บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด ดังตารางที่ 2-1 พิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นำพืชมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วหั่นแต่ละส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าพืชสมุนไพรแต่ละส่วนจะแห้ง จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยน้ำ

นำส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร 21 ชนิด จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่บดละเอียดจำนวนหนึ่ง สกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:10 ทำการสกัดโดยการต้มส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรในน้ำเดือดนาน 30 นาที จากนั้นกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatmam เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง นำกากพืชมาต้มซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ขูดเก็บส่วนสกัดและจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบทำการละลายส่วนสกัดด้วยน้ำ

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยเอทานอล

นำส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่บดละเอียดจำนวนหนึ่ง ใส่ถุงผ้าแช่ในสารละลายเอทานอล 95 % ในอัตราส่วน 1 : 10 เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าขวดโหลที่ใส่ถุงผ้าของส่วนต่างๆ ของพืช วันละ 3 เวลา กรองสารละลายเอทานอลที่ได้ด้วยเครื่องดูดความดันที่อุณหภูมิห้องโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จากนั้นนำส่วนผงพืชทั้ง 15 ชนิด ใส่ในถุงกรองเพื่อสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ขูดเก็บส่วนสกัดและจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบทำการละลายส่วนสกัดด้วยเอทานอล 95 %

นำส่วนสกัดเอทานอลทั้งหมด 30 ส่วนสกัดไปวิเคราะห์ NMR (แสดงผลในภาคผนวก 1)

ตารางที่ 2-1 รายชื่อพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบ

รายชื่อพืชสมุนไพร	วงศ์	ส่วนที่ใช้ทดสอบ
1. สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* Linn.)	Composutae	ใบ
2. เอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen) Smith)	Zingiberaceae	ใบ, ต้น, เหง้า
3. ชงโคป่า (*Bauhinia* sp.)	Leguminosae-Caesalpinioideae	ใบ
4. มะเดื่อหอม (*Ficus hirta Vahl*)	Moraceae	ใบ
5. ลายกนก	-	ใบ
6. ระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	Apocynaceae	ใบ, ราก
7. ไมยราบ (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle)	Mimosaceae	ทุกส่วนของต้น
8. โคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr)	Melastomataceae	ใบ, ราก
9. ค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	Taccaceac	ใบ, เหง้า
10. ดีงูต้น (*Helicteres hisuta* Lour)	Sterculiaceae	ใบ, ราก
11. มะฮืก (*Clausena excavate* Burm F.)	Rutaceae	ใบ, ราก
12. หัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)	Araceae	ใบ, เหง้า
13. ไม้ลาย (*Microcos tomentosa* Sm.)	Tiliaceae	ใบ
14. เข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	Rubiaceae	ใบ, ราก
15. พนมสวรรค์ (*Clerodendrum paniculatum* L.)	Verbenaceae	ราก
16. สะค้านใบพลู (*Piper ribesoides* Wall)	Piperaceae	เถา
17. ฝนแสนห่า (*Argyreia capitiformis* (Poiret) Ooststr)	Convulvulaceae	ใบ
18. เข็มป่า (*Ixora lobbii* King & Gamble)	Rubiaceae	ทุกส่วนของต้น
19. ฟันปลา (*Litsea umbellata* Merr)	Lauraceae	ใบ
20. ราชดัด (*Brucea javanica* (L.) Merr)	Siamaroubaceae	ใบ
21. พังแหรใหญ่ (*Trema orientalis (L.)* Yala)	Ulmaceae	เปลือกลำต้น

