการออกฤทธิ์ของยาและการแสดงออกของจีนภายในเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงดังกล่าว ตัวอย่างเช่นจากการศึกษาของ Pickl และ Ries[28] พบว่า HER2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติ ซึ่งส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติดังกล่าวตอบสนองต่อยารักษาแบบมุ่งเป้า trastuzumab ได้ไวกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาของ Jung และคณะ[24] พบว่า เซลล์มะเร็งตับที่เพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติมีการ

แสดงออกของจีนในระดับ RNA ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งจากผู้ป่วยมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ โดยกลุ่มของจีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนสัญญาณระหว่างเซลล์ (cytokine signaling gens) เช่น TNF, MAPK รวมไปถึงกลุ่มจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา ตัวอย่างเช่น cytochrome p 450 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วย ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์มะเร็งตับที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติยังแสดงลักษณะต่าง ๆ ของมะเร็งตับ อาทิ มีการหลั่ง alpha-fetoprotein ซึ่งเป็นสารบ่งชี้มะเร็งตับในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งตับที่เลี้ยงในสภาวะสองมิติ และยังพบว่าการตอบสนองเซลล์มะเร็งตับที่เลี้ยงในสภาวะสามมิติมีการดื้อต่อยารักษามะเร็งทั้ง doxorubicin และ sorafenib โดยมีค่า IC50 มากกว่า 20 μM ในยาทั้งสองชนิด ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะสองมิติมีค่าดังกล่าวต่อยา doxorubicin และ sorafenib อยู่ที่ 2 และ 5 μM ตามลำดับ แสดงให้ถึงการดื้อต่อยารักษามะเร็งเพิ่มมากขึ้นของเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในสภาวะสามมิติ

ไม่ว่าจะมีการตอบสนองต่อยาที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลผลที่ได้จากการทดสอบยาในระดับหลอดทดลองโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติย่อมให้ผลที่แม่นยำและใกล้เคียงกับสภาพที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง และร่างกายมนุษย์มากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสองมิติ[15]

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะสามมิติในการตอบสนองต่อรังสีรักษา

นอกจากการทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยงแบบสภาวะสามมิติกับยาเคมีบำบัดแล้ว MCTS ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบการตอบสนองของมะเร็งต่อรังสีรักษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากลักษณะต่าง ๆ ของ MCTS ที่มีความใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งในผู้ป่วย[29] โดยส่วนใหญ่แล้วเซลล์ภายใน MCTS มีการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ หลังจากการได้รับยารังสีรักษา[30]ยิ่งไปกว่านั้นการที่เซลล์ภายใน MCTS มีสถานะการแบ่งตัวที่ต่างกันตามการได้รับอาหารและปัจจัยในการดำรงชีวิตของเซลล์ดังที่กล่าวมาก่อนหน้า ย่อมส่งผลต่อการตอบสนองต่อรังสีรักษาของ MCTS ให้มีความใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งในสิ่งมีชีวิตมากขึ้นด้วย ซึ่งตรงกันข้ามกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติที่ส่วนใหญ่เซลล์จะมีลักษณะเป็น high proliferating cells เพียงอย่างเดียว ยิ่งไปกว่านั้น Terasima และ Tolmach[31] พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกที่อยู่ในระยะ M-phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์กำลังแบ่งตัว และพบมากในเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสองมิติ มักจะตอบสนองไวต่อรังสีรักษามากที่สุด เป็นผลให้การทดสอบการตอบสนองของมะเร็งต่อรังสีรักษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสภาวะสองมิติอาจให้ผลการตอบสนองที่ไวเกินกว่าที่เกิดขึ้นจริงในก้อนมะเร็งจากสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Olive และDurand[32] พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติ มีการแสดงออกของ cell adhesion molecules เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง E-cadherin พบว่าการแสดงออกของ E-cadherin ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำหน้าที่ยึดเซลล์และเซลล์ข้างเคียงเข้าด้วยกัน มีผลต่อความแน่นและรูปร่างของก้อน MCTS อีกด้วย ส่งผลไปถึงการแทรกผ่านของยารังสีรักษาเข้าสู่ภายในก้อน MCTS และการตอบสนองต่อรังสีรักษาดังกล่าว จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น *in-vitro* model เพื่อทดสอบการตอบสนองของมะเร็งต่อรังสีรักษา และอาจให้ผลการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองและผู้ป่วยมากกว่าการใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสองมิติเพียงอย่างเดียว

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในการศึกษากระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

นอกจากการตรวจวัดการตอบสนองของเซลล์ภายใน MCTS ต่อยาต้านมะเร็ง ด้วยการวัดการมีชีวิตและการตายของเซลล์แล้ว ยังมีหลายเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในรูปแบบของ MCTS อีกด้วย ตัวอย่างเช่น modified Boyden chamber ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษากระบวนการ invasion ของ MCTS โดย MCTS จะถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับ extracellular matrix บน microporous membrane อันประกอบด้วยรูขนาดเล็กที่เซลล์สามารถผ่านได้ โดยด้านบนของ Boyden chamber จะมีลักษณะเป็นช่องสำหรับใส่อาหารที่มีการเพิ่ม growth factors และ chemoattractant ภายในไม่กี่ชั่วโมงเซลล์ภายใน MCTS จะมีการเคลื่อนที่ออกจาก MCTS ผ่าน microporous membrane เพื่อขึ้นไปหาแหล่งที่มี growth factors และ chemoattractant ที่อุดมสมบูรณ์ด้านบน เราสามารถศึกษาการ migration ด้วยวิธีนี้[13]และยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ด้านบนของ microporous membrane เพื่อจำลองการบุกรุกแทรกทะลุผ่านของเซลล์มะเร็ง (invasion) ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่น ๆ เช่น การเพาะเลี้ยง MCTS ร่วมกับการเติม extracellular matrix ที่อุดมไปด้วย growth factors และ chemoattractant ภายในไม่กี่ชั่วโมงเซลล์จะมีการเคลื่อนที่ออกจากก้อน MCTS ในทุกทิศทางและแทรกตัวเข้าสู่ extracellular matrix วิธีนี้เป็นการจำลอง invasion and migration ของเซลล์มะเร็งออกจากก้อนมะเร็งและแทรกตัวผ่าน matrix ต่าง ๆ ภายในร่างกายได้[14]เนื่องด้วยเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในรูปแบบของ MCTS ถูกล้อมรอบด้วยสภาพแวดล้อมแบบสามมิติอันส่งผลให้พฤติกรรมของเซลล์มีความใกล้เคียงกับสภาพในสิ่งมีชีวิตมากกว่า[33]

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในก้อนมะเร็งภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยมีคุณสมบัติต่าง ๆ ทั้งการแบ่งเซลล์ลักษณะเดิมทดแทนตัวเองได้อย่างไม่จำกัด (unlimited self-renewal) และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (differentiation) ไปเป็นประชากรเซลล์ชนิดต่าง ๆ ภายในก้อนมะเร็งส่งผลให้เกิดความหลากหลายของประชากรเซลล์ในก้อนมะเร็งเพียงก้อนเดียว (heterogeneity) อีกทั้งยังมีบทบาทในการส่งเสริม การก่อมะเร็ง (cancer initiation), การพัฒนาและการดำเนินไปของมะเร็ง (cancer progression), กระบวนการดื้อต่อยารักษา (drug resistance) และ การกลับ

