วิธีการวิจัย

1. สารเคมี

Fetal bovine serum (FBS), RPMI medium 1640, phytohemagglutinin M-form (PHA) และ trypsin EDTA (Invitrogen Corp., USA); Thaizolyl blue tetrazolium bromide (MTT)(Amresco, USA); dimethylsulfoxide (DMSO), ethyl ether (Labscan Asia Co, Thailand); lectin from *Phytolacca americana* (poke weed) (PWM) (Sigma-Aldrich, Germany); sodium chloride, disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), ammonium chloride (Ajex Finchem, Australia); potassium bicarbonate (Merck); trypan blue, disodium EDTA (Fluka, USA)

2. สัตว์ทดลอง

หนู Balbc เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม

3. การเก็บตัวอย่างและการสกัดพืช

นำส่วนของพืชที่เก็บได้มาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 35 ^{0}C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียด นำมาแช่ใน 50% ethanol ในอัตราส่วน (1:5) เป็นเวลา 7 วัน โดยคนให้เข้ากันเป็นระยะๆ นำมากรองผ่านผ้าก๊อสที่สมทบกันหลายๆ ชั้น นำส่วนที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 g เป็นเวลา 3 นาที นำ supernatant มาทำให้แห้ง โดยใช้ rotavap ที่ 45^{0}C จากนั้นนำไปเข้า Freeze dryer และชั่งน้ำหนักผงแห้งของส่วนสกัดสมุนไพรเพื่อคำนวณหา % yield ซึ่งแสดงค่าในรูปกรัมของสารสกัดต่อ 100 กรัม ของผงแห้งก่อนสกัด จากนั้นเก็บส่วนสกัดแห้งไว้ในภาชนะปิดสนิท, ป้องกันแสงที่ -20^{0}C

4. การทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์ และต้านการกลายพันธุ์

ใช้วิธีดัดแปลง preincubation bacterial mutation method (Araki et al, 1984 และ Sripanidkulchai et al. 2002) โดย tester strains คือ *Salmonella typhimurium* TA 98 และTA100 ในภาวะที่มี และไม่มีการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ S-9 mix ดังนี้

4.1.1 การเตรียม S-9 mix

ใช้ตับหนู Sprague-Dawley เพศผู้ที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ที่ชักนำด้วย phenobarbital และ 5,6-naphthoflavone มาเตรียม S-9 mix โดยการทำ differential centrifugation จากนั้นเตรียม S-9 mix ซึ่งประกอบด้วย 4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5mM glucose-6- phosphate, 8mM $MgCl_2$, 33 mM KCl, 100

M sodium phosphat buffer (p47.4) และ10% S-9 mix ตามรายละเอียดใน Matsushima et al (1976) และ Sripanidkulchai et al (1994).

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์

ละลายสารสกัดสมุนไพรใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml จากนั้นนำสารละลายสมุนไพรปริมาตร 10, 25, 50,100 µl มา incubate กับ S-9 mix (ภาวะที่มี S-9 mix) หรือ phosphate buffer (ภาวะที่ไม่มี S-9 mix)จำนวน 0.5 ml และ test strain TA98 หรือ TA100 0.1 ml ที่ 30^0C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม top agar 2 ml และเทส่วนผสมลงบน Vogel-Bonner mininal agar plate แล้ว incubated ที่ 30^0C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวน revertant ที่เกิดขึ้นและแสดงค่าเป็น revertant/ plate โดยใช้ DMSO อย่างเดียวเป็นค่า background หรือ blank ทำการทดสอบซ้ำ 2-3 ทุกความเข้มข้น

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์

ทำการทดสอบคล้ายคลึงกับข้อ 4.1.2 แต่ให้มี standard positive mutagen ในแต่ละการทดลอง ซึ่งได้ใช้ AF_2 (2-2 furyl-3-(5-nitro-2 furyl) acrylamide) ปริมาณ 0.1 และ 0.01 µg/plate สำหรับ TA98 และ TA100 ตามลำดับ หรือ 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) ปริมาณ 0.5 และ 0.025 µg/plate สำหรับ TA98 และ 100 ตามลำดับ ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix และ 2-AA (2-amino anthracene) ปริมาณ 0.5 µg/plate สำหรับ TA98 และ TA100 ในภาวะที่มี S-9 mix

4.1.4 การแสดงผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารละลายสมุนไพร ให้นำค่าเฉลี่ย revertant/plate มาลบออกด้วยค่า background ของแต่ละการทดสอบ กรณีการทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์หากให้ผลบวกจะต้องแสดงลักษณะ dose response curve และค่าที่ได้จะต้องมากกว่าค่า background อย่างน้อย 2 เท่า ส่วนฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต้องแสดงการยับยั้งผลของ standard mutagens ในลักษณะ dose response curve และระดับการต้านการกลายพันธุ์ กำหนดจากค่าความเข้มข้นที่ให้ผลลดจำนวน revertant ลงอย่างน้อย 50%

5. การทดสอบฤทธิ์ immunomodulation

5.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรและสารไมโตเจน

1. สารสกัดสมุนไพร เตรียมเป็น 100 mg/ml ใน DMSO แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง 0.45 ไมครอน
2. เจือจางสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI+10% FBS ให้ได้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นใส่ใน 96-well plate