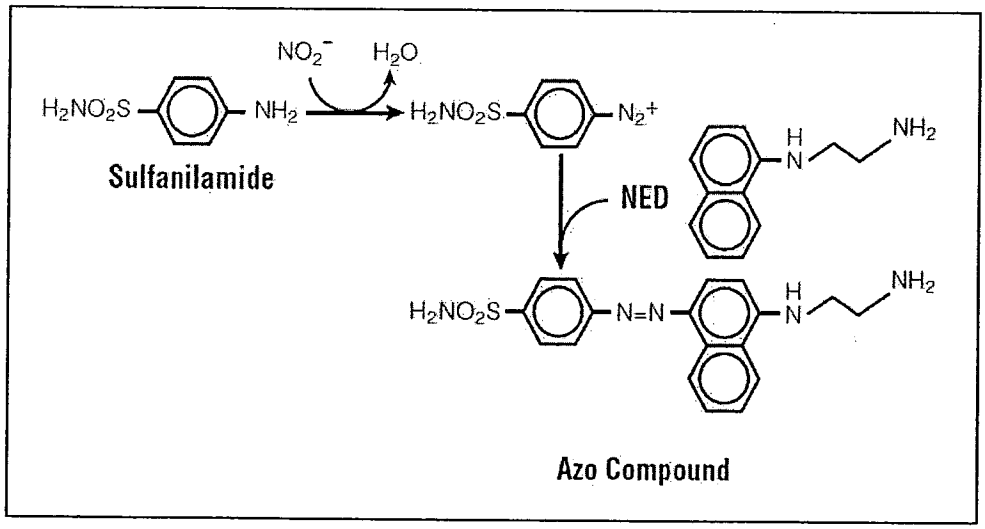
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านต้านอักเสบของส่วนสกัด

2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7

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)

2.4.2 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 2-1) 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 2-1 ปฏิกิริยา Griess
(ที่มา : www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf)

2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน (PGE_2)

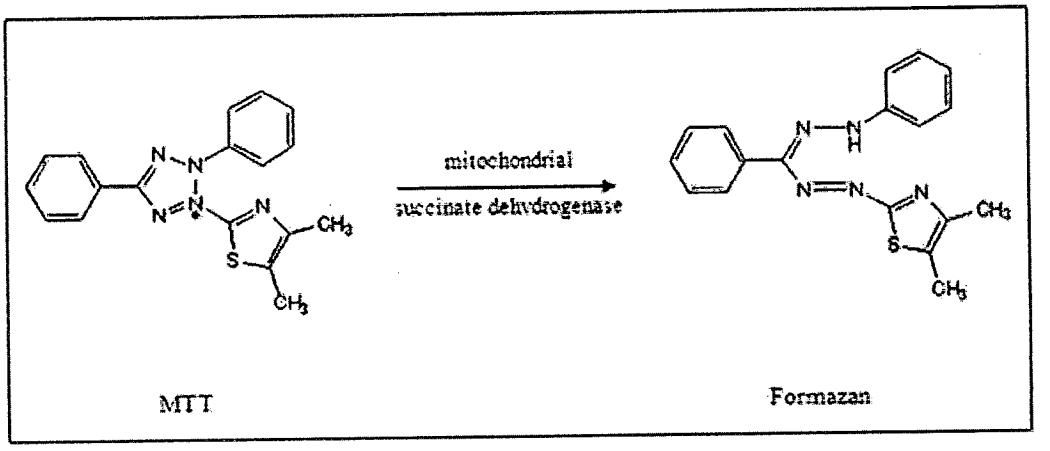
แบ่งเซลล์ RAW 264.7 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5x10^5$ เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ในสภาวะที่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มา

วิเคราะห์ปริมาณ PGE_2 โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PGE_2 compettitive enzyme immune assay kit ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้ เจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตร 150 µl ด้วย Calibrator diluents RD5-56 ปริมาตร 300 µl จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 µl ลงใน ไมโครเพลทที่เคลือบก้นหลุมด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody (secondary antibody) และเติมสารละลาย mouse anti-PGE_2 monoclonal antibody (primary antibody) ปริมาตรหลุมละ 50 µl และบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย PGE_2 conjugated to horseradish peroxidase ซึ่งคือ PGE_2 ที่ติดด้วยเอนไซม์ HRP ปริมาตร 50 µl ในไมโครเพลท จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างหลุมในไมโครเพลทด้วย washing buffer ปริมาตร 250 µl จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติมซับสเตรท (สารละลายระหว่าง hydrogen peroxide และ tetramethylbenzidine ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตรหลุมละ 100 µl ผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 540 nm คำนวณความเข้มข้นของ PGE_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลาย PGE_2 ที่ทราบความเข้มข้น (0-2,500 pg/ml)

2.5 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ก้นแบนแบบ 24 หลุม โดยให้จำนวนเซลล์ต่อหลุมเป็น$1.5x10^5$ เซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ลงเกาะผิวภาชนะ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้ง 0.4% (v/v) DMSO และ 50 µM aminoguanidine (AG) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ใส่หลุมละ 500 µl ที่มี MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็นผลึกฟอร์มา-แซน (formazan) ที่มีสีม่วง (ภาพที่ 2-2) แล้วจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายผลึกฟอร์มาแซนที่ได้ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลุมละ 500 µl ดูดสารละลายฟอร์มาแซนจากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 µl ลงในไมโครเพลทก้นแบนแบบ 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่งปริมาณฟอร์มาแซนจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด และคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ดังสมการ