มาเป็นใหม่ของโรค (tumor recurrence) เป็นต้น[34,35] ด้วยเหตุนี้แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในการศึกษาและพัฒนายาที่มีผลยับยั้งเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติถูกนำเข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมากขึ้น โดยจะนิยมเรียกก้อนของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมคล้าย MTCS ว่า tumorospheres[15] โดย tumorospheres ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษา cancer stem cells อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้การศึกษาของ Guo และคณะ[36] รายงานว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งหลายชนิดได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งรังไข่ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับอ่อน และเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งต่อมลูกหมาก บางจำนวนภายในก้อน MCTS มีการแสดงออกของสารบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell markers) มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ชนิดเดียวกันที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ จากการศึกษาของ Lee และคณะ[37] ได้ทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งโดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งกระเพาะอาหาร SNU-638 และ SNU-484 มาทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution assay) จนได้ค่าคาดหมายปริมาณหนึ่งเซลล์ต่อหนึ่งเวล แล้วทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติ โดยถือว่า tumorospheres ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะ anchorage independence จากหนึ่งเซลล์ไปเป็นหลายเซลล์ที่มีลักษณะรวมตัวกันเป็นก้อนกลมแน่น (single cell-derived spheroids) แสดงถึงความสามารถในการแบ่งตัวเองได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือ differentiation ไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (self-renewal) อันเป็นลักษณะสำคัญของเซลล์ต้นกำเนิด อีกทั้งยังมีการแสดงออกที่สูงขึ้นของสารบ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอาทิ SOX2, NANOG ที่สูงขึ้นอีกด้วย ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 1.4 และ 54 ของจำนวนเซลล์ SNU-638 และ SNU-484 ตามลำดับ มีความสามารถในการแบ่งตัวทดแทนตัวเอง (self-renewal) คือสามารถเจริญเป็น single cell-derived spheroids ได้ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการ subculture cell และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสามมิติเช่นเดิมพบว่าเซลล์กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวมีปริมาณที่สูงขึ้น จาก 1.4 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 21.1 สำหรับเซลล์ชนิด SNU-638 และ ร้อยละ54 ไปเป็น 96.1 สำหรับเซลล์ชนิด SNU-484 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์ที่อยู่ในสภาวะดังกล่าวมีการแสดงออกของ stem cell marker ได้แก่ NANOG, SOX2 และ OCT4 ที่สูงขึ้นอีกด้วยแสดงให้เห็นว่า คุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอาจถูกเหนี่ยวนำและรักษาไว้เมื่อเซลล์มะเร็งถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะสามมิติ และอาจนำไปใช้ในการศึกษาต่อถึงความสัมพันธ์ระหว่าง เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และเซลล์มะเร็ง รวมไปถึงการตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพและที่มีความใกล้เคียงกับสภาพที่เกิดขึ้นจริงในก้อนมะเร็งในสิ่งมีชีวิตได้[38]

การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในการศึกษาเมแทบอลิซึมของมะเร็ง

นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้การเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะสามมิติในงานวิจัยมะเร็งด้านอื่น ๆ เช่น การศึกษาเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์มะเร็ง (cancer metabolism) เนื่องด้วยเซลล์ภายในก้อน MCTS ได้รับอาหาร และออกซิเจนน้อยกว่าเซลล์บริเวณรอบนอกของ MCTS รวมไปถึงการสะสมของเสียจากเมแทบอลิซึมและสภาวะพร่องออกซิเจนภายในบริเวณกึ่งกลางของ MCTS ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเช่นเดียวกันกับก้อนมะเร็งในผู้ป่วย สภาวะดังกล่าวเป็นปัจจัยที่ผลักดันให้เซลล์มะเร็งมักมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมไปจากเซลล์ปกติ โดยเซลล์มะเร็งมักจะใช้พลังงานในรูปของ ATP ที่ถูกสังเคราะห์ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) มากกว่ากระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain)[39] เรียกการเปลี่ยนแปลงลักษณะเช่นนี้ว่า “Warburg effect” โดยถือว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของมะเร็ง (hallmark of cancer)[40] ด้วยเหตุนี้การศึกษาสารหรือโมเลกุลที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างพลังงานผ่านวิถีไกลโคไลซิสจึงเป็นอีกแนวคิดหนึ่งในการศึกษาและพัฒนายารักษามะเร็ง ตัวอย่างเช่น การใช้ยาที่มีคุณสมบัติยับยั้งวิถีไกลโคไลซิส (2-deoxyglucose) ในเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติพบว่า การยับยั้งไกลโคไลซิสเพียงอย่างเดียวมักให้ประสิทธิภาพสูงในเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Koshkin และคณะ[41] ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านม พบว่า การให้ 2-deoxyglucose ร่วมกับ การยับยั้งกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าการยับยั้งวิถีไกลโคไลซิสเพียงอย่างเดียว เมื่อทดสอบกับ MCTS และให้ผลที่สอดคล้องกันเมื่อทำการศึกษาในระดับคลินิกที่ต้องใช้ 2-deoxyglucose ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ[42] จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการทดสอบยาโดยใช้ MCTS มีความใกล้เคียงกับการตอบสนองในสิ่งมีชีวิตมากกว่าการใช้การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะสองมิติ และยังอาจช่วยให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจถึงกลไกลการตอบสนองต่อยาของมะเร็งในสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสภาวะสองมิติเพียงอย่างเดียว

