

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี (Chemicals)

RPMI 1640 medium, Antibiotic/Antimycotic (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA จากบริษัท Gibco (USA), PGE₂ assay kit และ TNF- α assay kit จาก Cayman chemical, Lipopolysaccharide (LPS), Dimethyl sulfoxide (DMSO), TRIZOL[®] Reagent, iNOS, COX-2 และ GAPDH oligonucleotide primers จากบริษัท Sigma-Aldrich. ประเทศเยอรมันนี, MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide จากบริษัท Eugene (USA)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)

เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator), เครื่องระเหยแห้ง (Freeze dry), เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge), ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator), Autoclave, Laminar air flow carbinet, Silicagel GF254 precoated plate, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA), Gel casting platform, Horizontal gel electrophoresis apparatus, Thermal cycler, UV spectrophotometer และ UV transilluminator

3.2. วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

โครงการวิจัยนี้แบ่งการดำเนินการออกเป็นกิจกรรมต่างๆ ดังนี้

3.2.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรใบรางจืด

1. เก็บใบรางจืดสดจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและบริเวณคณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ โดยเปรียบเทียบกับรางจืดที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Herbarium No. 282

2. นำใบรางจืดสดมาล้างน้ำทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตรแล้วเติม 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:4 (หรืออัตราส่วนระหว่างใบรางจืด 10 กรัม ต่อ 95% ethanol จำนวน 40 มิลลิลิตร) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วันจากนั้นกรองเอากากใบรางจืดทิ้งไป คงเหลือไว้เฉพาะส่วนใสแล้วทำการกรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1)

3. นำกากใบรางจืดที่กรองได้ ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 เป็นจำนวน 3 ครั้ง จนกระทั่งกากใบรางจืดที่ได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

4. รวบรวมสารละลายที่สกัดได้จากใบรางจืดมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จนกระทั่งได้สารสกัดใบรางจืดที่มีความเข้มข้นสูง

5. นำสารสกัดใบรางจืดที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry เพื่อระเหยเอาน้ำออกไป แล้วจึงนำสารสกัดจากใบรางจืดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก บรรจุในภาชนะปิดสนิทและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ในการสกัดใบรางจืดจะทำการสกัดไว้เป็นปริมาณที่มากพอที่จะใช้จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

3.2.2 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการอักเสบในสัตว์ทดลอง

(Animal models)

3.2.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ หนูถีบจักร (mice) สายพันธุ์ ICR เพศผู้มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 30-40 กรัม ชื้อมาจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำหนูที่จะทำการทดลองมาพักเพื่อให้หนูได้คลายความเครียด (stress) จากการขนส่ง และเป็นการเตรียมสัตว์ให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในห้องทดลองก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจะควบคุมให้อยู่ระหว่าง 25±2 องศาเซลเซียส ระดับความชื้น 70% ควบคุมไฟเปิดปิดทุก 12 ชั่วโมง เปิดจาก 06.00 น. ถึง 18.00 น. และติดตั้งพัดลมดูดอากาศเข้าและออกเพื่อถ่ายเทอากาศ ส่วนกรงที่ใช้เลี้ยงหนูทดลองนั้นจะปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคแล้ว เพื่อใช้ดูดซับสิ่งปฏิกูล ที่กรงจะมีช่องสำหรับให้น้ำและอาหารแก่หนูทดลองได้ดื่มและกินตลอดเวลา

3.2.2.2 Writhing test (ปณต ตั้งสุจิตและคณะ, 2549; Panthong et al., 2007)

1. เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยแบ่งหนูเพศผู้ (male mice) น้ำหนักระหว่าง 30-40 กรัม ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว จากนั้นทำการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) แก่หนูกลุ่มทดสอบส่วนหนูกลุ่ม positive control ได้รับการฉีดยาแอสไพรินขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) ที่ละลายใน 1% MC และกลุ่ม negative control ฉีดเฉพาะ 1% MC (s.c.) หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง เหนียวนำให้หนูเกิด writhing response (อาการเจ็บปวดภายในช่องท้องซึ่งแสดงออกโดยการเกร็งของกล้ามเนื้อบริเวณหน้าท้องโดยจะสังเกตอาการที่หนูมีการบิดตัว เอาท้องถูแนบไปกับพื้นและเหยียดขาหลังออก) ด้วยการฉีด 0.75% acetic acid aqueous solution ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อ 10 กรัม น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal)

2. นำหนูใส่กล่องพลาสติกโปร่งใสโดยจะเริ่มนับจำนวน writhing response ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 15 นาที โดยจะเริ่มจากนาทีที่ 5 หลังจากฉีด acetic acid นำจำนวน writhing response มาคำนวณ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{จำนวนครั้งที่เกิด writhing ของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{จำนวนครั้งที่เกิด writhing ของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเกิด writhing response ของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.3 Formalin test (Tjolsen et al., 1992; Panthong et al., 2007)

1. เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว โดย formalin test จะแบ่งออกเป็น 2 phases คือ early phase (neurogenic phase) และ late phase (inflammatory phase) หลังจากนั้นทำการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) และกลุ่ม positive control ฉีดยาแอสไพรินขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) และกลุ่ม negative control ได้รับการฉีด 1% MC (s.c.) หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ฉีด formalin เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (1% formalin in NSS) เข้าทางขาหลังด้านขวา

2. นับจำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูระหว่างช่วงเวลาที่ 0-5 นาที (สำหรับ early phase) และระหว่างช่วงเวลาที่ 20-30 นาที (สำหรับ late phase) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{จำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{จำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งในการเลียเท้าของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.4 Croton oil-induced ear edema in mice (Gomig et al., 2008)

อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู ในกลุ่มควบคุมจะทา vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาสารสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ที่หูด้านนอก หลังจากนั้น 6 ชั่วโมงทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้ digital vernia caliper จากนั้นเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

1. แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว อาการบวมในหนูถีบจักรถูกเหนี่ยวนำขึ้นด้วยสาร croton oil (0.1 mg/ear) โดยการทา croton oil ที่บริเวณใบหูด้านในของหนู สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาสารสกัดจากใบรางจืดในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 0.1, 0.3 และ 0.5 mg/ear ที่หูด้านนอก และกลุ่ม positive control ทายา indomethacin (0.1 mg/ear) และกลุ่ม negative control จะทา vehicle คือ DMSO ที่บริเวณใบหูด้านนอก

2. หลังจากนั้น 6 ชั่วโมงทำการวัดความหนาของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นโดยใช้เครื่อง digital vernia caliper จากนั้นทำการเปรียบเทียบความหนาของหูที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอาการหูด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(\text{ความหนาใบหูของหนูกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ})}{\text{ความหนาใบหูของหนูกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

(Percentage of inhibition)

3. ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาของใบหูของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.2.5 Cotton pellet-induced granuloma in mice (Modified from Panthong et al., 2007)

1. เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยแบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว จากนั้นสลบหนูด้วย ether และผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 0.5 เซนติเมตร ใส่เข้าไปในใต้ผิวหนังของหนู (subcutaneous) จำนวน 1 ก้อน น้ำหนัก 10 ± 1 มิลลิกรัม โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้นกลุ่มทดลองจะได้รับการฉีดสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 200, 400 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ละลายใน 1% Methyl cellulose (MC) เข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) กลุ่ม positive control ได้รับยา prednisolone ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (s.c.) ส่วนหนูกลุ่ม negative control ได้รับการฉีด 1% MC (s.c.) โดยฉีดทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสลบหนูด้วย ether

2. หลังจากครบ 7 วัน ทำการสลบหนูด้วย ether แล้วผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อที่จะดูน้ำหนักแห้ง การที่น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบและใช้ในการคำนวณต่อไป เนื่องจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell) เข้ามาสะสมบริเวณที่มีการผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าไปดังนั้นจึงทำให้น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบ

3. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักก้อนสำลีของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบรางจืดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay (Jantaratnotai et al., 2006)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3 วัน

2. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ

1×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุม จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C

3. หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดใบรางจืดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืดแล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นเตรียมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5% v/v จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที

5. เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) จากนั้นเติม 100% DMSO ปริมาณ 200 $\mu\text{l/well}$ เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA)

6. คำนวณค่า cell viability ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (0.5% DMSO treated control) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) มีค่า cell viability เท่ากับ 100% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Kim et al., 2003)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

2. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 5% และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงให้ได้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง NO จากเอนไซม์ iNOS จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะใช้สาร L-NAME ความเข้มข้น 20 μM เป็น positive control

4. ตรวจวัด NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาผสมกับ Griess reagent (2% sulfanilamide in 4% phosphoric acid และ 0.2% naphthylethylenediamide) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA)

5. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) โดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle มีปริมาณ nitrite เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างสาร prostaglandin E_2 (PGE_2) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Kim et al., 2003)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

2. เตรียมเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้างสาร PGE_2 จาก COX-2 จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5%

CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะใช้สาร NS-398 ความเข้มข้น 10 μ M เป็น positive control

4. ตู้อาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 50 mM arachidonic acid จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ 5% และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

5. ตรวจวัดปริมาณสาร PGE₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ PGE₂ assay kit

6. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ PGE₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) เพียงอย่างเดียวโดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้ vehicle-treated มีปริมาณ PGE₂ เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.6. ศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการยับยั้งการสร้างสาร tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) (Hwang et al., 2011)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin และ 25 μ g/ml amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

2. เตรียมเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C

3. เตรียมสารละลายสารสกัดใบรางจืด โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml และ 25 μ g/ml ตามลำดับ) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้างสาร TNF- α จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ตรวจวัดปริมาณสาร TNF- α ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ TNF- α assay kit

5. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α ในอาหารเลี้ยงเซลล์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) เพียงอย่างเดียวโดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้ vehicle-treated มีปริมาณ TNF- α เป็น 100% และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.2.7 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ TNF- α ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.2.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์และกระตุ้นการสร้าง iNOS, COX-2 และ TNF- α ด้วย LPS

1. นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 3 cm ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin และ 25 μ g/ml amphotericin B เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator ที่มี CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α ของสารสกัดใบรางจืด โดยซึ้่นำนักสารสกัดใบรางจืด แล้วนำมาละลายด้วย DMSO จากนั้นนำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กัน (6.25, 12.5 และ 25 μ g/ml ตามลำดับ) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 0.5% โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นเก็บรวบรวมเซลล์ภายใน 3 cm disc ด้วย TRIZOL[®] Reagent ปริมาณ 1 ml แล้วนำไปสกัด total RNA ในขั้นต่อไป

3.2.7.2 การสกัด total RNA

1. สกัด total RNA ด้วย TRIZOL[®] Reagent จำนวน 1 ml และเติม chloroform จำนวน 200 μ l หลังจากนั้น vortex เป็นเวลา 15 วินาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °C เป็นเวลา 2-3 นาทีและนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (12,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 15 นาที

2. ปิเปิดส่วนที่เป็น aqueous phase จำนวน 400 μ l ใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ หลังจากนั้นตกตะกอนด้วย isopropyl alcohol จำนวน 500 μ l และทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 15-30 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (12,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 10 นาที

3. ปิเปิดเอาส่วนใส (supernatant) ออกไปและล้าง RNA pellet ด้วย 75% ethanol จำนวน 1 ml จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (7,500 rpm) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำ RNA pellet ให้แห้ง จึงเติม deionized water จำนวน 50 μ l

4. นำ total RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดย UV spectrophotometer



3.2.7.3 การสร้างสาย complementary DNA (cDNA)

1. นำส่วนประกอบต่างๆ ใส่ลงใน microcentrifuge tube ได้แก่ total RNA จำนวน 5 µg, 50 µM oligo (dT) จำนวน 1 µl, 10 mM dNTP Mix (10 mM ของ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) จำนวน 1 µl และ DNase free water จำนวน 13 µl

2. นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (2,000×g) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมส่วนประกอบต่างๆ คือ 5x First-Strand Buffer จำนวน 4 µl, 0.1 M DTT จำนวน 1 µl, RNaseOUT™ จำนวน 1 µl และ SuperScript™ III RT (200 unit/µl) จำนวน 1 µl ผสมโดยปิเปตขึ้นลงเบาๆ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30-60 นาทีและหยุดปฏิกิริยาโดยผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.2.7.4 การทำเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. นำสาย single strand cDNA ที่สร้างได้เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ สำหรับการทดลอง PCR โดยเตรียม reaction mixture สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยนำส่วนประกอบต่างๆ ใส่ลงในหลอดขนาด 200 µl sterile PCR tubes

cDNA single strand	1.0 µl
10 µM COX-2 (F)	1.5 µl
10 µM COX-2 (R)	1.5 µl
10x Taq PCR buffer	3.0 µl
2.5 µM dNTP _s mix	2.0 µl
Taq polymerase	1.0 µl
Nuclease-free distilled water	20.0 µl
Total	30.0 µl

2. นำหลอด PCR ใส่ลงใน thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้

Step 1	94 °C	30 s
Step 2	94 °C	30 s
Step 3	60 °C	30 s
Step 4	72 °C	30 s
Step 5	29× to step 2, 3 และ 4	
Step 6	72 °C	5 min

3. นำสาย cDNA ที่ได้ ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF-α และ GAPDH โดยใช้ agarose gel electrophoresis annealing temperature

3.2.7.5 การทำเทคนิค Agarose gel electrophoresis

1. เตรียมสารละลาย 2% agarose gel โดยชั่งผง agarose มา 4.8 g ใส่ลงใน 0.5x TBE buffer จำนวน 240 ml ละลายผงเจลโดยใช้ความร้อน
2. เตรียม gel tray รอโดยใส่ comb row เข้าไปให้พอดีกับแต่ละ block ของ gel tray หลังจากเนื้อ gel ละลายดีแล้วก็นำออกมาจากเครื่อง microwave แล้วเติม ethidium bromide จำนวน 5 μ l แล้วผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำมาเทลงบน gel tray ที่เตรียมไว้แล้ว
3. หลังจาก gel แข็งตัวแล้วก็ค่อยๆ ดึง comb row ออกอย่างช้าๆ ระวังอย่าให้ gel แตกหลังจากนั้น load sample ที่เตรียมไว้โดยการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2 และ TNF- α
4. หลังจากทำ load sample แล้วก็นำชิ้นส่วน gel ไปวางใน tank ซึ่งภายใน tank จะเติม 0.5x TBE buffer พอดีท่วม gel โดย tank จะต่อกับ power supply ซึ่ง set power supply ไว้ที่ 30 นาที หลังจากนั้นก็ run gel เมื่อครบเวลา 30 นาที นำแผ่น gel ไปถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อดูแถบ PCR ที่เกิดขึ้น

3.2.8. ศึกษาความสามารถในการจับ nitric oxide (NO scavenging activity) ของ สารสกัดใบรางจืด

หลักการ: NO ถูกสร้างมาจากปฏิกิริยาการสลายตัวของสาร Sodium nitroprusside ใน phosphate buffer saline ในไตรคอกโซลต์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วถูกเปลี่ยนเป็น ไนไตรท์ และไนเตรท ซึ่งไนไตรท์สามารถทำปฏิกิริยากับ Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diaminehydrochloride, 2.5 % H_3PO_4) ได้เป็นสารประกอบสีชมพู ที่คงตัว ถ้าสารสกัดที่นำมาทดสอบสามารถจับกับ NO ได้สารที่ได้ก็น่าจะมีสีชมพูจางลง และ สารประกอบสีชมพูที่ได้สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1. ศึกษาความสามารถในการจับ NO โดยผสมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้นต่างๆ กับสาร sodium nitroprusside (10 mM) เป็นเวลา 180 นาที
2. นำสารละลายไปตรวจวัดปริมาณของ NO ที่เหลืออยู่ในสารละลายโดยปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % inhibition จากนั้นนำค่าร้อยละที่ได้ไปสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด รางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's test กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