บทที่ 3

การทดลอง

1. สารเคมี

1. Absolute ethanol
2. Hexane
3. Ethyl acetate
4. Butanol
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
6. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
7. Fetal Bovine Serum (FBS)
8. Penicillin/Streptomycin
9. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
10. 0.05%Trypsin EDTA
11. Phosphate buffer saline (PBS) without Ca and Mg
12. Phosphate buffer saline (PBS) with Ca and Mg
13. Cell proliferation reagent (WST-1)
14. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
15. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
16. Sodium chloride (NaCl)
17. Potassium chloride (KCl)
18. Tris-Bse
19. Triton X100
20. Crystal violet solution

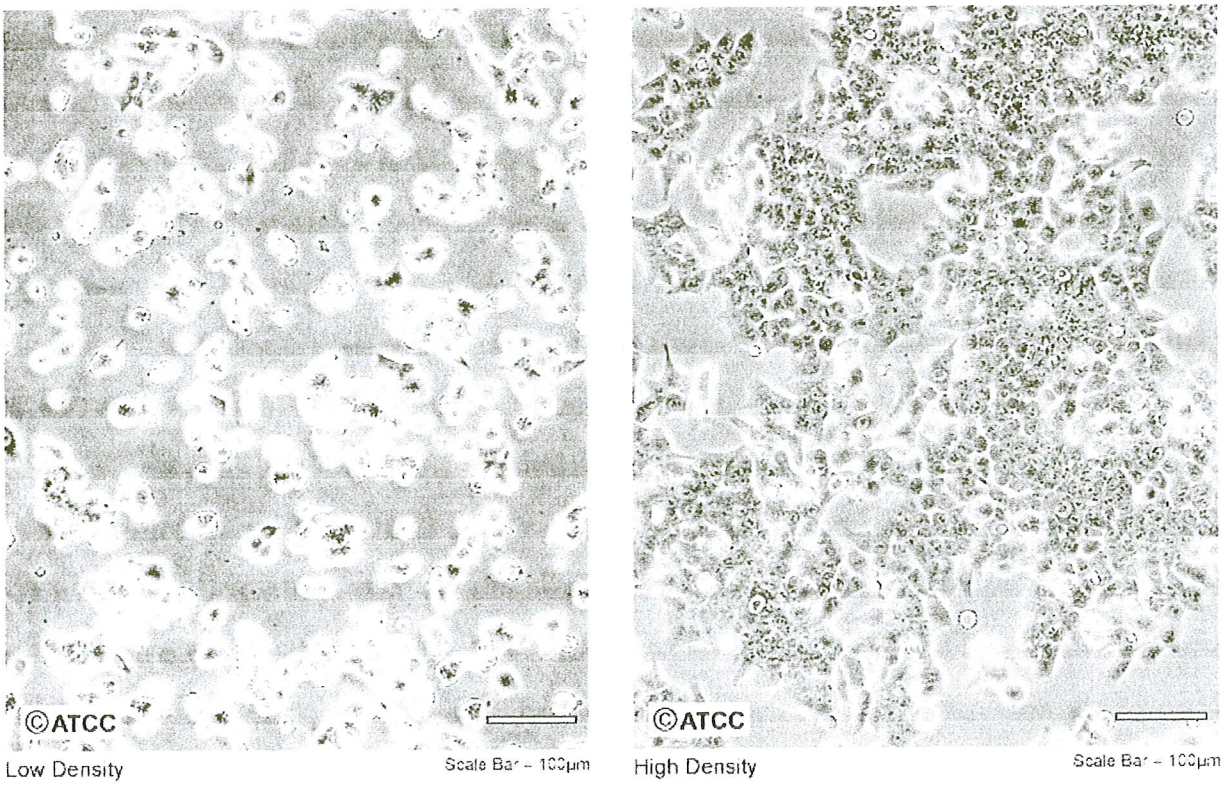
2.เซลล์มะเร็ง

2.1 Colorectal carcinoma cell line HCT 116 แสดงข้อมูลพื้นฐานของเซลล์มะเร็งจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC)

ATCC® Number	CCL-247™
สถาบัน	ATCC
Cell type	Colorectal carcinoma

Growth properties	adherent
Organism	*Homo sapiens* (human)
Organ	Colon
Incubation	37 °C with 5% CO_2

ATCC Number: **CCL-247**
Designation: **HCT 116**



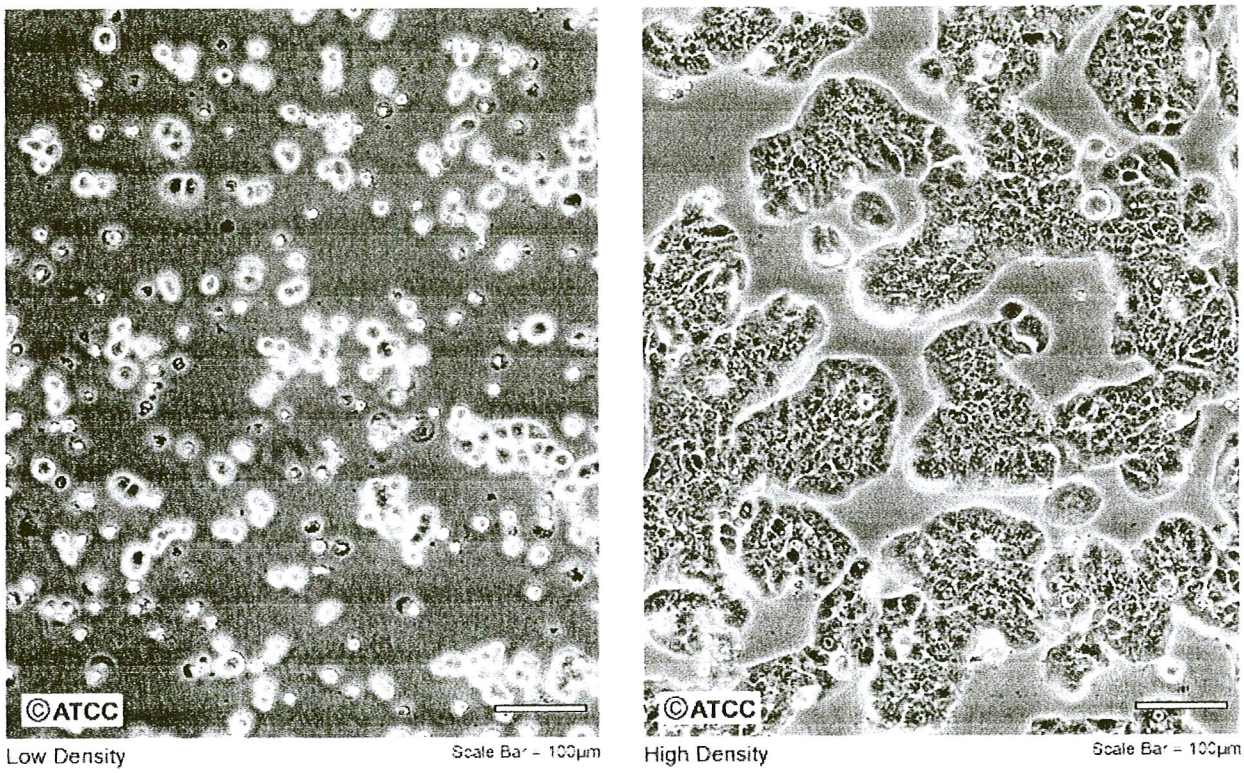
รูปที่ 1 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116

2.2 Colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 แสดงข้อมูลพื้นฐานของเซลล์มะเร็งจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC)

ATCC® Number	HTB-38™
สถาบัน	ATCC
Cell type	Colorectal adenocarcinoma
Growth properties	adherent
Organism	*Homo sapiens* (human)
Organ	Colon

Incubation 37 °C with 5% CO_2

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**



รูปที่ 2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29

3.อุปกรณ์

1. เครื่องระเหยภายใต้การลดความดัน (rotary evaporator)
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวหลับ (inverted microscope)
3. ตู้บ่มชนิดมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow hood)
5. หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (autoclave)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (centrifuge)
9. ตู้แช่แข็ง (freezer)
10. Microplate reader (96-well plates reader UV-Visible spectrophotometer)
11. Soxhlet's apparatus
12. Separation funnel

13. Vertical shaker
14. Multichannel pipette
15. 96-well plates
16. Disposable seropipette
17. Pipette aid
18. Water bath

4.วิธีทดลอง

4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบของสมุนไพรในวงศ์รูตาซิอี

ตัวอย่างเนื้อไม้มะกรูด ส้มโอ เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ตัวอย่างเนื้อไม้หัสคุณ มะข่วง มะแขว่น เก็บตัวอย่างมาจากอำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง ตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดถูกนำมาเปรียบเทียบกับ specimen ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างสมุนไพรถูกนำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กลง นำมาทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

ตัวอย่างผงพืชสมุนไพรตัวอย่าง 500 กรัม

⇓

สกัดด้วยเอทานอล 5 ลิตร ด้วยเทคนิค Soxhlet's extraction นาน 48 ชั่วโมง

⇓

ระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันต่ำ

⇓

สารสกัดหยาบของสมุนไพรตัวอย่าง

⇓

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ คำนวณหา %Yield

เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดกันแสงและเก็บในตู้เย็น

⇓

ทดสอบการยับยั้งการเกาะติดและความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 และ HT-29