สรุปและวิจารณ์

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะสามมิติ เป็นสภาวะที่ให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตเป็นก้อนเรียกว่า MCTS ซึ่งเซลล์มะเร็งสามารสื่อสารกับเซลล์ข้างเคียงในทุกทิศทาง (3D cell to cell interaction) รวมไปถึงการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างเซลล์และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (3D cell to extracellular matrix interaction) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งที่ถูกเลี้ยงแบบสามมิติอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับเซลล์มะเร็งที่อยู่ภายในสัตว์ทดลองหรือร่างกายของผู้ป่วยมากกว่าเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงแบบสองมิติ โดยในปัจจุบันมีเทคนิคที่เลี้ยง MCTS อยู่หลายรูปแบบ สามารถจำแนกได้เป็นสองชนิดหลัก ๆ ได้แก่ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติที่ไม่อาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold-free techniques) และ แบบอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold-based techniques) จากข้อดีของการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะสามมิติที่กล่าวมา ส่งผลในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยมะเร็งในแง่มุมต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย เช่น การทดสอบยาเคมีบำบัด, การตอบสนองต่อยารังสี

รักษา, การศึกษากระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง เป็นต้น จากประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในสภาวะสามมิติที่กล่าวมา อาจช่วยพัฒนาการศึกษามะเร็งในระดับหลอดทดลอง (*in-vitro*) ให้มีความใกล้เคียงกับสภาพที่เกิดขึ้นจริงในสัตว์ทดลอง หรือ ร่างกายผู้ป่วย มากยิ่งขึ้น รวมไปถึงการพัฒนายารักษามะเร็งและกลยุทธ์ในการรักษาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

บทความฟื้นฟูวิชาการครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษา เพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ ประจำปีการศึกษา 2560

เอกสารอ้างอิง

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185
2. Avorn J. The $2.6 Billion Pill — Methodologic and Policy Considerations. N Engl J Med 2015; 372(20): 1877–1879.
3. Barnes PJ, Bonini S, Seeger W, Belvisi MG, Ward B, Holmes A. Barriers to new drug development in respiratory disease. Eur Respir J 2015; 45(5): 1197–1207.
4. Barbone D, Van Dam L, Follo C, Jithesh PV, Zhang SD, Richards WG, et al. Analysis of gene expression in 3D spheroids highlights a survival role for ASS1 in Mesothelioma. PLoS One 2016 ; 11(3): e0150044.
5. Yang Y, Roy A, Zhao Y, Undzys E, Li SD. Comparison of tumor penetration of podophyllotoxin–carboxymethylcellulose conjugates with various chemical compositions in tumor spheroid sulture and In vivo solid tumor. Bioconjug Chem 2017; 28(5): 1505–1518.
6. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front Pharmacol [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 2];9. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006/full
7. In Vivo vs. In Vitro: definition, examples, and More [Internet]. [cited Dec 14, 2019]. Available from: https://www.healthline.com/health/in-vivo-vs-in-vitro
8. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as In vitro models for drug screening and toxicity studies. Drug Dev Ind Pharm 2005 ; 31(8): 757–768.
9. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. Front Bioeng Biotechnol
10. Meijer TG, Naipal KA, Jager A, van Gent DC. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. Future Sci OA 2017; 3(2): FSO190.
11. Introduction. Harvey, William. 1909-1914. On the motion of the heart and blood in animals.
12. Merten O-W. Advances in cell culture: anchorage dependence. Philos Trans R Soc Lond B
13. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. Pharmacol Ther 2016; 163: 94–108.
14. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. BMC Biol 2012;10: 29. doi: 10.1186/1741-7007-10-29.
15. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. Neoplasia 2015; 17(1): 1–15.
16. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. ASSAY Drug Dev Technol 2014 ; 12(4): 207–218.
17. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—A growing
18. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates—where are we going wrong?. Nat Rev Clin Oncol 2011; 8(4): 189–190.
19. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J Natl Cancer Inst 1971; 46(1): 113–120.
20. Holliday DL, Brouilette KT, Markert A, Gordon LA, Jones JL. Novel multicellular
21. Sandberg R, Ernberg I. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. Genome Biol 2005; 6(8): R65.
22. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. Biophys J 2014; 107(8): 1821–1828.
23. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science 2001; 294(5547): 1708–1712.