4. เตรียมไมโตเจน PHA โดยเจือจางด้วย RPMI+10% FBS ให้ได้ 1:40 แล้วดูดมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate
5. สำหรับไมโตเจน PWM ทำการเจือจางให้ได้ 0.75 ไมโครกรัมต่อมล. ด้วย RPMI+10% FBS ดูดมา 50 ไมโครลิตร ลงใน ลงใน 96-well plate

5.2 การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบ

1. เตรียมหนู Balbc อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ทำให้ตายด้วย ethyl ether วางลงบนถาดปลอดเชื้อที่วางอยู่บนน้ำแข็งอีกที แล้วสเปรย์ 70% Alcohol ให้ทั่วตัวหนู
2. จัดหนูนอนในท่าตะแคง แล้วใช้กรรไกรผ่าตัดปลอดเชื้อตัดหนังและกล้ามเนื้ออย่างระมัดระวังจะพบม้ามอยู่ ใช้ปากคีบหยิบม้ามขึ้นมาแล้ววางม้ามลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อที่วางอยู่บนน้ำแข็งภายในมี RPMI ปริมาตร 20 มล. ที่เย็นอยู่
3. นำจานอาหารและถาดน้ำแข็งนั้นเข้าไปทำในตู้ปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรตัดเปลือกของม้ามแล้ววางลงใน sieve ซึ่งวางแช่อยู่ในอาหารในจานเช่นกัน แล้วใช้ปากคีบคีบชิ้นม้ามมาขูดกับ sieve นั้น โดยให้ก้น sieve แช่อยู่ในอาหารตลอดเวลา ขูดจนเหลือแต่เปลือกม้ามสีขาว จากนั้นเอา sieve ออก ดูดอาหารในจานทั้งหมดใส่ลงใน conical tube ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มล.
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. นำออกมาดูดส่วนใสทิ้งไป จากนั้นแคะตะกอนเซลล์ให้แตกออกจากกันให้มากที่สุด แล้วเติม 10 มล. ACK lysing solution (0.15M NH4Cl, 10 mM KHCO3, 0.1 mM Na2EDTA, pH 7.4, filtered with 0.2 um filter) ซึ่งอุ่นไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ 1-2 นาทีเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกให้หมด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. นำออกมาดูดส่วนใสทิ้งไป จากนั้นแคะตะกอนเซลล์ให้แตกออกจากกันให้มากที่สุด แล้วเติม 5 มล. ของอาหาร RPMI เย็นผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ทำซ้ำในข้อ 6 อีกครั้ง
8. นำออกมาดูดส่วนใสทิ้งไป จากนั้นแคะตะกอนเซลล์ให้แตกออกจากกันให้มากที่สุด แล้วเติม 2 มล. ของอาหาร RPMI+10%FBS เย็นผสมให้เข้ากันเบา ๆ ดูดเซลล์ 20 ไมโครลิตร มาผสมในสี trypan blue 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดไปนับด้วย heamatocytometer

9. การนับเซลล์ ให้นับเซลล์ที่มีชีวิต คือเซลล์ที่ไม่ติดสี และใสวาว เป็นจำนวน 4 ช่องใหญ่ แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณตามสูตร ดังนี้

จำนวนเซลล์เฉลี่ย X dilution factor X 10^4

(โดย dilution factor มาจากการเจือจางตอนย้อมสี คือ 10 เท่า ส่วน 10^4 เป็นค่าที่คำนวณจากปริมาตรของ heamatocytometer) แล้วนำจำนวนเซลล์ที่คำนวณได้มาปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ $6x10^6$ cell/ml โดยใช้ปริมาตร 8 ml/plate (นับจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินซึ่งเป็นเซลล์ตาย เพื่อนำเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต คำนวณหา % viability เซลล์ที่ใช้ควรมีค่า % viability มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์)

5.3 <u>การทดสอบผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน</u>

1. ดูดเซลล์ที่ปรับจำนวนแล้ว 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ที่เตรียมสารสกัดและสารกระตุ้น(ข้อ 5.1) โดยระหว่างที่ดูดให้เขย่าเซลล์ในขวดเบา ๆ ไปด้วยเพื่อให้เซลล์กระจายตัวให้เท่า ๆ กัน เสร็จแล้วนำไปบ่มที่ ตู้บ่ม 37° C , 5% CO2, 48 hr ตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์ด้วยกล้อง Inverted Microscopic
2. เมื่อครบเวลา นำมาเติมด้วย 1 mg/ml MTT ใน RPMI หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 5 ชม.ครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำมาดูดเอาส่วนใสออก แล้วจึงเติม DMSO หลุมละ 100 ไมโครลิตร ลงไปละลายผลึก นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบระนาบ เพื่อช่วยให้ผลึกละลายให้หมด 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 จึงนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณ Cytotoxicity and Proliferation Index

5.4 <u>วิธีการคำนวณ Cytotoxicity and Proliferation Index</u>

$$\text{Cytotoxicity Index} = \frac{\text{(cell } \mathbf{with} \text{ each conc.ext } \mathbf{without} \text{ mitogen)-BG each conc. Ext.}}{\text{(cell } \mathbf{without} \text{ extract } \mathbf{without} \text{ mitogen) - BG without Ext.}}$$

$$\text{Proliferation Index} = \frac{\text{(cell } \mathbf{with} \text{ each conc. ext. } \mathbf{with} \text{ mitogen)- BG each conc. Ext.}}{\text{(cell } \mathbf{with} \text{ each conc. Ext. } \mathbf{without} \text{ mitogen)- BG each conc. Ext.}}$$

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{live cells}}{\text{(live cells + dead cells)}} \times 100$$