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 ก.ย. 2554
242615

4.2 การเตรียมสารสกัดแยกส่วน (fraction) จากสารสกัดหยาบ

หลังจากคำนวณหาค่า %yield ของสารสกัดหยาบแล้ว นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการสกัดแยกส่วนดังนี้

สารสกัดหยาบน้ำหนัก 100 กรัม

⇓

สกัดแยกส่วนด้วย Hexane 500 ml, Ethyl acetate 500 ml,
Butanol 500 ml และ Aqueous 500 ml ตามลำดับ

⇓

ชั่งน้ำหนักสารสกัดแยกส่วนที่ได้ คำนวณหา %Yield
เก็บสารสกัดแยกส่วนที่ได้ในขวดกันแสงและเก็บในตู้เย็น

⇓

ทดสอบการยับยั้งการเกาะติดและความเป็นพิษ
ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 และ HT-29

4.3 การเตรียมเซลล์มะเร็งสำหรับการทดลอง

4.3.1 การเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HCT 116 และ HT-29 ในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Complete D-MEM แล้วนำภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้อบชนิดมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดจะเรียงตัวเป็น monolayer ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแล้วพบว่าเซลล์มะเร็งมีการเจริญและแบ่งตัวในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์แล้ว 60-80%

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (cell survival measurement) มีหลายวิธี โดยวิธีที่ได้รับความนิยมใช้คือ colorimetric MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide] assay อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของ MTT โดยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ซึ่งหลังจาก MTT ผ่านเข้าสู่ mitochondria ของเซลล์แล้วจะถูกรีดิวซ์ (reduce) ด้วยเอนไซม์ดังกล่าวเกิดเป็นผลึก formazan สีม่วงที่ไม่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ (insoluble purple formazan crystal) จากนั้นต้องทำการละลายผลึกสีม่วงที่ได้ด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) sodium dodecyl sulphate (SDS) ใน phosphate buffer saline (PBS) เป็นต้น หลังจากละลายผลึกสมบูรณ์แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

microphate reader UV-spectrophotometer การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ MTT โดยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase จะเกิดในเซลล์ที่มีขบวนการเมแทบอลิซึมเท่านั้น วิธีการดังกล่าวจึงสามารถนำไปใช้วัดระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ เนื่องจากขบวนการรีดักชันของ MTT จะไม่พบในเซลล์ที่ตายแล้ว แต่จากการศึกษาของ Berridge และคณะ (1996) พบว่าการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ MTT นั้นจำเป็นต้องอาศัย reduced pyridine nucleotide โดยที่ succinate ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอนในปฏิกิริยารีดักชันของ MTT ผ่านเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase แต่ปฏิกิริยารีดักชันดังกล่าวเกิดขึ้นช้าและมีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยกับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ MMT ทั้งหมดในเซลล์ ทั้งยังต้องการการละลายของ formazan จึงจะสามารถวัดค่าได้ (Ngamwongsatit et al., 2008) ดังนั้นในการการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงครั้งนี้ จึงทำการวัดจำนวนของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตอยู่จากการใช้ Cell proliferation reagent (WST-1) ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ MTT แต่ไม่จำเป็นต้องอาศัยตัวทำละลายผลึก formazan เหมือนกับการใช้ MTT ทั้งยังเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า MTT และสีที่เกิดขึ้นยังมีความคงตัวนานกว่า 12 ชั่วโมง ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29 และ HCT 116 สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงโดยใช้ cell proliferation reagent WST-1 ดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HT-29 จำนวน 10,000 cells/well
และ HCT 116 จำนวน 5,000 cells/well ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

บ่มสารละลายสารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วนในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10-200 μg/ml
กับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HT-29 และ HCT 116 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

⇓

เติม Cell Proliferation Reagent WST-1 จากนั้นนำ Plate ไปบ่มใน
CO_2 Incubator ต่อเป็นเวลา 45 นาที

⇓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร

⇓

คำนวณหา 50% Inhibition concentration

การทดสอบการยับยั้งการเกาะติดของเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HT-29 จำนวน 10,000 cells/well
และ HCT 116 จำนวน 5,000 cells/well ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

บ่มสารละลายสารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วนในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10-200 μg/ml
กับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HT-29 และ HCT 116 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

⇓

เติม Paraformaldehyde เพื่อทำการตรึงเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 15 นาที

⇓

เทสารละลายทั้งหมดออก จากนั้นล้างด้วย Phosphate buffer saline
ปริมาตร 100 μl จำนวน 1 ครั้ง

⇓

เติมสารละลาย Cristal Violet ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที

⇓

ล้างด้วย Phosphate buffer saline
ปริมาตร 100 μl จำนวน 2 ครั้ง

⇓

เติม Triton X100 ปริมาตร 50 μl
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

⇓

นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

⇓

คำนวณหา 50% Inhibition concentration