บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation)
2. CO_2-incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific)
3. Flow cytometer (BD Biosciences)
4. Larminar air flow (Heal Force®)
5. Liquid nitrogen tank (Taylor Wharton)
6. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter)
7. pH meter (Mettler-Teledo)
8. PVDF membrane (Pierce)
9. Vertical gel electrophoresis (Model Mini-Protean Tetra Cell, Biorad laboratory)

สารเคมี

1. Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences)
2. Anti-human Bcl-2 (Cell signaling technology)
3. Anti-human Bax (Cell signaling technology)
4. BCA protein assay kit (Pierce)
5. Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F-12, Sigma)
6. EnzChek® caspase-3 assay kit (Invitrogen)
7. Fetal bovine serum (FBS, Gibco)
8. Goat anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase (Cell signaling)
9. Penicillin/Streptomycin (Gibco)
10. Triazolyl tetrazolium bromide (MTT, Amresco)
11. 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco)
12. สารเคมีอื่นๆซื้อจาก Sigma chemical Co. (St. Louis, Mo)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

เก็บตัวอย่างสมุนไพร โดยบันทึกแหล่งที่เก็บและทำตัวอย่างพืชแห้ง (voucher specimen) ไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ PBM Herbarium มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้ในการอ้างอิงและตรวจสอบชื่อพืชต่อไป การเตรียมสารสกัดสมุนไพร โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการสกัดมาบดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C การสกัดจะใช้การหมักสมุนไพรแห้งด้วย methanol เป็นเวลา 3 วัน และผ่านกระบวนการกรอง จากนั้นระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา คือ SW480 human colon carcinoma cells ซึ่งได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^{3} ในตู้ CO_2-incubator ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C และ 5% CO_2 หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนจนเกือบเต็มพื้นของขวดเลี้ยงเซลล์ (90-95% confluent) จึงทำการ subculture โดยการลอกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ (detach) ด้วย 0.25% trypsin ใน Ca^{2+}, $Mg2^{+}$free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA โดยใช้ split ratio 1:4 ในทุกๆ 3-4 วัน และจะเริ่มนับเป็น passage ที่ 1 และเริ่มแบ่งเก็บเซลล์แช่แข็ง (freeze cell)เมื่อเซลล์อยู่ใน passage ที่ 5 ซึ่งเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะเริ่มใช้ในช่วงของ passage ที่ 10 – 20

3. การวัดการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability determination)

3.1 MTT assay

ทำการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SW480 โดยการวัดด้วยวิธี MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide), MTT] โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10^{4} เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน ตู้ CO_2 – incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 µl ของ MTT (5 mg/ml ใน PBS) ใน 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการทดสอบ จึงนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม 200 [µl DMSO : EtOH (1:1)] และ incubate ที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย spectrophotometer

3.2 Crystal violet staining assay (Sharma et al., 2009)

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SW480 สามารถวัดโดยตรงด้วยวิธีย้อมเซลล์ด้วย crystal violet [11] จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10^{4} เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลง

ไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 4% formaldehyde จำนวน 100 µl เป็นเวลา 1 ชม. และล้างเซลล์ด้วย PBS ก่อน 1 ครั้ง แล้วจึงเติม crystal violet dye (0.02% ใน 2% ethanol) จำนวน 100 µl เป็นเวลา 30 นาที และทำการล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นก่อนเติม 10% acetic acid จำนวน 100 µl และนำ plate ไป incubate ที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วย spectrophotometer

3.3 Lactate dehydrogenase (LDH) activity

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ด้วยวิธี LDH assay โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 1×10^{4} เซลล์ ต่อ well ใน 96-wells cell culture plate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเก็บ 100 µl ของอาหารเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณของเอนไซม์ LDH ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเติม 150 µl mixing reagent [20 mM Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), Soduim pyruvate และ PBS pH7.4 ในอัตราส่วน 1:1:3] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและติดตามการลดลงของ NADH ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm โดยวัดเป็น kinetics ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4 การวัด cell apoptosis ด้วย flow cytometer

ทำการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยชุดทดสอบ annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Bioscience) โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^{6} เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นเซลล์ที่พื้นจานเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS buffer 1 ครั้ง และลอกเซลล์โดยใช้ด้วย 0.25% trypsin/EDTA จากนั้นทำการกระจายเซลล์ด้วย 100 µl 1Xbinding buffer และนำเซลล์มาย้อมด้วยสี annexin V-FITC และ propidium Iodide (PI) จากนั้นวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer และทำการแปลผลโดยใช้โปรแกรม CellQuestPro software (ตารางที่ 1)

ตาราง 1 การวิเคราะห์ผลของเซลล์ที่ย้อมด้วย annexin V-FITC และ PI ภายหลังการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

ชนิดของเซลล์	Annexin V-FITC	PI
เซลล์มีชีวิต (Viable cells)	- ve	- ve
เซลล์ที่ตายแบบ apoptotis ระยะแรก (Early apoptotic cells)	+ ve	- ve
เซลล์ที่ตายแบบ apoptotis ระยะสุดท้าย (Late apoptotic cells)	+ ve	+ ve
เซลล์ที่ตายแบบ necrosis	- ve	+ ve

5. การวัด caspase-3 activity

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ที่พบการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์มีการตายแบบ apoptosis ด้วยชุดทดสอบ EnzChek® Caspase-3 Assay Kit โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ล้างเซลล์ด้วย PBS และทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (200 mM Tris pH7.5, 2 M Nacl, 20 mM EDTA, 0.2% Triton™ X-100) จากนั้นปั่นเก็บส่วน supernatant และวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit (Pierce) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหา caspase-3 activity ต่อปริมาณโปรตีน จากนั้นเติม cell lysate จำนวน 25 µl และ caspase-3 substrate working solution (rhodamine 110 bis-(*N*-CBZ-L-aspartyl-Lglutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide, Z-DEVD–R110) จำนวน 25 µl จากนั้นวัดค่า fluorescence ของ rhodamine 110 (R110) ด้วย spectrophotometer ที่ excitation 485 nm และ emission 535 nm

6. การวัดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax

ทำการเลี้ยงเซลล์ SW480 จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60-mm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F-12 ที่มีสารสกัดเถาวัลย์เปรียงลงไป โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเท่ากับ 2.5, 5 และ10 µg/ml ซึ่งละลายใน DMSO เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเซลล์) และใช้ 0.25% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นล้างด้วย PBS buffer แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย M-PER® lysis buffer (Pierce) จากนั้นปั่นเก็บส่วน supernatant และวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit จากนั้นนำโปรตีนปริมาณ 20 µg มาทำการแยกโดยใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และย้ายโปรตีนจาก gel ลงบนแผ่น polyvinylidene difluoride (PVDF membrane) จากนั้นทำการ block non-specific binding ด้วย 5% skim milk เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง membrane ด้วย

0.05% Tween ใน Tris buffer pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และนำ membrane มาเติม primary antibody: anti-Bcl-2 หรือ anti-Bax ที่ dilution 1:2000 ก่อนจะบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นล้าง membrane ด้วย 0.05% Tween-TBS pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จึงเติม secondary antibody: goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (AP) ที่ dilution 1:10,000 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. และล้าง membrane ด้วย 0.05% Tween-TBS pH 7.6 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นตรวจแถบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 หรือ Bax โดยเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphatase

7. วิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม