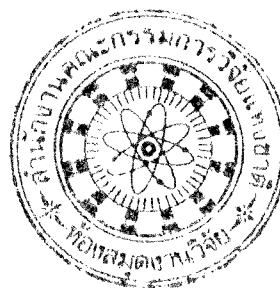


บทที่ 4

ผลการทดลอง



ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด SOM ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดความเข้มข้น 0-250 $\mu\text{g/ml}$ และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-5 $\mu\text{g/ml}$ (positive control) และ 0.66% EtOH (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้อุปกรณ์ stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

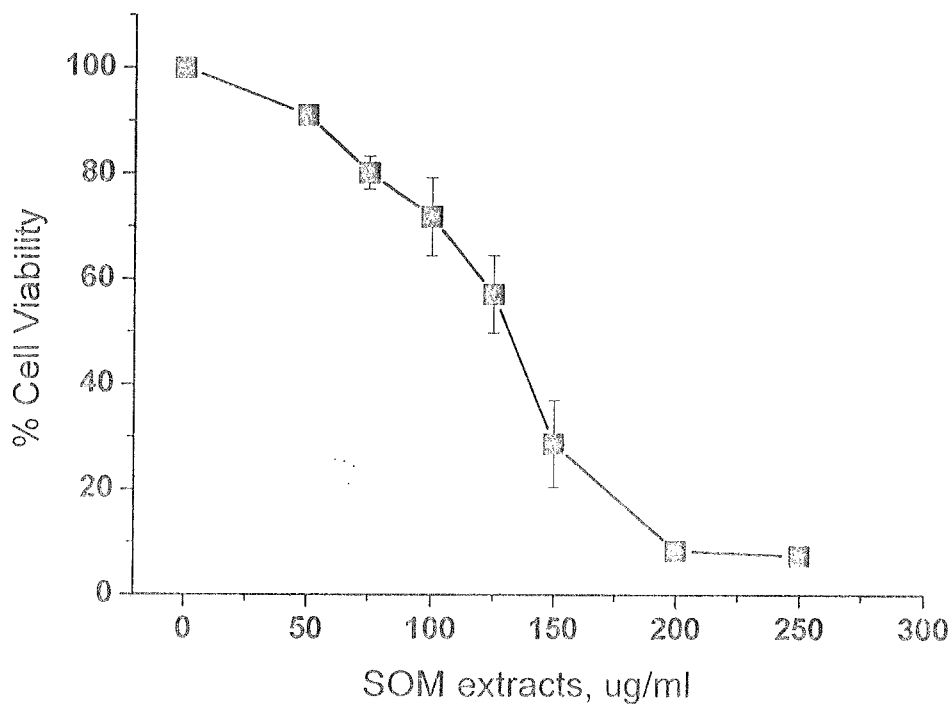
เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง stereoscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH เซลล์มีลักษณะปกติ เหยียดตัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว เมื่อนำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่ใส่ 0.66% EtOH (negative control) มีจำนวนเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วย EtOH

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบจากสาหร่ายจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM extracts) พบว่าแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัด คือเซลล์มีรูปร่างกลม ไม่เหยียด ไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย เมื่อนำไปหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT พบว่า มีจำนวนเซลล์ที่เกาะพื้นผิวจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ดูภายใต้กล้อง stereoscope สารสกัด SOM ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 20, 50 และ 80% (Inhibitory concentration at 20%: IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 76 ± 3.11 , 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 85% ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 $\mu\text{g/ml}$ (รูป 2)

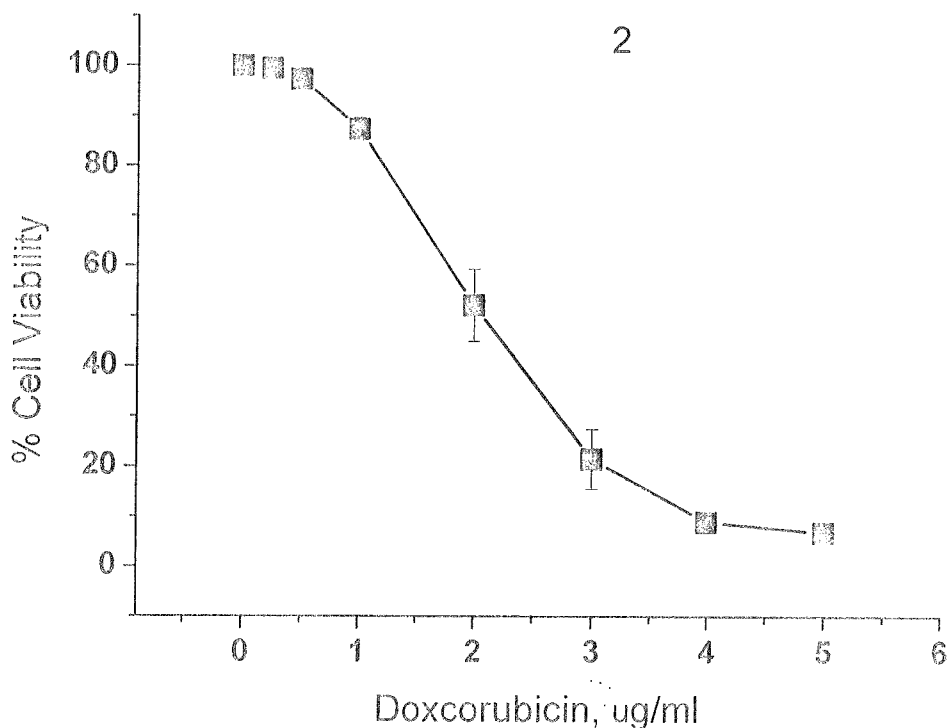
ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมไม่เหยียดออกเป็นรูปกระสวย ไซโตพลาซึมขรุขระ การเกาะพื้นผิวไม่แน่น สามารถหลุดออกจากผิวที่ยึดเกาะได้ง่ายเมื่อเขย่าเบา ๆ พบเซลล์ลอยจำนวนมาก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วย DOX มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66%

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดวิทยาศาสตร์	
วันที่.....	20 ก.พ. 2555
เลขทะเบียน.....	244084
เลขเรียกหนังสือ.....	

EtOH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง stereoscope ความเข้มข้นของ Dox ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ $2 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ และที่ความเข้มข้น $4 \mu\text{g/ml}$ การตายของเซลล์มากกว่า 85% (รูป 3)



รูป 2 กราฟแสดงผลของสารสกัด SOM ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า $MEAN \pm S.E.M.$ (N=3)



รูป 3 กราฟแสดงผลของสาร DOXORUBICIN ต่อการรอดชีวิตของ HELA CELLS ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN $\pm$ S.E.M. (N=3)

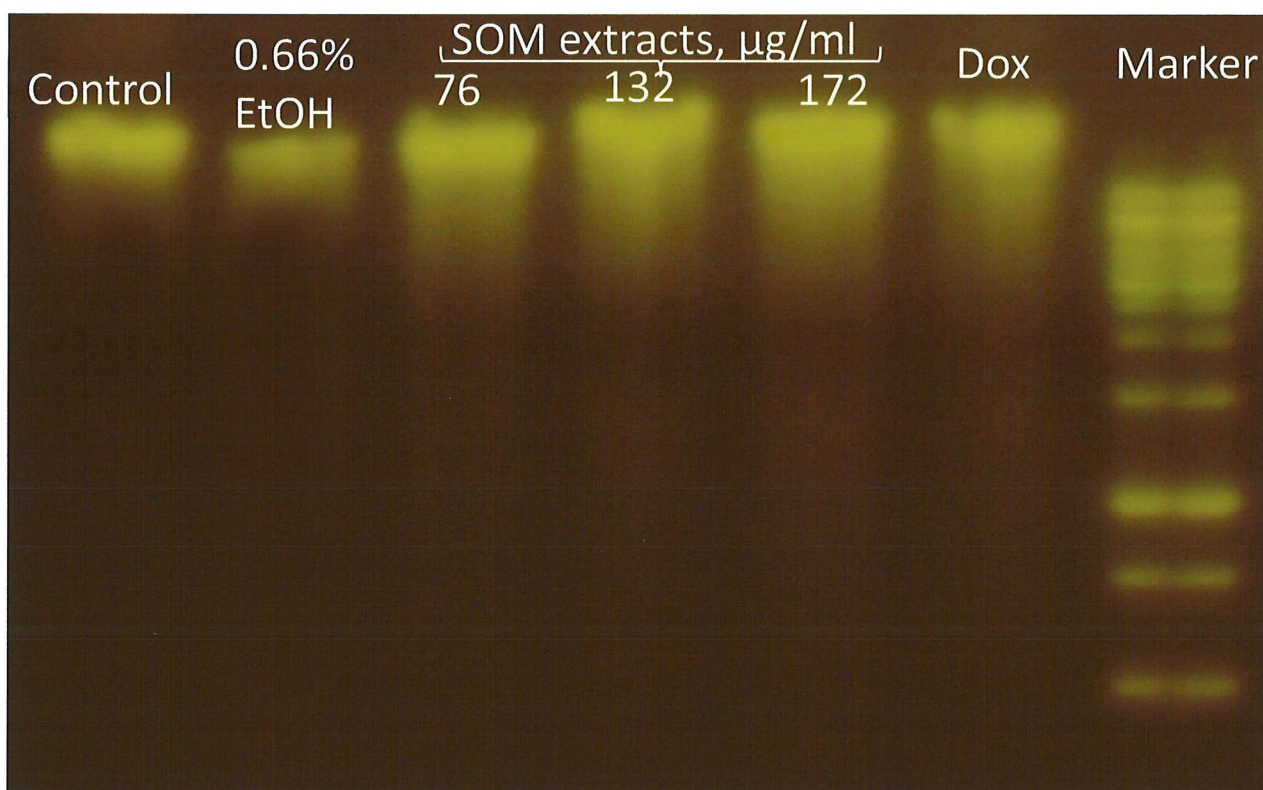
ผลการวิเคราะห์การแตกของ DNA โดย agarose gel electrophoresis

ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแตกของ DNA โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด SOM ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80} คือ 76 ± 3.11 , 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ บ่มด้วย doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 2 ± 0.35 $\mu\text{g/ml}$ และบ่มด้วย 0.66% EtOH (negative control) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน flask ปริมาตร 25 cm^3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ทั้งหมด (เซลล์เกาะพื้นและเซลล์แขวนลอย) มาสกัด DNA ด้วย GF- 1 Tissue DNA Extraction Kit (VIVANTIS) แล้วนำมาวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt นาน 45 นาที

เมื่อนำ DNA มาแยกบนตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้า ตัวกลางที่ใช้คือวุ้นอะกาโรส (agarose gel) เนื่องจาก DNA มีประจุเป็นลบ จึงสามารถเคลื่อนไปยังขั้วบวกในสนามไฟฟ้า เมื่อเจลแข็งตัวจะมี

ลักษณะเป็นรูปพรุณอยู่ภายใน ซึ่งขนาดของรูปพรุณดังกล่าวจะขึ้นกับความเข้มข้นของเจล ซึ่งถ้าหากเจลมีความเข้มข้นมากรูปพรุณจะเล็กทำให้ DNA เคลื่อนผ่านได้ยาก ในขณะที่เดียวกันถ้าหากเจลมีความเข้มข้นน้อยรูปพรุณจะขนาดใหญ่ทำให้ DNA เคลื่อนผ่านได้ง่ายกว่า โดย DNA จะเคลื่อนไปในสนามไฟฟ้าตามขนาดของโมเลกุล โดยที่สารโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารโมเลกุลใหญ่ หลังจากที่ DNA ถูกแยกบนเจลแล้ว สามารถอ่านผลการแตกของ DNA ที่ติดกับสารเรืองแสง SYBR Gold ด้วยเครื่อง dark reader แล้วบันทึกภาพของดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์การแตกของ DNA แล้วพบว่า กลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH เกิดแถบ (band) หนาเพียง 1 แถบ แสดงว่ามี DNA ขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ได้ไม่ไกล แตกต่างจากในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด SOM โดยพบแถบหนา 1 แถบและมีลักษณะเป็น smear band ยาวลงมา โดยความยาวเพิ่มตามขนาดความเข้มข้นของสารสกัด SOM ที่เพิ่มขึ้น แสดงว่ากลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัด เกิดการแตกของ DNA ทำให้มีขนาดของ DNA แตกต่างกันไป (DNA fragmentation) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย DOX ที่พบว่าเกิด smear band ที่ยาวเช่นกัน (รูป 4)



รูป 4 แสดงการเกิด DNA FRAGMENTATION ของ HELA CELLS ที่บ่มด้วยสารสกัด SOM และ DOXORUBICIN (DOX) ด้วยวิธี AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

ผลการศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI & PI staining

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด SOM ต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยง HeLa cells ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน cover slide ซึ่งแช่ใน 6 well plate นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารสกัด SOM ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80} คือ 76 ± 3.11 , 132 ± 5.63 และ 172 ± 7.34 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ บ่มด้วย doxorubicin (Dox) (positive control) ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 2 ± 0.35 $\mu\text{g/ml}$ และบ่มด้วย 0.66% EtOH (negative control) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI และ PI และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI และ PI มีเป้าหมายเหมือนกันคือที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 358 nm และ 535 nm จะ emission ได้แสงสีน้ำเงิน (461 nm) และสีแดง (617 nm) ตามลำดับ

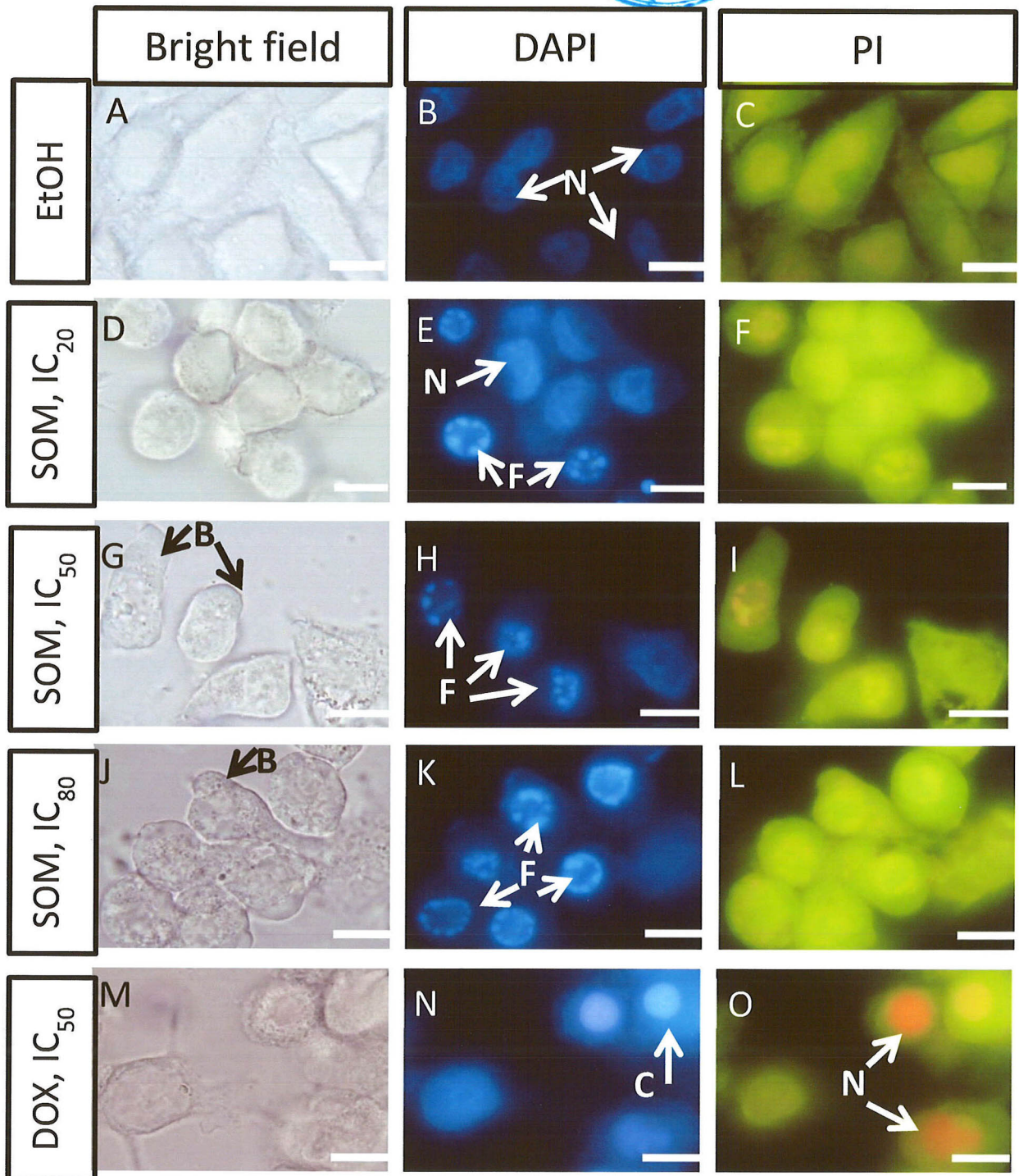
DAPI และ PI มีเป้าหมายที่ nuclear DNA เหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันคือ DAPI มีคุณสมบัติเป็น membrane permeability หรือคุณสมบัติในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยที่ PI นั้นมีคุณสมบัติเป็น membrane impermeability หรือคุณสมบัติในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ได้ ดังนั้นในเซลล์ที่มีชีวิต เยื่อหุ้มเซลล์ยังมีความสมบูรณ์ PI จึงไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปได้ แต่ในทางตรงข้ามถ้าหากเซลล์ตาย มีรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้น (late apoptosis หรือ necrosis) จะพบสีแดงของ PI เข้าไปสะสมอยู่ภายใน DNA ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ PI เป็นตัวบ่งชี้ระหว่างเซลล์มีชีวิตกับเซลล์ตาย (Moore, 1998) ถ้าหากเป็นเซลล์ที่มีชีวิตมี DNA ที่สมบูรณ์ เมื่อย้อมพร้อมกัน 2 สี จะติดสีเฉพาะสีของ DAPI เพียงอย่างเดียว จะมีการกระจายของสีสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั่วทั้งนิวเคลียส แต่ถ้ามีการเกิด early apoptosis ขึ้น จะพบนิวเคลียสติดสี DAPI เพียงอย่างเดียวเท่านั้น (ไม่พบการติดสี PI) แต่สีของ DAPI เข้ม และนิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าปกติ เนื่องจากการรวมกลุ่มของโครมาติน (condensed chromatin) หรือถ้า นิวเคลียสแตกเป็นบางส่วนจะพบการติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ ไม่สม่ำเสมอ (nuclear fragmentation) ในกรณีที่ เป็น late apoptosis จะพบการติดสี PI และ DAPI ทั้ง 2 สี โดยในการทดลองครั้งนี้นับเซลล์ประมาณ 500 เซลล์ และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ (ตาราง 2)

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แบบ bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.66% EtOH พบว่าผิวเซลล์มีลักษณะเรียบ ขอบเขตชัดเจน ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เหยียดยาวเป็นรูปกระสวย (รูป 5 A) ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI (รูป 5 B) และ PI (รูป 5 C) พบว่าเซลล์ทั้งหมดติดสีน้ำเงินของ DAPI โดยพบเซลล์ปกติ 100% ซึ่งนิวเคลียสติดสีน้ำเงินแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ กระจายทั่วนิวเคลียส (homogenous) และไม่พบเซลล์ที่มีการติดสีแดงของ PI

