

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการสกัด แยก การทำให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีจากต้นกระท่อมเลือด ศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากกระท่อมเลือดในการทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ตายแบบอะพอพโทซิส และศึกษากลไกการตายแบบอะพอพโทซิสในระดับโมเลกุลเมื่อกระตุ้นด้วยสารบริสุทธิ์จาก กระท่อมเลือดในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ สำหรับการศึกษาวิจัยนำเสนอเป็นลำดับดังนี้

วิธีการทั่วไป

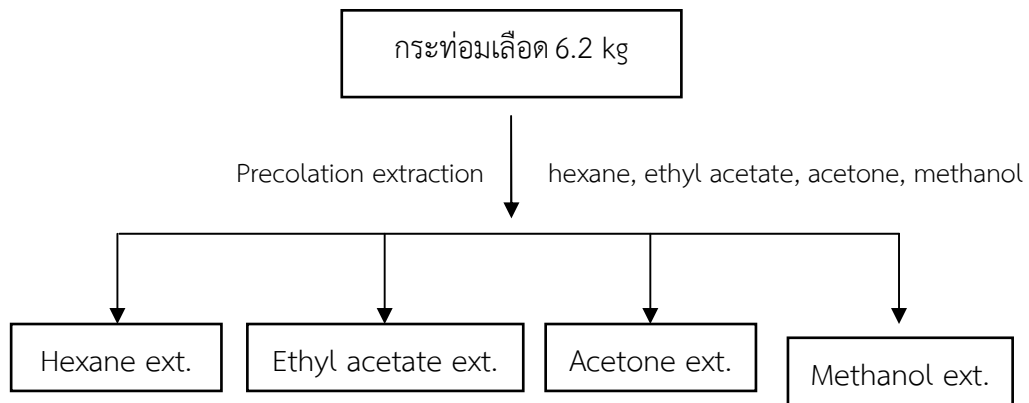
การจุทลอมเหลวของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใช้เครื่องหาจุทลอมเหลวดิจิทัลของ BrÜker 37000 สำหรับการตรวจพิสูจน์หมู่ฟังก์ชันใช้เครื่องอินฟราเรดของ Perkin Elmer System 2000 FT-IR และ JASCO A-032 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เลขคลื่น (cm^{-1}) เป็นหน่วยวัด ในการวัดค่าการหมุนจำเพาะสารบริสุทธิ์ที่มีไครัลคาร์บอนใช้เครื่องโพลาไรมิเตอร์รุ่น JASCO DIP 370 การวัดโครโมฟอร์ของสารบริสุทธิ์ใช้เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสซิเบิล รุ่น 1200 SHIMAZU และบันทึกค่าความยาวคลื่นสูงสุดด้วยหน่วยนาโนเมตร (nm) การวัดมวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรเมตรีโดยใช้เทคนิค EIMS รุ่น Finnigan Mat INCOS 50 และเทคนิค ESI-MS ด้วยเครื่อง BrÜker Esquire สำหรับการวัดชนิดของโปรตอนและคาร์บอนใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ NMR 400 MHz รุ่น BrÜker DPX 400 ในการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรและการตกผลึกใช้ตัวทำละลายที่กลั่นบริสุทธิ์ 5 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอสซิเทต แอซีโตน เมทานอล และเอทานอล ในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ใช้ซิลิกาเจล 60 H (70-230 mesh ASTM, cat. No.7734, E.Merck) การรวมส่วนแยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตตรวจสอบค่าอัตราการไหล (rate of flow, R_f) ด้วยแผ่น TLC อลูมิเนียมที่เคลือบ ซิลิกาเจล PF₂₅₄ (20x30 cm) หนา 0.2 มิลลิเมตร

ตัวอย่างพืช

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยได้นำพืชทั้งหมดไปให้หอพรรณไม้ กรมอุทยาน สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบความถูกต้องซึ่งมีหมายเลข BKF (Bangkok Forest) เป็นสิ่งยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ แหล่งที่มาและรายละเอียดอื่นๆ ของต้นกระท่อมเลือด มีเลข BKF 129958

การสกัดสารจากกระท่อมเลือด (ห้องปฏิบัติการเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มร.ลป.)

