บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

สมุนไพรและสารเคมี

1. ใบมะรุม เก็บจากพื้นที่ในเขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร และนครปฐม ระหว่าง เดือนเมษายน-พฤษภาคม พ.ศ. 2558
2. สารเคมีในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนี้
    - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) medium จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Fetal bovine serum EU Approved origin จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Non-essential amino acid 100X w/o จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - L-glutamine, Penicillin, Streptomycin จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - PBS buffer (NaCl, KCl, Na_2HPO_4) จากบริษัท Merck ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน
    - HEPES จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Glucose จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - $MgSO_4$, $CaCl_2$ จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - 0.25% Trypsin-EDTA จากบริษัท Gibco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Trypan blue จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Sodium bicarbonate (Analar® BDH; VWR International Ltd.) ประเทศอังกฤษ
    - Sterile Water for Injection (A.N.B. Laboratories CO., Ltd.) ประเทศไทย
    - Dimethyl sulphoxide (DMSO) จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. สารเคมีในงาน Western Blot ดังนี้
    - Micro BCA protein assay kit จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Protein marker จากบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Precast gel for SDS-PAGE จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Enhanced chemiluminescence (ECL) reagent จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - PVDF membranes จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Hyperfilm จากบริษัท GE Healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - NP-40 จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - lysis buffer (Na_3VO_4, NaF) จากบริษัท Sigma-Aldrich® ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Tween 20, Glycine, Tris, Bovine serum albumin จากบริษัท Sigma-Aldrich®

ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ
    - Astragalin จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - Crypto-chlorogenic acid จากบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. แอนติบอดีที่ใช้ จากบริษัท Cell Signaling Technology (CST) ประเทศสหรัฐอเมริกา
    - VEGF-B antibody (#2463)
    - Neuropilin-1 (D62C6) Rabbit mAb (#3725)
    - γ-Tubulin Antibody (#5886)
    - Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (# 7074S)
    - Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (# 7076S)
6. แอนติบอดี VEGF Antibody (#PA5-16754) และ GAPDH Loading Control Antibody, HRP (GA1R) (#MA5-15738-HRP) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. แอนติบอดี anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 546 conjugate จากบริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) จากบริษัท Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO) ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. TLC Silica gel 60 F245 Aluminium sheets 20x20 cm, layer thickness 0.2 mm (Merck, Darmstadt) ประเทศเยอรมัน
10. Whatman No.1 filter paper จาก Merck Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Sodium chloride (UNIVAR®Ajax Finechem; analytical reagent grade)
12. Ethanol absolute (Scharlau® ET0016 analytical reagent grade) ประเทศสเปน
13. Hydrochloric acid (Scharlau® Chemie) ประเทศสเปน
14. Methanol (QRëCTM) ประเทศนิวซีแลนด์
15. Formic acid 98 – 100% (Fisher Scientific, Leicestershire) ประเทศอังกฤษ
16. Glacial acetic acid, ethyl acetate จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
17. เซลล์เพาะเลี้ยง HT29 cells (human colorectal adenocarcinoma cell line) จาก American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. paraformaldehyde จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย
19. Immuno-Mount จากบริษัท ESM ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุอุปกรณ์

1. CAMAG TLC scanner 4, visionCAT (CAMAG, Muttenz, Switzerland)
2. Analytical balance รุ่น CP224S และรุ่น CP3020S บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Autoclave รุ่น LS-2D บริษัท Hirakawa ประเทศไต้หวัน
4. Biohazard รุ่น Bio-II-A บริษัท Telstar ประเทศสเปน
5. Centrifuge tubes จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย

6. CO_2 incubator รุ่น HERA Cell 240 บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน
7. 1.5 ml Eppendorf® tubes (CORNING®; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. 2 ml Cryogenic tube (Sorenson™, BioScience, Inc.) ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. 25 cm^2, 75 cm^2 tissue culture flask (CORNING®; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Flat-bottomed 96-well cell culture plates (costar®; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Fluorescence 96 well plates (Bottom) (costar®; Corning Incorporated) ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Tissue culture 6-well, 24-well, 48-well, 96-well plates บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
13. Tissue culture 96-well plates for fluorescence reading บริษัท Nunc ประเทศ เดนมาร์ค
14. Hemocytometer 0.1 mm deep chamber (BOECO, Germany)
15. Cover Glass Round Diameter 12 mm. จากบริษัท ANH Scientific Marketing Ltd. ประเทศไทย
16. Gel documentation รุ่น MultiGenius บริษัท Syngene สหราชอาณาจักร
17. Protein and nucleic acid gel electrophoresis (MyRUN intelligent electrophoresis unit) บริษัท Cosmobio ประเทศญี่ปุ่น
18. Filtered membrane 0.22, 0.45 μm จากบริษัท Whatman ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Filtered pipet tip ขนาดต่าง ๆ จากบริษัท CLP ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. Fusion™ Universal Microplate Analyzer รุ่น A153601 จากบริษัท Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. Filter Set for Sterilization บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Fluorescent Inverted Microscope รุ่น ECLIPSE TE 2000-U บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น
23. Hot Air Oven รุ่น EED บริษัท WTB Binder ประเทศเยอรมัน
24. High Speed Centrifuge รุ่น Biofuge Stratos บริษัท Sorvell ประเทศเยอรมัน
25. Incubator รุ่น 1050-1400 บริษัท Contherm Scientific Ltd ประเทศนิวซีแลนด์
26. Magnetic stirrer จากบริษัท Framo ประเทศเยอรมัน
27. Microcentrifuge รุ่น Spectrafuge 16M บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
28. Micropipette จากบริษัท Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. pH Meter รุ่น PP15 บริษัท Sartorius ประเทศสหรัฐอเมริกา
30. Shaking incubator รุ่น 3031 บริษัท GFL ประเทศเยอรมัน
31. Spectrophotometer รุ่น Gene Ray บริษัท Biometra สหราชอาณาจักร
32. Liquid nitrogen tank -179°C
33. Speed vacuum รุ่น Dyna Vap V1000 บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
34. Vortex mixer บริษัท Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา
35. Rotary evaporator (Buchi R205) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีทำการวิจัย

ตอนที่ 1: การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุมและการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

1. การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุม

1) เก็บตัวอย่างใบมะรุมสด ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา ตากแห้งกลางแดดจัดภายในวันที่เก็บตัวอย่าง เก็บในที่แห้ง ที่อุณหูมิห้อง
2) บดตัวอย่างใบมะรุมแห้งให้ละเอียดจนเป็นผง
3) ชั่งผงใบมะรุมแห้งที่ผ่านแร่ง 20 mesh แล้วจำนวน 100 กรัม
4) ทำการสกัดด้วย 70% ethanol 2,000 ml เป็นเวลา 3 วัน โดยในระหว่างวันทำการเขย่าภาชนะที่ใช้สกัดเป็นระยะ เมื่อครบเวลากรอง นำสารสกัดที่ได้มารวมกัน แล้วระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันให้เข้มข้น
5) กากผงพืชที่เหลือนำไปสกัดซ้ำเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ระเหยเข้มข้นทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน โดยผสมให้เนื้อสารสกัดเข้ากัน แล้วระเหยให้แห้งบนหม้ออังไอน้ำ
6) สังเกตสารสกัดจากการระเหยแห้งว่าเยิ้มเหลวหรือไม่ และเมื่อสังเกตไม่พบร่องรอยตัวทำละลายแล้วทำการระเหยแห้งบนหม้ออังไอน้ำ ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 วันจนแน่ใจว่าสารสกัดแห้งสนิท
7) จากนั้นชั่งหา % yield ของสารสกัดหยาบ

2. การหาปริมาณสาร astragalin และ crypto-chlorogenic acid ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (Vongsak และคณะ, 2013)

2.1 การเตรียม stock solution ของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

เตรียม stock solution ของ astragalin และ stock solution ของ crypto-chlorogenic ความเข้มข้น 10 mg/ml ใน dimethylsulfoxide (DMSO)

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

เตรียมสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากันของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid เท่ากับ 100 µg/ml โดยปิเปต stock solution ของ a**stragalin และ** stock solution ของ crypto-chlorogenic acid อย่างละ 10.0 µl และเติม 50% methanol จำนวน 980.0 µl

เตรียมสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากันของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid เท่ากับ 50 µg/ml โดยปิเปตสารละลายผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 100.0 µl และเติม 50% methanol จำนวน 100.0 µl

นำสารละลายผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 50 µg/ml ไป spot บนแผ่น TLC โดยแต่ละจุด spot จำนวน 1 µl (n=6)

นำสารละลายผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml ไป spot บนแผ่น TLC โดยแต่ละจุด spot จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 µl (n=6) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณ a**stragalin,** crypto-chlorogenic acid (ng/spot) และ สารสกัด (µg/spot) เมื่อ spot บนแผ่น TLC

ความเข้มข้นของสารละลายผสม a**stragalin,** crypto-chlorogenic acid	จำนวน µl ที่ spot	ปริมาณ a**stragalin,** crypto-chlorogenic acid ต่อจุด (ng/spot)
50 µg/ml	1	50, 50
100 µg/ml	1	100, 100
	2	200, 200
	3	300, 300
	4	400, 400
	5	500, 500
สารสกัด 50 mg/ml	1	50 µg/spot

2.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัด (ความเข้มข้น 50 mg/ml) หากมากไปลดลง

ชั่งสารสกัด 500 mg ใน volumetric flask ขนาด 10.0 ml ละลาย และปรับปริมาตรด้วย 50% methanol ทำการกรองสารละลายด้วย 0.45 mm nylon membrane ก่อนนำไป spot

2.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

1) นำแผ่น TLC ไป develop โดยใช้ methanol เป็น mobile phase

2) นำแผ่น TLC ที่ develop แล้วในข้อ 1 ไปอบที่ 105°C นาน 15 นาที เก็บแผ่น TLC นี้ไว้ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานและทำการวิเคราะห์ปริมาณสารในสารสกัด

3) ทำการ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 50 µg/ml จำนวน 1 µl (n=7) ด้วย microcapillary pipette ขนาด 5 µl ลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x20 cm (n=7)

4) ทำการ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 µl (n=7) ด้วย microcapillary pipette ขนาด 5 µl ลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x20 cm (n=7)

5) นำแผ่น TLC ไป develop โดยใช้สารละลายผสมของ ethylacetate : formic acid : acetic acid : water สัดส่วนโดยปริมาตร (v/v/v/v) เท่ากับ 34 : 3.5 : 1.5 : 7 เป็น mobile phase

หมายเหตุ

ข้อ 3) และ ข้อ 4) ทำต่อเนื่องกันดังนี้ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 50 µg/ml จำนวน 1 µl แล้วตามด้วยทำการ spot สารละลายมาตรฐานผสมของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ความเข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 µl

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารในสารสกัด

1) บนแผ่น TLC เดียวกับที่วิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของ **astragalin และ** crypto-chlorogenic acid โดยทำการ spot สารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 50 mg/ml จำนวน 1 µl (n=8), ทำพร้อมกับสารมาตรฐาน)

2) นำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop ไปตรวจวัดพื้นที่ใต้กราฟของสารภายใต้สภาวะ ดังนี้ ความยาวคลื่น 340 nm

Silt dimension 5.00x0.45 mm

Scan speed 20 mm/s

3) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานและของสารละลายสารสกัดมาสร้างกราฟมาตรฐานของ **astragalin และ** crypto-chlorogenic acid

4) หาปริมาณของ a**stragalin และ** crypto-chlorogenic acid ในสารละลายสารสกัดจากพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสองในสารละลายสารสกัด โดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน

ตอนที่ 2: การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบมะรุม, astragalin และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ HT29 cells (human colorectal adenocarcinoma cell line) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C, ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Medium) เซลล์ถูก passage ทุก ๆ 3-5 วันด้วย spit ratio 1:5 ถึง 1:10

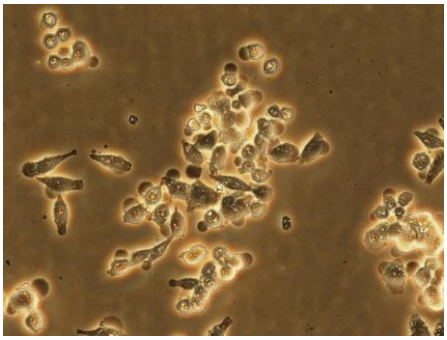
1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

นำ fetal bovine serum (FBS) มา incubate ที่ 56°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที นำผงอาหารเลี้ยงเซลล์ละลายใน sterile water for injection ปริมาตรประมาณ 950 ml คนให้ละลาย เติม $NaHCO_3$ ประมาณ 2.2 g DMEM เพื่อปรับ pH ให้น้อยกว่า pH ที่จะใช้เลี้ยงเซลล์ (7.4) ลงไป 0.2-0.3 หน่วย pH จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน แล้วเติม L-Glutamine, Non-essential Amino Acids, FBS และ penicillin G/streptomycin เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%, 1%, 10% v/v และ 0.1% ตามลำดับ เพื่อเตรียมเป็น complete medium

1.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

1) ใน TC-flasks นำเซลล์ที่ thaw แล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเปลี่ยน medium สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง พร้อมทั้งตรวจสอบการเจริญเติบโต การปนเปื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope (รูปที่ 2)
2) นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่โต 70-90% confluence (เลี้ยงประมาณ 24-30 h) ทำการ subculture ด้วย 0.25% trypsin-EDTA solution ถ่ายใส่ใน plate 96- หรือ 6-well plate ตามต้องการ

HT29 cells



รูปที่ 2 แสดง HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ภายหลัง subculture และเลี้ยง 24 h (image 10 × objective using an inverted microscope)

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบมะรุม, astragalin และ crypto-chlorogenic acid ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT 29 cells) ด้วย MTT assay

นำเซลล์ HT29 cells ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเจริญประมาณ 70-90% โดยใช้เซลล์จำนวน $2X10^4$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ถ่ายใส่ 96 well-plates และ pre-incubated เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ จากนั้นเติมสารสารสกัดใบมะรุม (ช่วงความเข้มข้น 0-500 µg/ml), astragalin (ช่วงความเข้มข้น 0-0.5 mM หรือ 0-224 µg/ml) และ crypto-chlorogenic acid (ช่วงความเข้มข้น 0-0.5 mM หรือ 0-177 µg/ml) สารสกัดใบมะรุม, astragalin และ crypto-chlorogenic acid ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1, 1.7 และ 2.2% ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีกลุ่มควบคุมเป็น DMSO ที่ความเข้มข้น 1, 1.7 และ 2.2% ด้วยซึ่ง 3 กลุ่มของ DMSO เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ

จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 6 h, 12 h, 24 h และ 48 h จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง นำเซลล์มาผสมกับ MTT 20 µl (0.5 mg/ml MTT in DMEM) เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายให้ดูดสารละลายตัวกลางออกแล้วละลาย formazan crystal ด้วย DMSO 100 µl ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative cell viability) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{[OD]_{test} - [OD]_{DMSO}}{[OD]_{control} - [OD]_{DMSO}} \times 100$$

การทดลองทุกสารและทุกความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate culture)

เมื่อได้ผล % cell viability นำไป plot กราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ จากนั้นทดสอบความแตกต่างของ % cell viability ระหว่างกลุ่มควบคุมที่เป็น DMSO และกลุ่มที่ไม่ได้เติมสารใด ๆกับกลุ่มทดลอง (สารที่เติม) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มากที่สุด

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดใบมะรุมที่ต้องการใช้ นำไปคำนวณหาปริมาณของสาร สำคัญที่เป็นองค์ประกอบทั้งสอง จากการวิเคราะห์ในตอนที่ 1 (ข้อ 2.5) เพื่อนำไปใช้ในตอนที่ 3 และ 4ต่อไป

ตอนที่ 3: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Immunoblotting เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

นำเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 หลังจากที่ subculture แล้วมาเลี้ยงใน tissue culture flask ขนาด 25 cm^2 (T-25 flask) โดยใช้เซลล์ 2 X 10^5 cells/flask เพาะเลี้ยงที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h ให้ได้เซลล์ที่ 65-70% confluence ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็น DMEM แล้วเติมสารสกัดจากใบมะรุมให้ได้เข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 µg/ml สำหรับสารมาตรฐาน astragalin และ crypto-chlorogenic acid จะใช้ในความเข้มข้นที่คำนวณได้เทียบเท่ากับที่ควรจะมีในสารสกัดจากใบมะรุม 100-570 µg/ml (ในที่นี้คำนวณได้เป็น astragalin 2.00 µg/ml คิดจากสารสกัด 570 µg/ml และ crypto-chlorogenic acid 0.84 µg/ml คิดจากสารสกัด 100 µg/ml) จากนั้นนำ ไปบ่มที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h และ 48 h โดยใช้ 1% DMSO เป็น negative control และใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml ซึ่งทั้งสองสารเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้กันในปัจจุบัน เป็น positive control

เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วดูด PBS ทิ้งให้มากที่สุด จากนั้นทำให้เซลล์แตกที่อุณหภูมิ 4°C (on ice) ด้วย 1 mM Na_3VO_4 ที่ ผสม 1 mM NaF ปริมาตรไม่เกิน 40 µL เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ micropipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์แตกหมด แล้วปลดปล่อย cytosol ออกมาภายนอก ดูดสารทั้งหมดใน flask รวบรวมถ่ายลง microcentrifuge tube

นำ cell lysate ไปแยกส่วนใสด้วยการปั่นที่ 13,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 min หลังจากนั้นเก็บส่วนใสไว้

แบ่งส่วนใสปริมาตร 2 µl เติมน้ำอีก 18 µL (1:10) เพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA Protein Assay (ใช้ microplate reader) ตามวิธีที่ระบุจากบริษัท

จากนั้นนำโปรตีนปริมาณ 25-30 µg มาเติม SDS sample buffer แล้วนำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 min จากนั้นนำมา cool down บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 min

นำตัวอย่างโปรตีนที่ได้มาแยกด้วย 10% gel SDS-PAGE ที่ 110 volts เป็นเวลา 90 min

ภายหลังการ run แยก gel ออกมาแล้ว นำไปทำ transfer ลง PVDF membrane ในขั้นตอนการ blotting ใช้เวลาประมาณ 3 h เมื่อสิ้นสุด นำแผ่น membrane มาล้างด้วย TBS-T 2 ครั้ง แล้วเติม blocking buffer (5% w/v BSA ใน TBS-T) ทำการ block 2 ครั้ง เติม primary antibody (VEGF-A 1:200, VEGF-B 1:1000, neuropilin-1 1:1000, γ-tubulin 1:1000, GAPDH 1:7500) แช่ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C

จากนั้นนำแผ่น membrane มาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง เติม secondary antibody (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 1:10000 หรือ Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody 1:10000) แช่ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 h จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง

นำแผ่น membrane มา detect หาโปรตีนโดยเติม ECL reagent แช่ประมาณ 1 min นำ membrane ออก ซับน้ำออกทำให้พอแห้ง ห่อด้วยพลาสติก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นนำไปทาบกับแผ่น x-ray film ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำ x-ray film ไปล้าง และนำไปอ่านค่าด้วยโปรแกรม ImageJ®

ตอนที่ 4: การทดสอบผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ neuropilin-1ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี immunocytochemistry เปรียบเทียบกับ astragalin และ crypto-chlorogenic acid

นำเซลล์เพาะเลี้ยง HT29 หลังจากที่ subculture แล้วมาเลี้ยงใน 6-well plate โดยใช้เซลล์ 2 X 10^4 cells/flask เพาะเลี้ยงที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h ให้ได้เซลล์ที่ 65-70% confluence ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนเป็น DMEM แล้วเติมสารสกัดจากใบมะรุมให้ได้เข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 µg/ml, astragalin 4.55 µM หรือ 2.04 µg/ml และ crypto-chlorogenic acid 2.47 µM หรือ 0.85 µg/ml จากนั้นนำ ไปบ่มที่ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 95%, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 h และ 48 h โดยใช้ 1%DMSO เป็น negative control และใช้ adriamycin 0.1 µg/ml และ cisplatin 125 µg/ml ซึ่งทั้งสองสารเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้กันในปัจจุบัน ใช้เป็น positive control

เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว fix ด้วย 10% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม blocking buffer (1X PBS ที่เติม 5% FBS) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 h เมื่อครบเวลาดูด blocking buffer ออกเติม primary antibody (VEGF-A 1:100, VEGF-B 1:100, neuropilin 1:250) แล้วล้างออกด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติม second antibody (anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 546 conjugate 1:2000) บ่มเป็นเวลา 1 h ในที่มืด จากนั้นสังเกตการเรืองแสงของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

สถิติที่ใช้

สำหรับการทดลองในตอนที่ 2 ในแต่ละการทดลองทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± standard deviation (SD) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA)

สำหรับการทดลองในตอนที่ 3-4 ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 2 ครั้ง ผลการทดลองไม่สามารถรายงานเป็นค่าเฉลี่ยได้