24. Jung H-R, Kang HM, Ryu JW, Kim DS, Noh KH, Kim ES, et al. Cell spheroids with enhanced aggressiveness to mimic human liver cancer In vitro and In vivo. Sci Rep 2017; 7(1): 10499.

25. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol Adv 2016; 34(8): 1427–1441.

26. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. Biotechnol Bioeng 2009; 103(4): 655–663.

27. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated

28. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. Oncogene 2009; 28(3): 461–468.

29. Dubessy C, Merlin J-L, Marchal C, Guillemin F. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. Critical reviews in Oncology/Hematology 2000; 36(2): 179–192.

30. Schwachöfer JH. Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research (review). Anticancer Res 1990; 10(4): 963–965.

31. Terasima T, Tolmach LJ. Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature 1961; 190: 1210–1211.

32. Olive PL, Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. Cancer Metastasis Rev 1994; 13(2): 121–138.

33. Berens EB, Holy JM, Riegel AT, Wellstein A. A cancer cell spheroid assay to assess

34. Lee JW, Sung JS, Park YS, Chung S, Kim YH. Isolation of spheroid-forming single cells from gastric cancer cell lines: enrichment of cancer stem-like cells. Bio Techniques 2018; 65(4): 197–203.

35. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2012 ; 44(12): 2144–2151.

36. Guo X, Chen Y, Ji W, Chen X, Li C, Ge R. Enrichment of cancer stem cells by agarose multi-well dishes and 3D spheroid culture. Cell Tissue Res 2019; 375(2): 397–408.

37. Lee JW, Sung JS, Park YS, Chung S, Kim YH. Isolation of spheroid-forming single cells from gastric cancer cell lines: enrichment of cancer stem-like cells. Bio Techniques 2018; 65(4): 197–203.

38. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. Cancer Sci 2017; 108(3): 283–289.

39. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. Science 1956; 123(3191): 309–314.

40. Schwartz L, Supuran CT, Alfarouk KO. The Warburg Effect and the hallmarks of cancer. Anticancer Agents Med Chem 2017; 17(2): 164–170.

41. Koshkin V, Ailles LE, Liu G, Krylov SN. Metabolic suppression of a drug-resistant subpopulation in cancer spheroid Cells. J Cell Biochem 2016; 117(1): 59–65.

42. Dwarakanath B, Singh D, Banerji A, Sarin R, Venkataramana N, Jalali R, et al. Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: Present status and future prospects. J Can Res Ther 2009; 5(9): 21.

43. Gaebler M, Silvestri A, Haybaeck J, Reichardt P, Lowery CD, Stancato LF, et al. Three-dimensional patient-derived In vitro sarcoma models: promising tools for improving clinical tumor management. Front Oncol 2017; 7: 203.

44. Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?. J Cellular Physiol 2018; 233(4): 2993–3003.

SMJ