6. วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

6.1 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 ชนิด ได้แก่ KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma), KKU-M139 (squamous carcinoma), KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma), KKU-M213 (adenosquamous carcinoma), และ KKU-M214 (moderately-differentiated adenocarcinoma) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 5 ชนิด เป็นเซลล์ที่ establish ขึ้นที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด เพาะเลี้ยงใน Dulbecco's minimum essential medium/F-12 (Ham) ใส่ 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM-glutamine, 100 IU Penicillin, 100 μg streptomycin เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°ซ ภายใต้บรรยากาศ 5 % CO_2 ทำการเปลี่ยน media สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

6.2 สารสกัดและการเตรียมสารละลายสารสกัด

สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยได้จากโครงการย่อยที่ 3 เรื่อง "จุลชีพที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ แหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ระยะที่ 2"

6.2.1 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนดใน modified Zobell agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

6.2.2 ทำการถ่ายเชื้อลงใน modified Zobell broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

6.2.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุ(ขนาด 2 ลิตร)ฟลาสค์ละ 1 ลิตร จำนวน 1 – 10 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที) โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อครบเวลาเท่ากับที่เชื้อออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด

6.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High Speed Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วจะแยกออกเป็นสองส่วน ดังนี้

ส่วนเซลล์ของแบคทีเรีย

- นำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย Normal saline 0.85%
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.4 ในแต่ละหลอดที่ใช้ปั่นแยกเซลล์โดยนำส่วนที่ชะได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอด ที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ที่ชั่งน้ำหนัก และบันทึกไว้แล้ว

- ทิ้งส่วน supernatant ทิ้งไปคงเหลือแต่ส่วนของเซลล์ และนำไปชั่งน้ำหนักทั้งหมด แล้วคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์
- ทำการสกัดด้วยสารละลาย เอทธานอล, สารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และเมทธานอล (CH_3 : MeOH = 1 : 2) ประมาณ 100-300 มิลลิลิตร โดยทำการชะตะกอนเซลล์ให้หลุดออกจากกัน แล้วนำไปบด (homogenized) โดยใช้เครื่อง biomixer หรือ Ultrazonic นาน 5 นาที
- เทสารละลายที่ได้ใส่บีกเกอร์ ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrazonic
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 4
- นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1.4 ถึงข้อ 5.16 อีก 2 ครั้ง แล้วทำการชั่งน้ำหนักสุดท้าย
- นำตัวอย่างที่ได้มาใส่ ethyl acetate และน้ำ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่กรวยสำหรับแยกชั้นขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethyl acetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ehthyl acetate ซึ่งจะนำมาทำให้แห้งโดยใช้พลาสค์สำหรับ evaporate ที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ส่วนชั้นล่างจะเป็นส่วนที่มีสารสกัดที่ละลายได้ดีในน้ำ จะนำมาใส่ ethyl acetate ประมาณ 30 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง แล้วเอาส่วนของน้ำที่ได้สุดท้ายไปทำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักก่อน และหลังทำการทดลองทุกครั้ง
- นำส่วนใสที่ได้แต่ละชั้นคือ ethyl acetate และน้ำใส่ฟลาสค์สำหรับ evaporate โดยต่อเข้ากับเครื่อง rotary vacumm evaporator

ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

- นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 4 พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethyl acetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนสารที่สามารถละลายได้ใน ethyl acetate ซึ่งจะนำมาระเหยให้แห้งโดยใช้ฟลาสค์สำหรับ evaporate เพื่อนำไปทดสอบต่อไป
- ทำการทดลองขั้นต่อไป เช่นเดียวกับที่ดำเนินการในตอนต้น

จากนั้นนำสารสกัดมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter membrane ขนาด 0.45 μm นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เทียบกับ vehicle และสารมาตรฐานต่อไป

6.3 Apoptosis assay

เลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับที่ดี มาทำการตรวจสอบกลไกการตายของเซลล์ว่าเกิดจากกระบวนการ apoptosis หรือไม่ โดยวิธี ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining และ DNA fragmentation

6.3.1 Ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining

การศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการดู nuclear morphology ด้วยวิธี EB/AO staining ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 1 x 10^4 เซลล์ / หลุม ใน 96-well culture plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน CO_2-incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นที่ทำให้เกิด 100 % cytotoxicity ลงไป และใช้ RPMI 1640 ที่มี 0.1%DMSO เป็น vehicle control นำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2-incubator นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมเซลล์ด้วย ethidium bromide/acridine orange จากนั้นนำมาตรวจสอบ nuclear morphology โดยใช้กล้อง Nikon fluorescent microscope เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีนิวเคลียสที่มี condensed chromatin และพบ fragmented apoptotic nuclei ทำการนับเซลล์ที่เกิด apoptosis จากเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis และคำนวณหาค่า mean ± SEM ของการทดลอง 3 ครั้ง ต่อไป

6.3.2 DNA fragmentation

การตรวจสอบ DNA fragmentation จะทำการวิเคราะห์โดยการทำ agarose gel electrophoresis ใช้วิธีของ Sambrook และ Russell (2001) (8) ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 2-3 x 10^6 เซลล์ใน 25 cm^2 culture flask เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่สารสกัดจากจุลชีพทะเลที่แยกได้จากน่านน้ำไทยที่มีความเข้มข้นที่ทำให้เกิด 100 % cytotoxicity นำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2-incubator นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์ล้าง ใส่ lysis buffer ลงในตะกอนเซลล์ ทำการสกัด DNA ด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) นำตะกอน DNA มาละลายด้วย TE buffer เติม Rnase นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง นำ DNA ที่สกัดได้มาทำ electrophoresis ใน 2 % agarose gel ที่ 80 โวลท์ นาน 1.5 ชั่วโมง นำมาย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดู DNA fragmentation ภายใต้ UV light transilluminator (Fotodyne, USA)

6.4 การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-9, Activated-caspase-9, Caspase-3, Activated–caspase-3, AIF, และ beta-actin โดยวิธี Western blotting

นำเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วยสารสกัดมาทำการย่อยเซลล์โดยใช้ lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.3 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.5% NP-40, 5 U/ml aprotinin) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำ cell lysates มาปั่นเหวี่ยงที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการคำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry-method ในขั้นตอนต่อไปนำโปรตีนปริมาณ 70-100 µg มาทำการ denature โดยใช้วิธี SDS-PAGE จากนั้นนำโปรตีนที่ถูกแยกแล้วมา transfer ลงใน nitrocellulose membrane และทำการ block membrane ด้วย 5% non-fat milk powder (w/v) ใน TBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือ

ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4°C ต่อจากนั้น membrane จะถูก probe ด้วย antibody ต่อ Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-9, Activated-caspase-9, Caspase-3, Activated–caspase-3, AIF, และ beta-actin และต่อมาทำการ probe ด้วย peroxidase-conjugated secondary antibody และในขั้นตอนสุดท้ายทำการตรวจวัดผลโดยใช้ ECL detection system (10)

6.5 Statistical analysis

ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student t test ของค่า mean ± SEM ของการทดลองที่ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

สถานที่ทำการทดลอง/และเก็บข้อมูล

ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

ระยะเวลา 2 ปี

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์	←	—	—	—	—	—	→					
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ (apoptotic assay) EB/AO staining, DNA fragmentation						←	—	—	→			
4. ศึกษาฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, AIF, caspase-9, Activated-caspase-9, caspase-3, Activated-caspase-3, beta-actin โดยวิธี Western blotting							←	—	—	—	—	→
5. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล			←	—	→				←	—	—	→
6. สรุปผลและจัดทำรายงานการวิจัย						←	→					← →