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



รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยาการรีดักชันของ MTT
(ที่มา : www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=91)

2.6 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเป็นการทดสอบตามวิธีของ กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2553) และเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยเตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอล และนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.0078125, 0.015625, 0.03125, 0.0625 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปฏิกิริยาจะเริ่มจากเติมสารละลายกรดแกลลิก หรือส่วนสกัดที่ละลายในน้ำกลั่นหรือ 70% DMSO ของเหง้าและใบเร่วหอมที่ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 70% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทำการปิเปตสารผสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมไมโครเพลทก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.7 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1x106 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และLPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการขูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมี

วิธีดังนี้ 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 A260 เท่ากับ 40 µg/mL ของ RNA

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

นำ RNA ที่ได้ จำนวน 1 µg ทำปฏิกิริยากับ 5X iScript™ Reverse Transcription Supermix ปริมาตร 4 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจาก RNase ให้ได้ปริมาตรเป็น 20 µl ใส่ลงในหลอด PCR จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR ในสภาวะ Priming ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, Reverse transciption 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ RT inactivation ที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว นำ cDNA ที่ได้มาตรวจสอบด้วยการแยกโดย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบโดยเครื่องฉายแสง UV 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 คู่เบส (bp)	เลข accession
iNOS	5'-GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC-3' (F)	156	NM_010927.3
	5'-AGCCAGCGTACCGGATGAGC-3' (R)		
COX-2	5'-TGATCGAAGACTACGTGCAACACC-3' (F)	164	NM_011198.3
	5'-TTCAATGTTGAAGGTGTCGGGCAG-3' (R)		
EF-2	5'-CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA-3' (F)	155	NM_007907.2
	5'-GGGTCAGATTTCTTGATGGGGATG-3' (R)		

ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ PCR ประกอบด้วย 2X iTaq™ Universal SYBR® Green supermix ปริมาตร 10 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.5 µl, 10 µM revrse primer ปริมาตร 0.5 µl และ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ ปริมาตร 2 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ได้ปริมาตรเป็น 20 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง Real-time PCR โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของยีนคือ pre-heat 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำ Melting curve โดยทำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส หาค่า cycle of threshold (C_t) ของแต่ละปฏิกิริยา แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับยีน iNOS และ EF-2 จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน iNOS, COX-2 และ EF-2 ซึ่งแสดงผลในรูปของอัตราส่วนของ copy number ของ iNOS, COX-2 และ EF-2

2.9 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm.(1x106 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH2PO4, 10 mM Na2HPO4] 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 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 นานข้ามคืน หรือสารละลาย mouse anti β-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 β-actin ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS และ β-actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.12 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF-ΚB เข้าสู่นิวเคลียส

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm จานละ 5×10^6 เซลล์ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม LPS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 µg/ml และบ่มเซลล์ต่อที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการสกัดนิวเคลียสตามวิธีที่รายงานโดย Srisook et al. (2011) เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS ที่เย็น 2 ครั้ง และเติม PBS ปริมาตร 500 µl เพื่อทำการขูดเซลล์ ใส่หลอดไมโครทิวบ์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนที่เป็นตะกอน เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโดยการเติมบัฟเฟอร์ 1 (25 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 5 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) PH 7.9) และ 1X PI ปริมาตร 200 µl บ่มที่น้ำแข็ง 20 นาที โดยที่นำมาเขย่าทุกๆ 5 นาที

จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 2 (บัฟเฟอร์ 1, 5% NP-40) ปริมาตร 200 µl เขย่าบนน้ำแข็ง 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์ 3 (บัฟเฟอร์ 1 และบัฟเฟอร์ 2 ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 200 µl เขย่าเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายออกด้วยปิเปต และละลายตะกอนนิวเคลียสโดยเติมบัฟเฟอร์ 4 (25 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM $MgCl_2$, 20% glycerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) และ 1X PI ปริมาตร 70 µl บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 40 นาที พร้อมเขย่าทุกๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ และนำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี Bradford ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Western blot

2.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองที่อิสระต่อกัน ทำ 3 ซ้ำ สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student's t test สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Prism 5