บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C Freezer	IlShin Lab, เกาหลี
6 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
12 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
96 Well Cell Culture Cluster Flat Bottom with Lid	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
96-well plate reader	Anthos, ออสเตรีย
Analytical balances	Mettler Toledo, สหรัฐอเมริกา
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Cell Culture Flask (25, 75 cm^2)	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	BioLogix Research Company, สหรัฐอเมริกา
CO_2 Incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Cryocentrifuge	Kendro Laboratory Product, เยอรมัน
Cryovial tube (2 ml)	Simport plastics, แคนาดา
Disposable Pasteur pipette	COPAN innovation, สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
EDTA tube	Vacuette, ออสเตรีย
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
FACSCalibur flow cytometer	BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา
Fluorescence microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Heat Block	Wealtec Corporation, สหรัฐอเมริกา

Hemocytometer	HBG, เยอรมัน
High-Pressure Steam Sterilizer	Tomy Kogyo, ญี่ปุ่น
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Larminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton , สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge	Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	CLP, เม็กซิโก
Micro Refrigerated Centrifuge	Vision Scientific, เกาหลี
Microscrope slide (1"x3"), Cover glass	Sail Brand, สาธารณรัฐประชาชนจีน
Pipette controller	Jencons (Scientific), อังกฤษ
Pipette tips (10, 200, 1000 µl)	Corning Incorporation, สหรัฐอเมริกา
Spectrophotometer	Shimadzu, ญี่ปุ่น
SpeedVac Concentrator	Thermo Electron Corporation สหรัฐอเมริกา
Sterile tube (5 ml)	SARSTEDT AG&Co, เยอรมัน
UV Transilluminator	UVItec, อังกฤษ
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลี
Water Bath	Memmert GmbH, เยอรมัน

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Actinomycin D	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Agarose gel	ISC BioExpress, สหรัฐอเมริกา
Annexin V staining	BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา
Boric acid	VWR international, สหรัฐอเมริกา
Camptothecin	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, สหรัฐอเมริกา
Cytotoxicity Detection Kit PLUS	Roche Diagnostics, เยอรมัน

Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมัน
Ethidium Bromide	Promega, สหรัฐอเมริกา
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	VWR international, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Flexigene DNA kit	QIAGEN GmbH, เยอรมัน
Fungizone Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen Corporation, สหรัฐอเมริกา
Isopropanol	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Ficoll-Hypaque	Technoclone, นอร์เว
Paclitaxel	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS) without calcium, without magnesium	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phytohemagglutinin (PHA)	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Propidium Iodide	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Ribonuclease A	SIGMA-ALDRICH, สหรัฐอเมริกา
Roswell Park Memorial Institute -1640 Medium (RPMI-1640 medium)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Sodium Acetate	Merck,เยอรมัน
Syringe 10 ml, needle 21G x 1"	Terumo, ญี่ปุ่น
Tris base	Promega, สหรัฐอเมริกา
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen Corporation, สหรัฐอเมริกา

3.2 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองและการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

3.2.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

1. H9 Human T lymphoma cell line (ATCC HTB-176)
เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง
ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Jurkat Human T cell lymphoblast-like cell line (ATCC TIB152)
เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.นพ.ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. HT-29 Human colon adenocarcinoma cell line (ATCC HTB-38)
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่
ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. HeLa Human cervical carcinoma cell line (ATCC CCL-2)
เซลล์มะเร็งปากมดลูก
ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. HEp-2 Human larynx carcinoma cell line (ATCC CCL 23)
เซลล์มะเร็งกล่องเสียง
ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.พรเทพ เทียนสิวากุล
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ RPMI-1640 และ DMEM เตรียม complete medium ปริมาตร 1 ลิตร โดยผสม RPMI-1640 (ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด H9 และ Jurkat) หรือ DMEM (ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 HEp-2 และHeLa) 900 ml ด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) ที่ heat inactivate แล้ว (โดยการบ่ม FBS ที่ละลายแล้วที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที) 100 ml จากนั้น

เติม 10,000 U/ml Penicillin - 10,000 µg/ml Streptomycin solution 10 ml และ 25 µg/ml Amphotericin B 1 ml ลงไป ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด H9 และ Jurkat เจริญใน complete RPMI medium ดังนี้ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10%(v/v) Fetal Bovine Serum, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml และ Amphotericin B 0.25 µg/ml เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) เจริญใน complete DMEM medium ดังนี้ DMEM ที่ประกอบด้วย 10%(v/v) Fetal Bovine Serum, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml และ Amphotericin B 0.25 µg/ml เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C

3.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

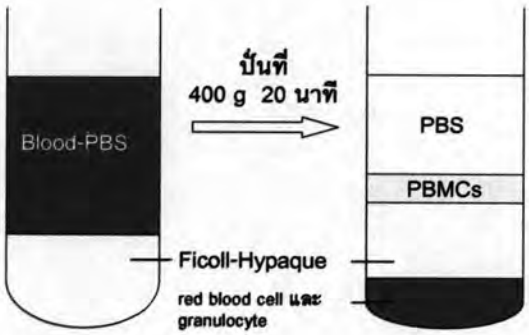
เซลล์ที่เพาะเลี้ยงควรทำการ Subculture ทุก 2-3 วัน สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด H9 และ Jurkat นั้น ดูดเซลล์ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นล้างที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นเทส่วน supernate ออก แล้ว resuspend เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 1-2 ml

สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนมีความหนาแน่น 80-90% ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ซึ่งอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 โดยล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 5 ml (สำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 ล้างเซลล์ด้วย PBS 10 ml) 2 ครั้ง เท PBS ออกแล้ว เติม EDTA-Trypsin 0.25% (1X) 1 ml (สำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 เติม EDTA-Trypsin 0.25% (1X) 3 ml) ทิ้งไว้ 2 นาที เมื่อครบเวลา เคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดออกจากพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นปิเปตต์ DMEM 5 ml ลงไปเพื่อฉีดชะล้างเซลล์ที่เกาะอยู่ออกให้หมด (สำหรับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 ปิเปตต์ DMEM 10 ml) แล้วดูดเซลลลงหลอดเพื่อปั่นเหวี่ยง นำเซลล์ไปปั่นล้างที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เทส่วน supernatant ออก แล้ว resuspend เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1-2 ml

3.4 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

หลักการ

ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวปกตินั้น อาศัยหลักการ Density gradient centrifugation (71) โดยการเจาะเลือดตัวอย่างจากเส้นเลือดดำใส่ใน EDTA tube จากนั้นเจือจางเลือดตัวอย่างด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดที่ได้ไปปั่นที่ 800 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนน้ำเลือด (plasma) ที่อยู่ด้านบนออก เติม PBS ให้เท่ากับปริมาณ plasma ที่ดูดออก ผสมให้เข้ากันก่อนย้ายไปใส่ในหลอดที่มี Ficoll-Hypaque (Density = 1.077) โดยการปิเปตต์เลือดลงไปในน้ำยาช้าๆ ด้วยอัตราส่วนของเลือดต่อน้ำยาเท่ากับ 4:3 นำไปปั่นที่ 400 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วน PBMCs ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นของ Ficoll-Hypaque กับ PBS (ดังรูปที่ 3.1) นำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ 400 g เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ เทส่วน supernatant ทิ้งไปแล้ว resuspend เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1-2 ml



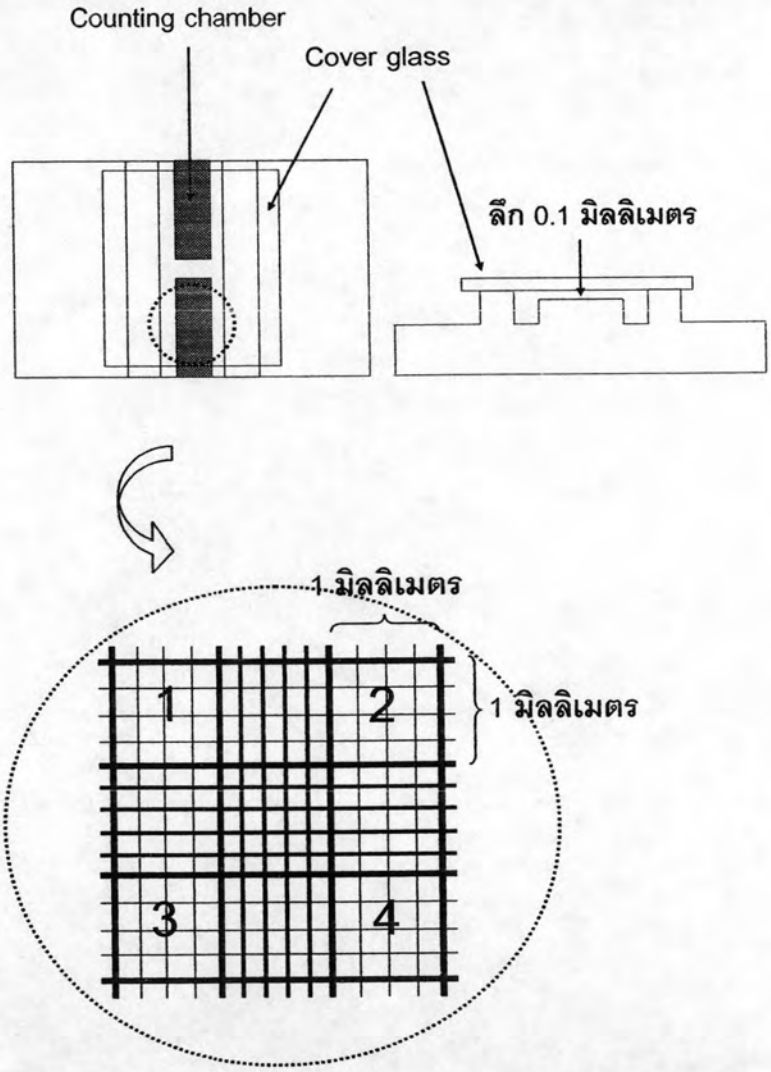
รูปที่ 3.1 การแยกเม็ดเลือดขาว PBMCs

3.5 การนับจำนวนเซลล์

การนับจำนวนเซลล์อาศัยหลักการ Trypan Blue Exclusion Method (72) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์แข็งแรง จึงไม่ยอมให้สิ่งแปลกปลอมหรือสีย้อมเช่น Trypan blue ผ่านเข้าสู่เซลล์โดยง่าย ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้ว หรือเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายไป ทำให้สีย้อมซึมผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสมของเซลล์ได้ง่าย ดังนั้นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีรูปร่างกลม วาวใส ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะติดสีน้ำเงินเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจนับจำนวนเซลล์ และเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่มีชีวิต โดยการนำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวไว้แล้วในข้อ 3.3 และ 3.4 มาผสมกับสีย้อม 0.4% Trypan blue stain ในอัตราส่วนที่ต้องการ ซึ่งจะ

เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด จากนั้นดูดเซลล์ที่ย้อมแล้วมา 10 µl ใส่ลงใน Hemocytometer (ดังรูปที่ 3.2) ทำเช่นเดียวกันทั้งสองด้านวางทิ้งไว้ 1-2 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า นับเซลล์จากช่องหมายเลข 1-4 แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำมาคำนวณร้อยละความมีชีวิต (% Viability) และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด



รูปที่ 3.2 Hemocytometer

1. ร้อยละความมีชีวิต (% Viability) = $\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$

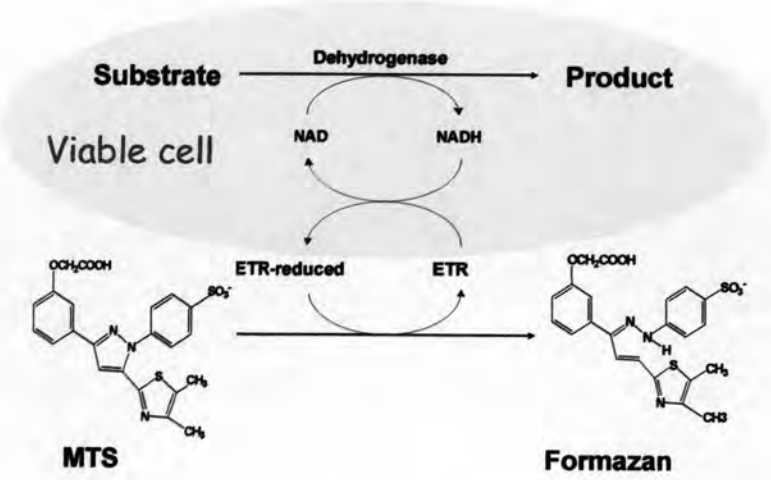
2. จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell/ml) = เซลล์ที่มีชีวิต x dilution factor x10^4 cell/ml

ค่า dilution factor คือค่าการเจือจางของเซลล์ ถ้าค่าของการเจือจางของเซลล์เป็น 1:10 ดังนั้น dilution factor มีค่าเท่ากับ 10

3.6 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดต่างๆ โดย MTS assay

หลักการ

อาศัยหลักการทำให้เกิดสี (colorimetric method) **โดยมีสารประกอบ** MTS **หรือ** tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นสารตั้งต้นและ phenazine ethosulfate (PES) ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลกตรอน สารประกอบ MTS จะถูกรีดิวซ์โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไปเป็นผลผลิต formazan ซึ่งเป็นสารที่มีสีและสามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เราสามารถวัดปริมาณผลผลิต formazan ที่เกิดขึ้นได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต การเปลี่ยนสารประกอบ MTS ให้กลายเป็นผลผลิต formazan นั้น อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ทำให้ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) ถ่ายเทอิเลกตรอนให้แก่ PES โดย PES ที่ถูกรีดิวส์จะไปรีดิวส์สารประกอบ MTS ให้กลายเป็นผลผลิต formazan ในที่สุด (ดังรูปที่ 3.3) (73) โดยงานวิจัยครั้งนี้ใช้น้ำยา CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, สหรัฐอเมริกา) ในการตรวจสอบ



รูปที่ 3.3 กระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้สารประกอบ MTS เปลี่ยนเป็น formazan

3.6.1 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

หลังจากแยกเม็ดเลือดขาวปกติได้แล้ว เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 1 x 10^5 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวด้วย Phytohemagglutinin (PHA) 5 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปทดสอบด้วย 0.5% DMSO (ตัวทำละลายพิเพอรีน) พิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1 – 80 µg/ml ยา Actinomycin D 1 ug/ml (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.6.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ

3.6.2.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) มะเร็งกล่องเสียง (HEp-2) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)

เตรียมเซลล์ก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate เมื่อครบเวลาแล้ว นำไปทดสอบด้วย 0.5% DMSO (ตัวทำละลายพิเพอรีน) พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.6.2.2 มะเร็งเม็ดเลือด H9 และ Jurkat

เตรียมเซลล์มะเร็ง H9 และ Jurkat ในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (fresh media) 24 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 200 µl ต่อหลุม ใน 96-well plate ทดสอบด้วย 0.5% DMSO (ตัวทำละลายพิเพอรีน) พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแล้ว เติม MTS reagent (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) 30 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาทดสอบ นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที และเก็บส่วนน้ำใสในจานเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader จากนั้นคำนวณค่า (IC_{50}) ของพิเพอรีน หรือค่าความเข้มข้นของพิเพอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ ได้ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ หาความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการเจริญของเซลล์กับความเข้มข้นของพิเพอรีนจากกราฟระหว่างความเข้มข้นของพิเพอรีนและค่าการดูดกลืนแสง (74)

3.7 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อ H9 และ Jurkat

3.7.1 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

3.7.1.1 การตรวจวัด Lactate Dehydrogenase (LDH) activity

หลักการ

เซลล์ตายหรือเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะปล่อย LDH ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยปฏิกิริยา coupled enzymatic reaction โดย tetrazolium salt จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นผลผลิต formazan salt ซึ่งมีสีแดง (ดังรูปที่ 3.4) จำนวนเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย จะส่งผลให้มีปริมาณของ LDH สูงขึ้น และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลผลิต formazan ที่เกิดขึ้น สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader

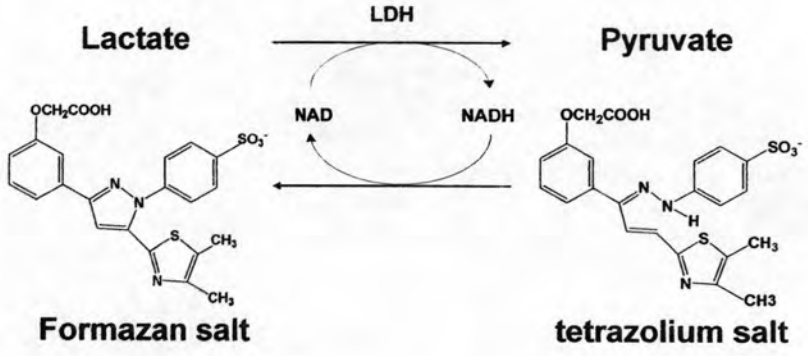
การทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง H9 และ Jurkat จำนวน 5 x 10^3 เซลล์ต่อ 100 µl ต่อหลุม ในสภาวะต่างๆ ดังนี้ 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.1–100 µg/ml 3) ยา Paclitaxel 30 nM และ Camptothecin 145 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24

ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาตรวจสอบโดยใช้ cytotoxicity detection kit (Roche, เยอรมัน) เติม Reaction mixture 100 µl ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-25 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Stop solution 50 µl ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้ 96-well plate reader จากนั้นคำนวณ %cytotoxicity โดย

$$\%\text{cytotoxicity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}}{\text{Absorbance}_{\text{high control}} - \text{Absorbance}_{\text{low control}}} \times 100$$

โดย low control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ
high control หมายถึง เซลล์ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบและถูกทำลายด้วย lysis buffer



รูปที่ 3.4 กระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ทำให้ tetrazolium salt เปลี่ยนเป็น formazan salt

3.7.1.2 การตรวจวัด Cell viability ด้วย Trypan blue dye exclusion method

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (H9 และ Jurkat) จำนวน 2.5×10^4 เซลล์ต่อ 1 ml ต่อหลอด ในสภาวะต่างๆ กัน ดังนี้ 1) 0.5% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 20 µg/ml 3) ยา Paclitaxel 30 nM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ (negative control)นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มี

ชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิตโดยใช้ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ที่กำลังขยาย 400 เท่าและคำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cytotoxicity)

$$\text{ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (\%cytotoxicity)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

นอกจากนี้ยังทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ภายหลังการทดสอบในสภาวะต่างๆ ด้วย และคำนวณจำนวนเซลล์เช่นเดียวกับการคำนวณในข้อ 3.5

3.7.2 การศึกษาผลกระทบของพิเพอรีนต่อการเจริญของเซลล์ในระยะต่างๆ (Cell cycle analysis)

หลักการ

Propidium iodide (PI) เป็นสารเรืองแสงชนิดหนึ่ง สามารถย้อมติดดีเอ็นเอได้ จึงทำการตรวจวัดระดับการเรืองแสง ทำให้ทราบปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะได้ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer

การทดลอง

จากรายงานการวิจัยที่ทำการทดสอบเพื่อศึกษา Cell cycle analysis พบว่ามีการศึกษาทั้งใน nonsynchronized และ synchronized cells ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในเซลล์ทั้ง 2 แบบ ในการเตรียม nonsynchronized cells ทำได้โดยการเพาะเลี้ยง Jurkat ในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (fresh media) 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดสอบ เช่นเดียวกับการทดสอบที่ผ่านมา ส่วน synchronized cells เตรียมโดยการไม่ให้สารอาหารแก่เซลล์ โดยการทำ serum starvation เป็นเวลา 24 ชั่งโมงก่อนทำการทดสอบ (75) ทั้งนี้ในการเตรียม synchronized cells สามารถทำได้หลายวิธี โดยเป็นการ synchronize ให้ได้เซลล์ในระยะต่างๆ กัน เช่น การใช้ยา สารเคมี รวมถึง serum starvation (76-78) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการ synchronized เซลล์ ผลการทดสอบไม่พบข้อแตกต่างระหว่างการใช้ nonsynchronized และ synchronized cells แต่อย่างใด อีกทั้งยังมีรายงานกล่าวถึงการทดสอบโดยใช้ synchronized cells อาจให้ผลไม่ใกล้เคียงกับการเจริญของเซลล์ตามปกติ ในการทดสอบนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ nonsynchronized cells เช่นเดียวกับการทดสอบอื่นๆ ข้างต้น

ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ต่อหลุม ในสภาวะที่มี 0.5% DMSO พิเพอรีนความเข้มข้น 20-100 µg/ml ยา Camptothecin 145 nM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ไปปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant แล้วปั่นล้างด้วย PBS จากนั้นเติม 35% ethanol 1 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ย้อมด้วย 50 µg/ml propidium iodide/ 100 µg/ml RNase A solution จำนวน 500 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์ในแต่ละระยะด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) (79)

3.7.3 การศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนต่อการเกิด Apoptosis

3.7.3.1 ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology) ผ่าน Fluorescent Microscope

เพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ต่อหลุม ในสภาวะที่มี 0.2% DMSO พิเพอรีนความเข้มข้น 40 µg/ml ยา Camptothecin 2 และ 10 uM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วน supernatant ปั่นล้างเซลล์ด้วย cold PBS และ resuspend ด้วย cold PBS 25 µl จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Acridine orange / Ethidium bromide (ความเข้มข้น 100 µg/ml) 2 µl และประเมินสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) กำลังขยาย 400X โดย Live cells หรือเซลล์ที่มีชีวิตจะพบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและย้อมติดสีเขียว Apoptotic cells จะพบนิวเคลียสหดเป็นก้อนหรือเห็นเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอภายใน ย้อมติดสีเขียวหรือส้ม และ Necrotic cells จะพบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเซลล์ที่มีชีวิต แต่ย้อมติดสีส้ม (69)

3.7.3.2 ตรวจสอบ DNA fragmentation โดย Gel electrophoresis

หลักการ

การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบการตายที่มีการแตกหักของดีเอ็นเอร่วมด้วย สามารถตรวจวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอได้โดยการสกัดดีเอ็นเอ และนำไปตรวจวัดชิ้นส่วนบนแผ่นวุ้นอะกาโรสด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส

การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 3 x 10^6 เซลล์ต่อ15 ml ในสภาวะที่มี 1) 0.2% DMSO 2) พิเพอรีนความเข้มข้น 40 µg/ml 3) ยา Camptothecin 2 และ 10 µM (positive control) และ 4) ในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Flexigene DNA kit (บริษัท QIAGEN GmbH, เยอรมัน) โดยการปั่นตกตะกอนเซลล์ นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติม Buffer FG1 100 µl ลงไปแล้วผสมโดยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม Buffer FG2 /QIAGEN Protease 100 µl ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 3 ครั้ง นำไปบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heat block) ที่ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม 100% isopropanol 200 µl แล้วผสมโดยการกลับหลอดไปมา จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitate) นำไปปั่นที่ 10,000x g เป็นเวลา 3 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งไป แล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษชทิชชู เติม 70% Ethanol 200 µl และผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสม 5 วินาที นำไปปั่นที่ 10,000x g เป็นเวลา 3 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งแล้วคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูนานอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นปั่นแห้งอย่างน้อย 5 นาที เติม Buffer FG3 30 µl ผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสมที่ความเร็วต่ำ 5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมน้ำกลั่น 70 µl ลงในดีเอ็นเอที่สกัดได้ เติม Sodium acetate ความเข้มข้น 3 mol/l จำนวน 10 µl และ 100% Ethanol 220 µl ผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่น 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งแล้วปั่นล้างด้วย 70% Ethanol จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง นำไปปั่นแห้งแล้วเติมน้ำกลั่น 20 µl

บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้และทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรสต่อไป

การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm (OD_{260}) จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD_{260} x dilution factor x 50 (80)

คำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากัน เพื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส

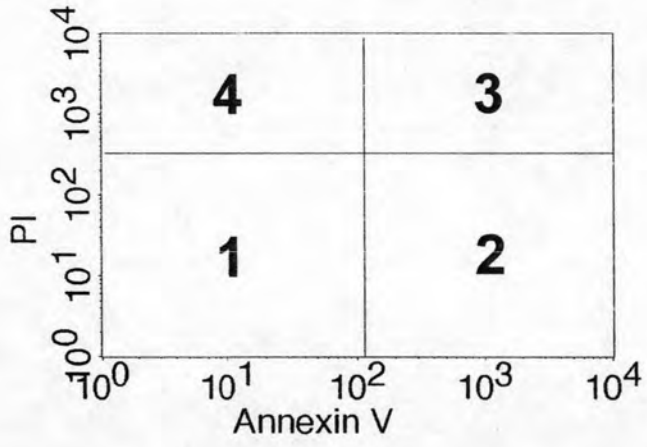
การทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส (Agarose Gel Electrophoresis)

เตรียม 1% agarose ใน 0.5X TBE buffer โดยการชั่ง agarose จำนวน 1 g เติม 0.5X TBE buffer ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วละลายโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 5 นาที จึงเท 1% agarose ลงในถาดเทเจล วางซี่หวี (comb) และปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เทบัฟเฟอร์ลงไปเล็กน้อย ค่อยๆ ดึงซี่หวีออก เติมบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่นเจล โดยให้สูงเหนือแผ่นเจลประมาณ 1-2 cm ผสมดีเอ็นเอที่สกัดไว้กับสีย้อม (loading dye) ให้เข้ากัน หยอดลงในหลุมของแผ่นวุ้นอะกาโรสที่เตรียมไว้ โดยเว้นหลุมแรกสำหรับหยอดดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) จากนั้นให้กระแสไฟขนาด 90 โวลต์เข้าในเครื่องเป็นเวลา 50 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนย้ายไปยังขั้วแอโนดตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อครบเวลา ย้อมดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย Ethidium Bromide เป็นเวลา 20 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเจลที่ผ่านการย้อมแล้วไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องตรวจสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Documentation System)

3.7.3.3 **ตรวจสอบปริมาณ** Phosphatidylserine (PS) **บนผิวเซลล์โดยเครื่อง** Flow cytometer

หลักการ

การตรวจสอบเซลล์ที่ membrane ถูกทำลายสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Annexin V assay เมื่อเซลล์เริ่มเกิด Apoptosis จะส่งผลให้ PS ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์เคลื่อนที่ไปยังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ Annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับประจุลบของ PS ได้ดี (high affinity) จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้ เมื่อเชื่อม annexin V กับสารเรืองแสง (fluorescein) เช่น FITC ร่วมกับการใช้ PI ซึ่งสามารถย้อมติดดีเอ็นเอ จะช่วยในการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิสโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ได้ โดยเซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 1 (Annexin $V^{neg} - PI^{neg}$) หมายถึงเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 2 (Annexin $V^{pos} - PI^{neg}$) หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะ Early Apoptosis เซลล์ที่อยู่ในช่องที่ 3 (Annexin $V^{pos} - PI^{pos}$) หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะ Late Apoptosis และเซลล์ที่ตายแล้ว (ดังรูปที่ 3.5) (81-83)



รูปที่ 3.5 แสดงบริเวณเซลล์ในแต่ละระยะ

ทำการเพาะเลี้ยง Jurkat จำนวน 2.5×10^5 เซลล์ต่อ 5 ml ในสภาวะที่มี 0.5% DMSO พิเพอรีนความเข้มข้น 20 - 100 µg/ml ยา Camptothecin 145 nM (positive control) และในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (negative control) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C

เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการย้อมเซลล์ด้วยน้ำยา Annexin V staining (BD Biosciences, สหรัฐอเมริกา) โดยปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที ปั่นล้างด้วย cold PBS 2 ครั้ง แล้ว resuspend ด้วย 1x binding buffer 100 µl จากนั้นเติม Annexin V-FITC 5 µl และ propidium iodide 5 µl ค่อยๆ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด เติม 1x binding buffer 400 µl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา) คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์ในแต่ละระยะด้วยโปรแกรม CellQuest (BD Bioscience, สหรัฐอเมริกา)

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าที่ได้จากการทดสอบจะนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) จากการทดสอบซ้ำ (Tripicate) และทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยสามครั้งในแต่ละการทดลอง การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of varience, ANOVA) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบหลายๆ กลุ่ม และ Post Hoc test ของ Dunnett โดยค่า $p\text{-value} < 0.05$ จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และใช้โปรแกรม Statistical for the Social Sciences (SPSS) สำหรับ WINDOWS software , version 11.5 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA)