บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

Human T lymphoblast (acute lymphoblastic leukemia, ALL) suspension (MOLT-4) Lot/ PASSAGE 36 Lot 3 00115-610 (CLS, Germany)

3.2 สมุนไพร

ชื่อสมุนไพร : ยอ (*Morinda citrifolia* Linn.)

ส่วนที่ใช้ในการสกัด : ใบ

แหล่งที่มา : จังหวัดลำพูน

ช่วงเวลาในการเก็บ : มีนาคม 2553

3.3 สารเคมี

(1) Acetic acid (J.T.Baker, Thailand)

(2) Concanavalin A (Sigma, USA)

(3) Dimethylsulfoxide; DMSO (Sigma #D8418, Singapore)

(4) Ethyl alcohol (RCI Labscan, Thailand)

(5) Fetal bovine serum (Sorali, Brazil)

(6) Interferon-γ (Prepotech, USA)

(7) Interferon-γ ELISA Kits (Prepotech, USA)

(8) Interleukin-10 (Prepotech, USA)

(9) Interleukin-10 ELISA Kits (Prepotech, USA)

(10) Kaempferol (Sigma, USA)

(11) Methyl alcohol (RCI Labscan, Thailand)

(12) Phosphate buffer saline (PBS) solution (Sigma, USA)

(13) Quercetin (Sigma, USA)

(14) RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma, USA)

(15) Rutin (Sigma, USA)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

(1) 0.2, 0.45 μm nylon syringe filter (Altech Associates, Inc., USA)

(2) 24-well cell culture plate (Nunc, Denmark)

(3) 25-cm^3 cell culture flask (Nunc, Denmark)

(4) 96-well cell culture plate (Nunc Maxisorp flat-bottom, Nunc, Denmark)

(5) Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)

(6) Centrifuge (Z230A, Hermle, Germany)

(7) Centrifuge tube (Neptune, USA)

(8) CO_2 Incubator (3121, Forma Scientific.Inc., USA)

(9) Hemocytometer & cover slip (Boeco, Germany)

(10) High-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)

- Pump (LC-20 AT, Shimadzu, Japan)
- UV Detector (SPD-20 A, Shimadzu, Japan)
- System Controller (Model SPD-20 A, Shimadzu, Japan)
- Autosample (SIL-10ADVp, Shimadzu, Japan)
- Oven (CTO-10ASVp, Shimadzu, Japan)

(11) Hot air oven (Designer series, Contherm Scientific Ltd., New Zealand)

(12) HPLC column Lichrosphere 100 RP-18 column (250 x4 mm i.d., 5 μ° particle size) (Phenomenex, USA)

(13) Inverted microscope (Nikon, Japan)

(14) Laminar airflow cabinet (1185, Forma Scientific.Inc., USA)

(15) Micropipette (Rainin, USA)

(16) Microplate reader (DTX880, Beckman coulter, Austria)

(17) Microprocessor control freeze-dryer (Dura-stopTM uP, FTS Systems, Inc., USA)

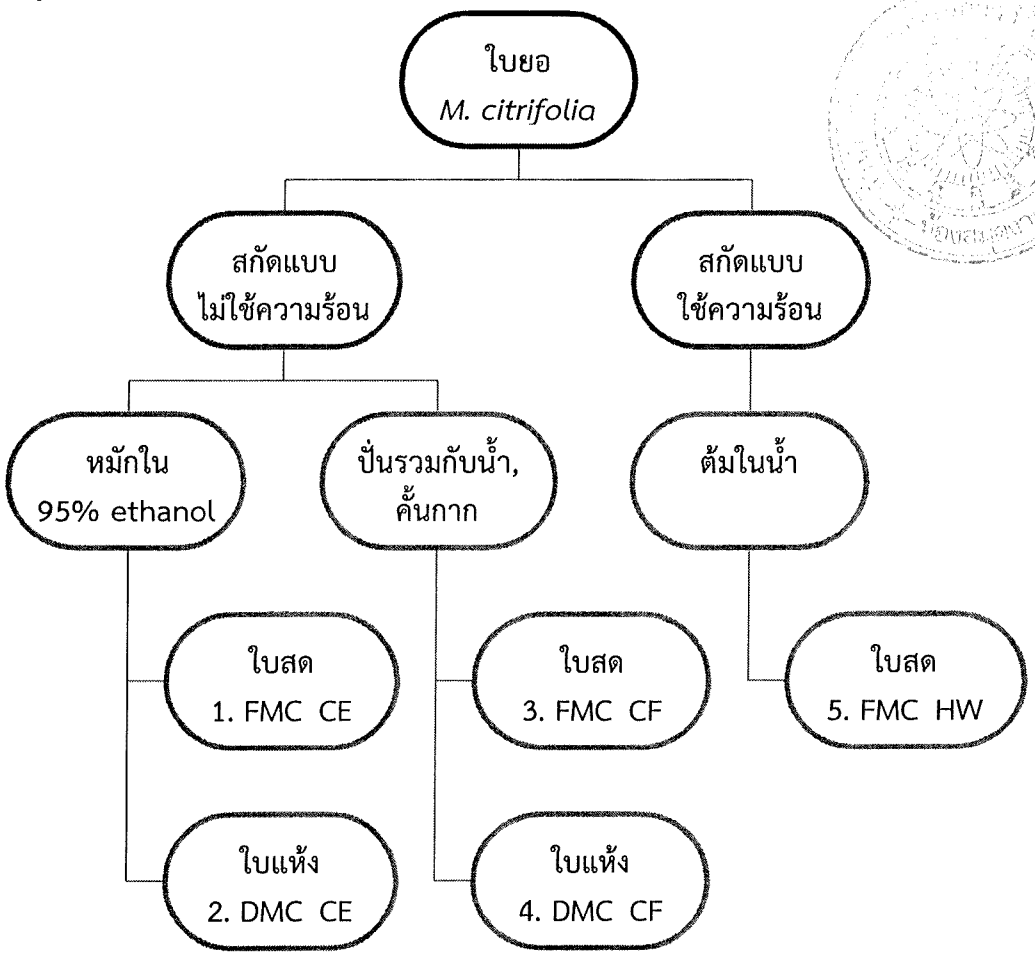
(18) Tip, blue, yellow (Bioline, USA)

(19) Vacuum evaporator (VV2000, Heidolph, Germany)

3.5 วิธีการทดลอง

<u>การทดลอง 1</u> การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ

นำใบยอที่ผ่านการทำความสะอาดและลดขนาดโดยการหั่นละเอียด มาสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้ (รูป 3-1)



รูป 3-1 แผนภาพการสกัดใบยอ (*M. citrifolia*) ด้วยเทคนิคต่างๆ

1. FMC_CE : นำใบยอสด 350 g มาสกัดโดยการหมัก (maceration) ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาณรวม 3.5 L คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 4 ช.ม. จนกระทั่ง exhaust แล้วนำน้ำยาสารสกัดไประเหยแห้ง ด้วย vacuum rotatory evaporator โดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C

2. DMC_CE : นำใบยอที่ผ่านการอบแห้ง ณ อุณหภูมิ 60 °C ปริมาณ 350 g มาสกัดโดยการหมัก (maceration) ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาณรวม 3.5 L คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 4 hr จนกระทั่ง exhaust แล้วนำน้ำยาสารสกัดไประเหยแห้ง ด้วย vacuum rotatory evaporator โดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C

3. FMC_CF : นำใบยอสดปริมาณ 350 g มาปั่นรวมกับน้ำปริมาตรรวม 800 mL คั้นน้ำสกัดและแยกกากออกโดยการกรอง นำสารละลายของสารสกัดไประเหยแห้งด้วยการทำ freeze-dry

4. DMC_CF : ใบยอที่ผ่านการอบแห้ง ณ อุณหภูมิ 60 ^{o}C ปริมาณ 350 g มาปั่นรวมกับน้ำปริมาตรรวม 800 mL คั้นน้ำสกัดและแยกกากออกโดยการกรอง นำสารละลายของสารสกัดไประเหยแห้งด้วยการทำ freeze-dry

5. FMC_HW : นำใบยอสดปริมาณ 350 g มาสกัดโดยการต้มด้วยน้ำปริมาณ 1 L เป็นเวลา 8 hr จนได้สารละลายของสารสกัดที่แห้ง

เตรียมสารละลายของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ณ ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 50 และ 100 µg/ml ใน Phosphate buffer saline (PBS) solution โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารช่วยละลาย กำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ DMSO ไม่เกิน 0.1% จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ขนาด 0.2 micron เพื่อทำไร้เชื้อสารสกัดก่อนนำไปทดสอบ

<u>การทดลอง 2</u> การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ

(1) กำหนดใช้ HPLC condition ในการทดสอบโดยประยุกต์จากการศึกษาของ Deng และคณะ (2008) และ Zu และคณะ (2006) ดังนี้

<u>Condition 1</u> (Deng et al., 2008)

Column:	Luna C18, 100 A column, Serial Number 422572-5		
	(250 × 4.6 mm i.d., 5 micron particle size)		
Mobile phase:	(A) 0.3% acetic acid in methanol : (B) 0.3% acetic acid in water		
	linear gradient A:B	35-50 : 65-50	0-10 นาที
		50-60 : 50-40	10-15 นาที
		60-65 : 40-35	15-18 นาที
		65-98 : 35-2	18-20 นาที
	Isocratic elution ด้วย A	100%	20-30 นาที
Flow rate:	1 mL/min		
Injection volume:	100 µL		
UV-detector:	365 nm		

Condition 2 (Zu et al., 2006)

Column:	Luna C18, 100 A column, Serial Number 422572-5
	(250 × 4.6 mm i.d., 5 micron particle size)
Mobile phase:	(A) 40% methanol : (B) 15% Acetronitrile : (C) 45% water
	(+ containing 1.0% acetic acid)
Run time:	17 min
Flow rate:	1 mL/min
Injection volume:	20 μL
UV-detector:	365 nm

(2) เตรียมสารละลาย rutin, quercetin และ kaempferol ใน methanol ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 μg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและ peak area

(3) เตรียมสารละลายสารสกัดใบยอความเข้มข้น 1, 10 และ 50 mg/mL และนำไปกรองผ่าน membrane filter 0.45 micron ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

(4) เทียบปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานในข้อ (1) โดยพิจารณาจาก peak ที่ปรากฏ ณ retention time เดียวกับสารมาตรฐาน

<u>การทดลอง 3</u> การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4)

(1) เพาะเลี้ยง MOLT-4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ประกอบด้วย RPMI-1640 medium, 2 mM L-glutamine และ 10% fetal bovine serum โดย sub-culture ทุก 2-4 วัน

(2) culture สารสกัดร่วมกับ cell suspensions (1×10^6 cell/ml) และ 5 μg/ml con A (stimulated system) หรือไม่เติม con A (unstimulated system)ใน 24-well cell culture plate จากนั้นนำไป incubate ณ อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C, 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(3) ปั่นตก cell suspensions และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์หาปริมาณ IFN-γ และ IL-10 โดยเทคนิค ELISA และวัดปริมาณ cytokine ด้วยเครื่อง microplate reader ณ 405 nm เทียบกับ standard curve

(4) การทดสอบปริมาณไซโตไคน์ด้วยชุดน้ำยาทดสอบมาตรฐานทำได้ ดังนี้

- coat 96 well-ELISA plate ด้วย capture antibody ใน coating buffer ผนึก plate และนำไป incubate ณ อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- block wells ด้วย assay diluents จากนั้นนำไป incubate ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้าง plate ซ้ำหลายๆ ครั้ง

- เติมสาร standard ลงในแต่ละ well (เตรียมความเข้มข้นแบบ 2-fold serial dilutions) เพื่อนำค่าที่วัดได้ไปสร้าง standard curve

- เติมสารทดสอบลงในแต่ละ well จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ณ อุณหภูมิห้อง 4 °C)

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม detection antibody จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม avidin-HRP จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 7 รอบ โดยแช่ buffer ค้างไว้ 1-2 นาทีก่อนดูดออก ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม substrate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

- เติม stop solution ลงในแต่ละ well จากนั้นจึงนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm

- คำนวณค่า "IFN-γ / IL-10 ratio" เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดใบยอต่อการตอบสนองของ Th1 และ Th2 ตามลำดับ

การเก็บข้อมูล เก็บข้อมูลแบบสามหรือสี่ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้การคำนวณทางสถิติแบบ One-way ANOVA analysis หรือการวิเคราะห์ด้วยหลักการทางสถิติที่เหมาะสมขึ้นกับค่าข้อมูลที่ได้

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม (Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, PBRU) ห้อง ภ. 4305 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก

3.6 ขอบเขตของการวิจัย

(1) ทดสอบด้วยสารสกัดจำนวน 3-5 ตัวอย่าง

(2) เปรียบเทียบปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดโดยเทคนิค HPLC-fingerprint เทียบกับสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol

(3) ใช้ human leukemic T-lymphocyte cell line ในการทดสอบการหลั่งไซโตไคน์

(4) ทดสอบผลของสารสกัดต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IFN-γ และ IL-10 โดยเทคนิค ELISA

(5) ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงรวมทั้งชนิดของไซโตไคน์ที่ใช้ในการทดสอบอาจมีการเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม

3.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

แผนการดำเนินงานวิจัย	เดือน											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. เตรียมสารสกัด - จัดหาสมุนไพร - ตรวจสอบเอกลักษณ์สมุนไพร - เตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ	✓	✓	✓									
2. สร้าง HPLC-fingerprint - ศึกษา HPLC- condition - สร้าง standard curve และ ศึกษา HPLC-fingerprints ของสารสกัดฯ - วิเคราะห์ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัด				✓	✓	✓	✓					
3. ศึกษาผลของสารสกัดฯ ต่อการสร้าง cytokine ใน human leukemic T-lymphocyte cell lines						✓	✓	✓	✓	✓	✓	
4. สรุป ประเมิน และรายงานการวิจัย						✓					✓	
5. นำเสนอผลงาน/ตีพิมพ์											✓	✓