บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การเก็บและการเตรียมสารตัวอย่าง

นำส่วนรากของลำบิดดงและท้าวแสนปม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก บรรจุใส่ถุงผ้าที่สะอาด มัดให้แน่น หลังจากนั้นนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนเป็นเวลา 7 วัน ในถังสแตนเลสที่มีฝาปิด แล้วไขตัวทำละลายออกมา เพื่อนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ทำการสกัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำ crude extracts ที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกันทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ส่วนใบทำเช่นเดียวกับราก

การแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์เอกลักษณ์

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีและทำการตกผลึกได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดง (*Diospyros filipendula*) ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดและ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปม *(Diospyros cauliflora)* ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด นำสารบริสุทธิที่ได้ทั้งหมดมาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีกับสารอ้างอิง พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol

การเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้แก่ มะเร็งปากมดลูก (human cervical carcinoma, HeLa) การเลี้ยงเซลล์ ทำการเตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^{5} cells/ml ด้วย RPMI 1640 ใน culture flask ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1×10^{6} cells/ml ตรวจดูเปอร์เซ็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวผ่านทางกล้อง stereoscope ถ้าพบว่ามีเซลล์ที่เกาะพื้นมากกว่า 80 % ของพื้นที่ทั้งหมด แสดงว่าสามารถทำการ subculture ได้

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

เตรียมเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2×10^4 cells/ml ลงใน 96 well plate บ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 24 ชม. เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์มีชีวิตสามารถลงเกาะที่พื้นผิวภาชนะได้ จากนั้นเริ่มบ่มเซลล์กับสารสกัด โดยหลุมที่เป็น vehicle control บ่มด้วย DMSO (0.5%) หลุมที่ทดสอบความเป็นพิษบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0–250 µg/ml นาน 48 ชม. ส่วน positive control นั้นทำการทดสอบด้วย doxorubicin ที่ความเข้มข้น 0-10 µg/ml นาน 48 ชม. แล้ววิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT

การวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT โดยมีหลักการคือภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกระบวนเมทาบอลิซึมในไมโตคอนเดรีย โมเลกุล MTT มีเป้าหมายอยู่ที่ไมโตคอนเดรีย และเนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุล MTT เป็น tetrazolium rings ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ succinate dehydrogenase ได้เป็นผลึก formazan สีม่วงและไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำสารละลาย MTT (5g/L) ปริมาตร 30 µl ลงใน well ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 นาน 4 ชม. แล้วละลายผลึก formazan ด้วย DMSO (99.99%) ปริมาตร 100 µl แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\ Cell\ viability = \frac{Absorbance\ at\ 540\ nm\ of\ sample}{Absorbance\ at\ 540\ of\ control} \times 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง % cell viability (แกน y) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (แกน x) จากกราฟนี้สามารถคำนวณหา ขนาดความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50% (inhibit concentration at 50%, IC_{50})

วิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

เตรียมเซลล์ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 5 ml ลงใน flask ขนาด 25 cm^3 เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.5% DMSO, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับ นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) นำมาสกัด DNA ด้วย GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) โดยเติม proteinase K ปริมาตร

20 µl เพื่อทำลายโปรตีน จากนั้นเติม lysis enhancer ปริมาตร 2 µl แล้วทำการ vortex เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และบ่มต่อด้วย TB buffer ปริมาตร 200 µl ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกให้เหลือแต่ DNA และ RNA จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 10 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน DNA ด้วย ice-cold absolute ethanol แล้ว load ลง column ปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer แล้วนำไปปั่นที่ 5,000g นาน 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแห้งที่ 10,000g นาน 1 นาที แล้วเติม elution buffer ที่ได้ผ่านความร้อนแล้วที่ 65 °C เพื่อ elute DNA จนได้ผลผลิตสุดท้ายคือ DNA ที่บริสุทธิ์ผ่าน filter ลงมา นำไปเก็บไว้ที่ −20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การหาความเข้มข้นของ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA โดยใช้สูตร ดังนี้

ความเข้มข้นของ DNA = dilution factor × 50 ng/µl × Abs_{260}

(เมื่อค่าการดูดกลืนแสง 1 มีค่าเท่ากับ 50 ng/µl)

เมื่อได้ความเข้มข้นของ DNA แล้วนำมาปรับความเข้มข้นของทุกกลุ่มเป็น 100 ng/µl โดยเจือจางกับน้ำกลั่น เพื่อนำไป load ลงเวลของ agarose ในขั้นตอนต่อไป

Agarose gel electrophoresis

นำ 100 ng/µl DNA ปริมาตร 8 µl (800 ng) ผสมกับ 6x loading dry ที่มีส่วนผสมกับ SYBR Gold (100:1 µl) ปริมาตร 2µl เพื่อใช้ดูการเคลื่อนที่ของ DNA และป้องกันไม่ให้ DNA ฟุ้งกระจาย จากนั้น load ลง 1.5% agarose gel โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 45 นาที ซึ่งใช้ 0.1 µg/µl 1kb DNA ladder ปริมาตร 8 µl เป็น marker แล้ววิเคราะห์ผลโดยเครื่อง dark reader

ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ปริมาตร 4 ml โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slide ซึ่งแช่อยู่ใน 6 well plate แล้วบ่มเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วย 0.5%DMSO, DOX [IC_{50}] และสารสกัด [IC_{50}] ตามลำดับนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มาย้อมสี fluorescent DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) และ PI (propidium iodide)

ขั้นตอนการย้อมสี DAPI และ PI

นำเซลล์ที่เกาะบน cover slide มา fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde pH 8.3 ปริมาตร 1 ml นาน 3 นาที จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 20 µl โดยบ่มที่ 37 °C นาน 20 นาที และล้าง RNaseA ด้วย PBS จากนั้นนำไปย้อมด้วย PI [5 µg/ml] และ DAPI [5 µg/ml] ปริมาตรอย่างละ 700 µl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง จากนั้นล้างสีออกด้วย PBS

นำเซลล์บน cover slide คว่ำลงบน slide จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปส่องด้วย fluorescence microscope กำลังขยาย 100 เท่า โดย DAPI มี excitation/emission ที่ 358/461 mm และ PI มี excitation/emission ที่ 535/617 mm ทำการบันทึกภาพแบบสุ่ม 3 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 3 แบบ คือ bright field, DAPI และ PI

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนับเซลล์จำนวน 500 เซลล์ แบบสุ่ม เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่อยู่ในลักษณะต่างๆ ซึ่งลักษณะการติดสีของเซลล์แสดงดังตารางที่ 3 และทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

ตาราง 3 แสดงลักษณะการติดสี DAPI และ PI ของเซลล์ในระยะต่างๆ

	การติดสี DAPI	การติดสี PI
Viable cells	ติดสีฟ้าเนียน	ไม่ติดสีแดง
Apoptotic cells	ติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ	ไม่ติดสีแดง
Late apoptotic หรือ Necrotic cells	ติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อมๆ	ติดสีแดง

การแสดงข้อมูล

ในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง (n=3) การทดลองความเป็นพิษต่อ HeLa cells เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean ± standard error of mean (S.E.M.) การวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmention) แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ± S.E.M. ร่วมกับภาพถ่าย ส่วนการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis แสดงผลเป็นภาพถ่าย