บทที่ 2

วิธีการทดลอง

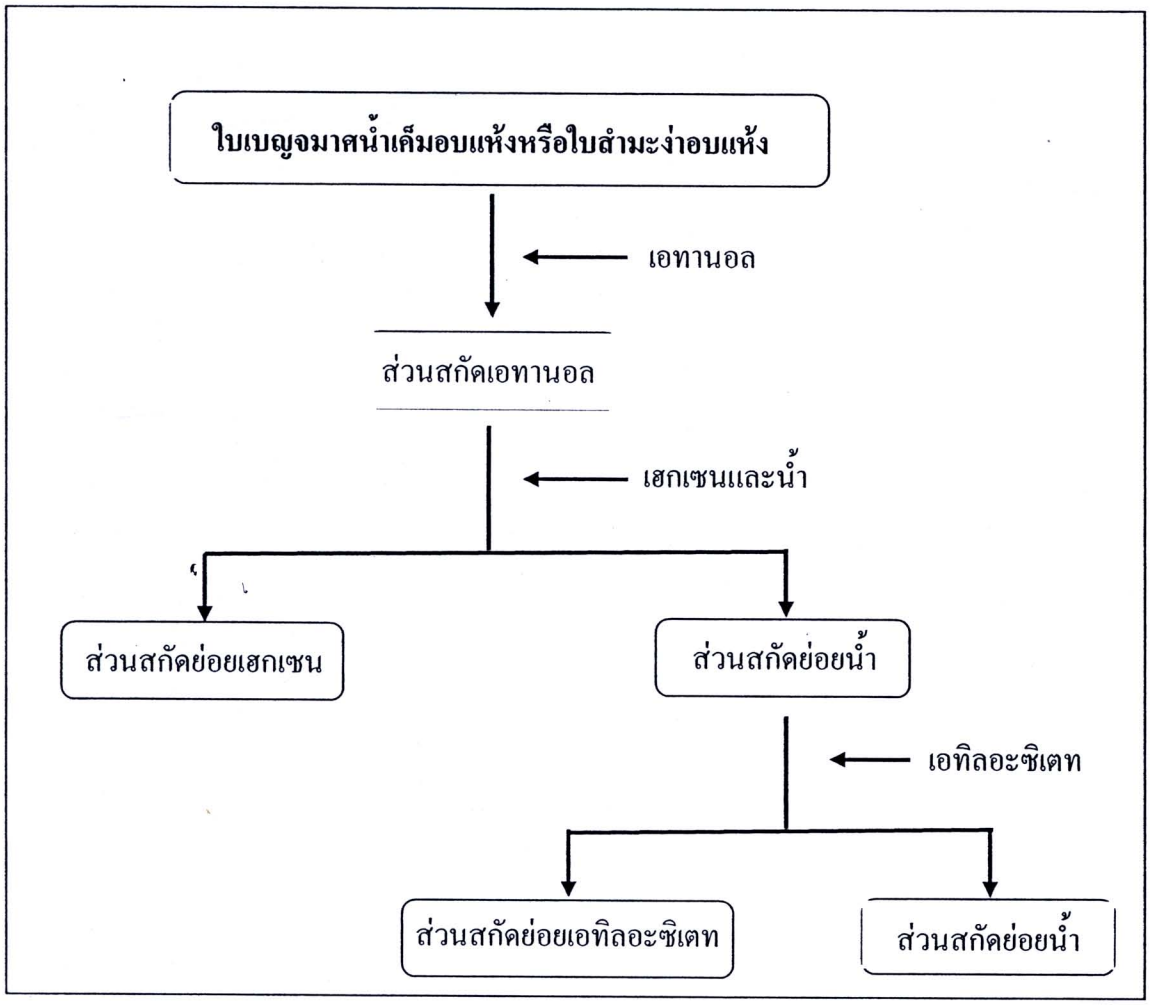
2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ใบเบญจมาศน้ำเค็ม และใบสำมะง่า จากศูนย์การเรียนรู้และการท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนลุ่มน้ำเวฬุ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (บ้านท่าสอนอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี) และระบุชนิดของพืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำใบสดมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด และอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำใบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักใบพืชหลังจากที่ปั่นได้ทั้งหมด

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำใบเบญจมาศน้ำเค็มที่บดละเอียด 435 g และใบสำมะง่า 1200 g ใส่ลงในถุงผ้า มัดปากถุงให้แน่น จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 4.4 และ 12 L ตามลำดับ ในขวดแก้วเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าสารให้ผสมกันวันละ 2 ครั้ง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยใช้เครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำผงของพืชทั้งสองชนิดไปทำการสกัดด้วยเอทานอล ปริมาตร 4.4 และ 12 L ซ้ำอีก 2 ครั้ง และทำการรวมส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมด ก่อนที่จะนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ และเก็บไม่ให้โดนแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ทำการสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอลของพืช โดยนำส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็มมา 83 g และใบสำมะง่ามา 195 g ละลายด้วยเอทานอล 800 และ 2000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการแบ่งสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลมา 400 mL ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 1000 mL ตามแผนผังการสกัด (รูปที่ 2-1) เติมน้ำ 100 mL และเติมเฮกเซน 400 mL แยกส่วนที่เป็นชั้นเฮกเซนออก (ชั้นบน) นำส่วนที่เป็นชั้นน้ำมาสกัดด้วยเฮกเซน 400 mL อีกครั้ง นำชั้นเฮกเซนที่ได้มารวมกัน จากนั้นนำส่วนชั้นน้ำสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท 2 ครั้งๆละ 400 mL นำชั้นเอทิลอะซิเตทที่ได้รวมกัน เก็บชั้นน้ำ และนำแต่ละชั้นที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ให้โดยแสง เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป



รูปที่ 2-1 แผนผังการสกัดแยกส่วนของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบสำมะง่าโดยสรุป

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO_2 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะ ทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

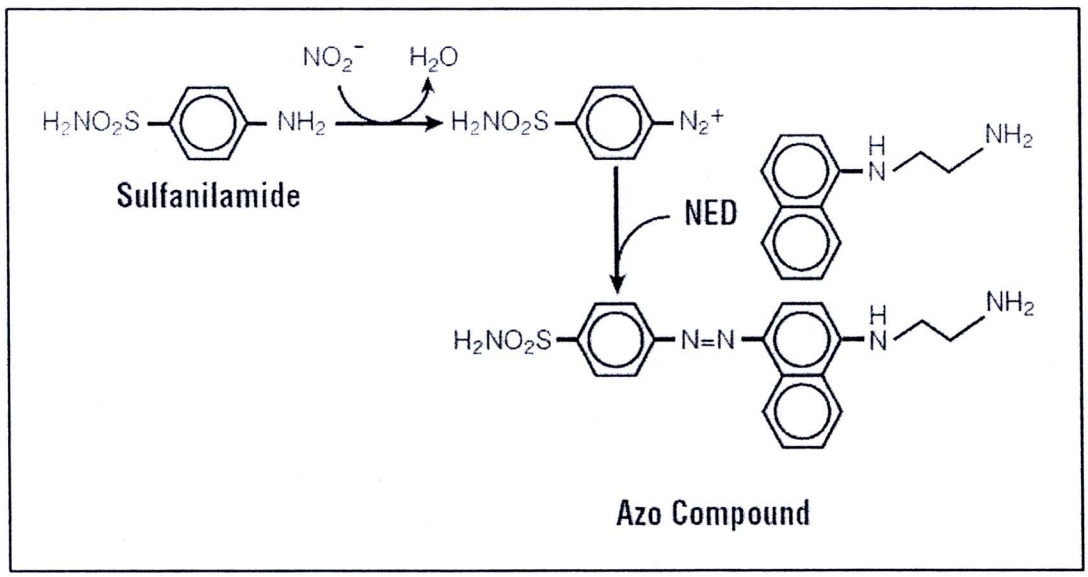
2.4 การ subculture โดยวิธี scraping

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมบัฟเฟอร์ HBSS [5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4, 136 mM NaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4, 5.6 mM Glucose, 4 mM $NaHCO_3$] ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ใช้ cell scraper ขูดเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) FBS-DMEM ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue และ

นับเซลล์บนเครื่อง hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วแบ่งเซลล์ลงในภาชนะอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนไตรท์เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrocholide (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร (รูปที่ 2-2) ดังนั้นปริมาณไนไตรท์จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS ทำการทดลองโดยการแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$ เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 µL ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrocholide และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM



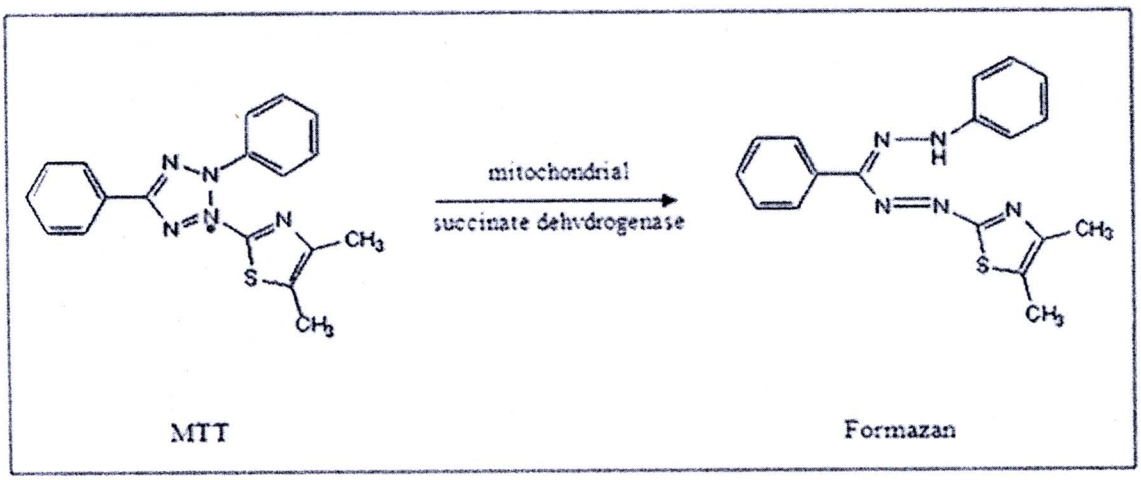
รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยา Griess

(ที่มา : www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf)

2.6 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) จำนวน 10 µL แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จำนวน 500 µL และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่ง MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง (รูปที่ 2-3) ปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์ตรงกับจำนวนเซลล์

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$



รูปที่ 2-3 ปฏิกิริยาการรีดักชันของ MTT

(ที่มา : www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=91)

2.7 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. ($1x10^6$ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการขูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมีวิธีดังนี้ เติมคลอโรฟอร์มจำนวน 0.2 mL

และผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพา-นอลจำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดบรรจุ RNA เข้าเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อระเหย เอทานอล ก่อนเติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ RNA ละลายได้ดีขึ้น ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A_{260} เท่ากับ 40 µg/mL ของ RNA

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

ปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย RNA จำนวน 2 µg, 3U AMV reverse transcriptase, 5X buffer [250 Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 50mM $MgCl_2$, 2.5mM spermidine และ 50mM DTT], 0.083 mM oligo $(dT)_{15}$ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 µL สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้SYBR Green และไพรเมอร์จำเพาะ iNOS และ elongation factor-2 (EF-2) ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิต และเลข Accession ในการทำปฏิกิริยา Real time RT-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดของผลผลิต (bp)	เลข Accession
iNOS	5' GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC 3'	156	NM_010927.2
	5' AGCCAGCATACCGGATGAGC 3'		
EF-2	5'CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA 3'	155	NM_007907.2
	5'GGGTCAGATTTCTTGATGGGGATG 3'		

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X Prime Q-Master Mix with SYBR Green I จำนวน 10 µL, 10 µM Forward primer จำนวน 0.4 µL, 10 µM Reverse primer จำนวน 0.4 µL, cDNA จำนวน 1 µL และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 25 µL ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 95 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 °C นาน 30 วินาที, 60 °C นาน 30 วินาที, 72

°C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ในเครื่อง real-time PCR และวิเคราะห์หาค่า cycle of threshold (C_T) ของแต่ละปฏิกิริยา (Giulietti et al., 2001) จากนั้นนำมาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับยีน iNOS และ EF-2 จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน iNOS และ EF-2 ซึ่งแสดงผลในรูปของอัตราส่วนของ copy number ของ iNOS ต่อ EF-2

2.9 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm.($1x10^6$ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของใบเบญจมาศน้ำเค็มและใบสำมะง่าที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 1 ครั้ง ก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 และ protease inhibitors] ที่เย็น จำนวน 150 µL และใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g นาน 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic acid (BCA)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารตัวอย่างด้วยวิธี BCA ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Pierce) โดยนำสารตัวอย่าง 2 µL และน้ำกลั่น 8 µL ผสมกับสารละลาย working BCA (อัตราส่วนของสารละลาย A:B เท่ากับ 50:1) จำนวน 200 µL แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จะได้สารเชิงซ้อนสีม่วงที่เสถียรและละลายน้ำได้ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ปริมาณ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 µg โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และแกน x เป็นค่าปริมาณของโปรตีน

2.11 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

เตรียม SDS-polyacrylamide gel ที่มี separating gel 10% และ stacking gel 4% จากนั้นหยอดโปรตีนลงในปริมาณเท่ากันหลุมละ 60 µg ลงในเจลและผ่านกระแสไฟฟ้าใน (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) SDS] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้ายแถบโปรตีนลงบนแผ่น PVDF ใน transfer buffer [(192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) methanol] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 25 โวลต์ และที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน ก่อนทำการบ่ม membrane ด้วยสารละลาย blocking [5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) nonfat dry milk ในบัฟเฟอร์ TBS-T] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] นาน 5 นาที จำนวน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 27 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 245667
เลขเรียกหนังสือ

3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย mouse anti-iNOS antibody (1:500) ที่ละลายในตัวทำละลาย [1X PBS, 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BSA, 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน ข้ามคืน หรือสารละลาย mouse anti ß-actin (1:5,000) ที่ละลายในสารละลาย blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แช่ในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับ iNOS, และ 1:10,000 สำหรับ ß-actin ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุล ของ iNOS และ ß-actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.12 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส

NF-KB เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึง ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB/p65 ใน nuclear extract โดยวิธี Western blot analysis และ เปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ กับสภาวะที่เติมสารสกัด วิธีแยกโปรตีนจาก nuclear extract อธิบายไว้ใน Srisook และคณะ (2011)

2.13 การวิเคราะห์ปริมาณโพรสตาแกลดิน E2 โดยปฏิกิริยา Griess

แบ่งเซลล์แมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$ เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วน สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ เวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 µL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่า จะทำการวิเคราะห์ปริมาณโพรสตาแกลดิน E2 ที่ถูกผลิตในแมคโครฟาจ และหลั่งออกจากเซลล์มาสะสม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์ทำโดยใช้ ELISA kit (R&D system, USA.) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองที่อิสระ ต่อกัน ทำ 3 ซ้ำ สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจาก ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student's t test สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็น อิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0