เซลล์ในกลุ่มที่บ่มสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne (SOM extracts) ที่ความเข้มข้น 76 (IC_{20}), 132 (IC_{50}) และ 172 (IC_{80}) $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อดูเซลล์แบบ

bright field พบว่ามีจำนวนเซลล์ลดลงตามขนาดความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น มีดุ่มที่ผนังเซลล์ (membrane blebbing) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเซลล์ขอบเขตไม่ชัดเจน ซัยโตพลาสซึมมีลักษณะไม่เรียบ (รูป 5 D, G & J) เมื่อดูการติดสีของ DAPI ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 76 (IC_{20}), 132 (IC_{50}) และ 172 (IC_{80}) $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีเซลล์ปกติลดลงตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ลักษณะเซลล์ปกติคือนิวเคลียสติดสี DAPI สม่ำเสมอจำนวน $88.75 \pm 7.4\%$, $73.15 \pm 11.0\%$ และ $40.32 \pm 4.5\%$ ตามลำดับ ในทางตรงข้ามเซลล์ที่เกิด early apoptosis เพิ่มขึ้นตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น มีจำนวน $8.75 \pm 0.4\%$, $20 \pm 3.9\%$ และ $51.54 \pm 4.1\%$ ตามลำดับ โดยลักษณะนิวเคลียสติดสี DAPI แบบไม่สม่ำเสมอ แต่ไม่ติดสี PI มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาตินหนาแน่น ขนาดของนิวเคลียสที่เล็กลงกว่าปกติและพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) (รูป 5 E, H & K) เช่นเดียวกันเซลล์ที่เกิด late apoptotic หรือ necrotic cells จำนวน $2.5 \pm 0.6\%$, $6.84 \pm 0.7\%$ และ $8.12 \pm 1.0\%$ ตามลำดับ โดยจะพบนิวเคลียสติดสีแดงของ PI (รูป 5 F, I & L)

ลักษณะของเซลล์ในกลุ่ม positive control (Doxorubicin) เมื่อดูเซลล์แบบ bright field พบว่าเซลล์ขอบเขตไม่ชัดเจน ซัยโตพลาสซึมมีลักษณะไม่เรียบ (รูป 5 M) เมื่อดูการติดสีของ DAPI พบว่า มีเซลล์ปกติจำนวน $57.74 \pm 8.4\%$ โดยเห็นนิวเคลียสติดสี DAPI ลักษณะเรียบเนียน สม่ำเสมอ พบเซลล์ที่เกิด early apoptosis จำนวน $1.4 \pm 0.3\%$ โดยจะพบขนาดของนิวเคลียสที่เล็กลงกว่าปกติ มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน พบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) (รูป 5 N) และพบเซลล์ที่เกิด late apoptosis คือมีการติดสีแดงของ PI จำนวน $45.07 \pm 3.6\%$ (รูป 5 O)



รูป 5 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียส จากการย้อมด้วย สี DAPI และ PI, B = BLEB, C = CHROMATIN CONDENSATION, N = NORMAL, E = EARLY APOPTOSIS, L = LATE APOPTOSIS, SCALE BAR = 10 UM

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด APOPTOSIS วิเคราะห์จากการติดสี DAPI และ PI ที่นิวเคลียส

	%Normal cells (homogenous DAPI)	%Early apoptotic cells (condensed or fragment DAPI)	%Late apoptotic or necrotic cells (PI)
0.66% EtOH (negative control)	100	0	0
SOM extracts (IC ₂₀) [76 ± 3.11 µg/ml]	88.75 ± 7.4	8.75 ± 0.4	2.5 ± 0.6
SOM extracts (IC ₅₀) [132 ± 5.63 µg/ml]	73.15 ± 11.0	20 ± 3.9	6.84 ± 0.7
SOM extracts (IC ₈₀) [172 ± 7.34 µg/ml]	40.32 ± 4.5	51.54 ± 4.1	8.12 ± 1.0
Doxorubicin (IC ₅₀) [2 ± 0.35 µg/ml] (positive control)	57.74 ± 8.4	1.4 ± 0.3	45.07 ± 3.6