การสกัด : นำส่วนรากของกระท่อมเลือด มาตากให้แห้งพร้อมบดละเอียดจำนวน 6.2 กิโลกรัม ใส่ลงในถังกักขนาด 10 ลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนปริมาณ 5 ลิตร แ่จนกว่าตัวทำละลายมีสีเกิดขึ้นประมาณ 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วสารสกัด (crude extract) ขึ้นเฮกเซนที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย (เฮกเซน) ออกไปด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) Buchi รุ่น R-124/V,B-169, B-740/6 สกัดซ้ำด้วยเฮกเซนอีก 5 ครั้งๆละ 3 วัน แล้วนำสารสกัดที่ได้รวมกับครั้งแรก ไปกำจัดเฮกเซนที่ยังติดอยู่เพียงเล็กน้อยออกไปด้วยเครื่องทำแห้งอุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) LABCONCO รุ่น 77500-01 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดชั้นเฮกเซน ดำเนินการสกัดต่อไปโดยใช้ส่วนรากของกระท่อมเลือดที่เคยสกัดด้วยเฮกเซนมาก่อนแล้ว มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายเอทิลแอซีเตต (EtOAc) แอซีโตน (Acetone) และเมทานอล (Methanol) ได้สารสกัด 4 ชั้นตัวทำละลาย ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แผนภาพแสดงสารสกัด 4 ชั้นตัวทำละลาย

การแยก : นำชั้นสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็ง มาแยกแบบหยาบโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (Merck No. 7734, Mesh 70-230 ASTM, 600 g) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ (eluent) จากนั้นค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลแอซีเตตจนกระทั่งใช้ตัวทำละลายเอทิลแอซีเตต 100% เพื่อให้ตัวชะคอลัมน์มีขั้วมากขึ้นจึงผสมเมทานอลลงไปในตัวทำละลายเอทิลแอซีเตตจนกระทั่งใช้เมทานอลความเข้มข้น 100 % สำหรับการเก็บรับสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือน้อยกว่านี้ตามน้ำหนักของสารที่ต้องการแยก เมื่อดำเนินการคอลัมน์สิ้นสุดลงผู้วิจัยนำส่วนแยก (fraction) ที่ได้ไปตรวจค่าอัตราการไหลด้วยแผ่น TLC อลูมิเนียม นำส่วนแยกทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำจะได้ส่วนแยก จากนั้นนำส่วนแยกไปแยกด้วยคอลัมน์ซ้ำอีก ตามด้วย การตกผลึก หรือบางครั้งหากสารมีน้อยกว่า 1 กรัมอาจใช้โครมาโทกราฟีเทคนิคอื่น เช่น โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) เป็นต้น ดังนั้นเมื่อได้สารบริสุทธิ์จึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในลำดับต่อไป

การพิสูจน์โครงสร้าง : โดยภาพรวมจะนำไปหาจุดหลอมเหลวก่อน จากนั้นไปหาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรด สำหรับการหาชนิดของโปรตอนและคาร์บอนตลอดจนความสัมพันธ์ต่างๆต้องนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิค ^1H NMR ^{13}C NMR ทั้ง 1D และ 2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY) มวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ตรวจวัดได้จากแมสสเปกโตรเมทรี นอกจากนั้นเครื่องมือชนิดนี้ยังบอกส่วนไอออนที่แตกออกมา (fragment ions) เพื่อยืนยันส่วนของโครงสร้างได้ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถตกผลึกได้แบบเดี่ยวๆ (single crystal) ก็สามารถตรวจวัด ORTEP diagram จาก X-Rays Diffraction ได้ ถ้าหากสารที่พบบ่อยหรือพบแล้ว (known compounds) ก็จะใช้ฐานข้อมูลวารสารเปรียบเทียบค่าที่ได้จากสเปกโทรสโกปีชนิดต่างๆ

การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มช.)

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 และ HL-60 ถูกเลี้ยงใน RPMI-1640 medium ที่มี fetal bovine serum 10% และมี penicillin G (100 units/ml) streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) และ incubate ในภาวะที่มี CO_2 5% อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ จน confluent 80% จึงนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดคน (peripheral blood mononuclear cells)

เจาะเลือดจากอาสาสมัครปกติ 10 ml โดยใช้ heparin เป็น anti-coagulants เจือจางด้วย PBS เป็น 1:2 ใส่ histopaque 10 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วค่อยๆเติมเลือดที่เจือจางลงไป ปั่น 200 $\times$ g นาน 30 นาที ดูดซีรัมทิ้ง ค่อยๆดูด peripheral blood mononuclear cells ปั่นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง นับเซลล์และใส่เซลล์จำนวน 3×10^3 เซลล์ในแต่ละหลุมของ 96 well plate บ่มที่ CO_2 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และทำการทดสอบด้วยสารบริสุทธิ์จากกระท่อมเลือด

การทดสอบกับสารสกัดกระท่อมเลือด

นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 และ HL-60 มาทดสอบกับสารสกัดกระท่อมเลือด ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยแต่ละ condition ทำ triplicate ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วสังเกตรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast microscope ย้อมด้วย propidium iodide แล้วดูรูปร่างภายใต้กล้อง fluorescence microscope

cytotoxicity test (MTT assay)

ใส่เซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), U937, HL-60 จำนวน 3×10^3 เซลล์ในแต่ละหลุมของ 96-well plate และบ่มกับสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากกระท่อมเลือดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง 100 μl เติมน้ำ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) บ่มนาน 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายออก

หมด แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อไปละลาย formazan crystals วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm ด้วย microplate reader

คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตดังนี้

$$\% \text{ Cell survival} = \frac{\text{O.D of sample}}{\text{O.D. of control}} \times 100$$

การหา mitochondrial membrane potential

เมื่อ treat เซลล์ด้วยสารบรีสุทธีแล้ว บ่มด้วยสาร 40 nM of 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide หรือ DiO₆(3) บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer

การหา caspase-9, caspase-8, caspase-4 activity

เมื่อ treat เซลล์ด้วยสารสกัดและบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นและ resuspend เซลล์ ใน lysis buffer ตัว sample ถูกผสมกับ loading buffer ต้มเป็นเวลา 5 นาที ทำ SDS-PAGE และ electroblot บน nitrocellulose และเมมเบรนถูก block ด้วย 5% nonfat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง และ probe ด้วย monoclonal antibodies ต่อ caspase-4, -8 และ -9 แล้ว incubate ด้วย secondary antibodies conjugated กับ horseradish peroxidase และพัฒนาด้วย enhanced chemiluminescence method

การวัดการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl-2, Apaf-1, Bcl-xL (Western blot)

เก็บเซลล์และล้างด้วย ice-cold PBS และ resuspend ใน S-100 buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA และ mixture of protease inhibitors และบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเซลล์ที่ 10,000 x g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 °C และนำ supernatant ไปปั่นที่ 100,000 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 4 °C Samples ถูกผสมกับ Laemmli's loading buffer ต้มเป็นเวลา 5 นาที run SDS-PAGE 15%, 130 V และ electroblot บน nitrocellulose, 2 h, 100 V และเมมเบรนถูก block ด้วย 5% nonfat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง และ probe ด้วย mouse monoclonal antibodies to Bax, Bcl-2, Apaf-1, BCL-xL แล้ว incubate ด้วย secondary antibodies conjugated กับ horseradish peroxidase และพัฒนา ด้วย enhanced chemiluminescence method

ทดสอบทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA