บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมี

- Dichloromethane (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- Hexane (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- Ethyl acetate (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- Acetonitrile (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- Sterile water (A.N.B. laboratories, Bangkok, Thailand)
- Methanol (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)
- Dimethyl sulfoxide (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- L-ascorbic acid (POCH, Poland)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, USA)
- Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA)
- Sodium hydrogencarbonate (Sigma, USA)
- XTT solution (Roche, USA)
- T-PER (Thermoscientific, USA)
- Dc protein assay reagent (Bio-Rad, California, USA)
- Acrylamide (Bio-Rad, China)
- Tris-base (MERCK, Germany)
- Sodium dodecyl sulfate (Bio-Rad, California, USA)
- Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad, California, USA)
- Ammonium persulfate (APS) (Bio-Rad, California, USA)
- Hydrochloric acid (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- Sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- Tween 20 (Namsiang, Bangkok, Thailand)

- Skim milk (MERCK, Germany)
- Monoclonal mouse anti-human MMP-1 (Millipore, Massachusetts, USA)
- Monoclonal mouse anti human procollagen type I (Millipore, Massachusetts, USA)
- Polyclonal goat anti-mouse IgG HRP conjugate (Millipore, Massachusetts, USA)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, USA)
- Type I collagen solution (Gibco, Auckland, New Zealand)
- Sodium hydroxide (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- Rotary evaporator (Buchi, Switzerland)
- High performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)
- The Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, China)
- Semi-dry (Hoefer, USA)
- Larminar air flow carbinet (Forma Scientific Inc., Ohio, USA)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

นำเปลือกไม้ของต้นกระแจะที่ได้จากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 500 กรัม มาหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน จำนวน 1,500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองสาร

สกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง ทำการระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกภายใต้ความดันสุญญากาศ [20, 24]

3.3.2 ทำการควบคุมคุณภาพของสารสกัด

แยกสารสำคัญในสารสกัดโดยวิธี column chromatography และทำการควบคุมคุณภาพของสารสกัด โดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการที่เผยแพร่มาก่อนหน้านี้ [21]

3.3.3 การวัดฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดย DPPH assay

Free radical scavenging activity ของสารสกัดจากเปลือกไม้ของต้นกระแจะ จะถูกวัดจากค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ของสารละลาย DPPH ที่ลดลงเมื่อมีสารสกัดอยู่ โดยค่าที่ได้จะแสดงเป็น % disappearance ($[(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100\%$)

3.3.4 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย โดยมีรายละเอียดโดยสังเขปดังนี้

- เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาคือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอยตรงหน้าผาก และ/หรือหางตา จากอาสาสมัครอายุมากกว่าเท่ากับ 50 ปี โดยวิธีการแยกเซลล์จะใช้เทคนิค explant [19, 25]โดยให้เซลล์เกิดการเคลื่อนตัวออกมาจากเนื้อเยื่อผิวหนังชั้น dermis ที่เกาะติดกับ tissue culture plate แบ่งตัวและเจริญ เติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

- การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์จะใช้ XTT (sodium 3'-[(phenyl-amino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) assay ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้วัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถรีดิวซ์ (reduce) สาร XTT ไปเป็นสารสีส้มที่มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังต่อไปนี้

1. นำเซลล์ปริมาณ 1 x 10^4 เซลล์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เติมลงไป 96-well plate ที่ แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี FBS) ที่มีสารสกัดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร โดยในการละลายสารสกัดจะใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ช่วยละลาย โดยที่ปริมาณ DMSO ที่ใช้ไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ [26]

3. เมื่อครบ 24, 48 หรือ 72 [27, 28] ชั่วโมง เติม XTT solution ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37°C และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

- ทำการศึกษาอย่างน้อย 3 ครั้ง และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสารสกัด) และเซลล์ที่ถูกบ่มกับวิตะมินซี โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนตัวแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ มีเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ที่มีชีวิตอยู่จะถูกประเมินด้วยสายตาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบหงาย

3.3.5 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการสร้าง type I procollagen และการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับทำลาย collagen ได้แก่ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอยและถูกกระตุ้นด้วยแสง UV (UVB-irradiated fibroblasts from wrinkles)

1. นำเซลล์ที่แยกได้ปริมาณ 1.5 x 10^6 เซลล์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติมลงไปใน flask 25 cm^2 แล้วทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่ไม่มี FBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ไม่มี FBS) ที่มีสารสกัดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในเซลล์ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

3. นำตัวอย่างไปวางภายใต้รังสี UVB ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 280 - 315 นาโนเมตร โดยใช้ความเข้มแสง 56 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที [10]

4. หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 4 และ 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาตรวจสอบปริมาณโปรตีน type I procollagen และ MMP-1 ที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ในเชิงเปรียบเทียบด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot โดยมีรายละเอียดดังนี้

ELISA

- นำ supernatant ที่ได้มาหาปริมาณของโปรตีนตามขั้นตอนของชุด kit

Western blot

- นำ supernatant และ cell lysate ที่ได้ไปทำการแยกโปรตีนด้วยหลักการ electrophoresis บน SDS-PAGE gel โดยสารละลายดังกล่าวต้องผ่านการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (DC Protein Assay Reagent A, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)
- ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนที่อยู่บนเจล ลงบนแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF membrane)
- ทำการป้องกันความไม่เฉพาะเจาะจงของการจับระหว่าง anti-body กับโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ โดยนำแผ่น PVDF ไปแช่ใน TBS-T buffer (ประกอบไปด้วย Tris-HCl, pH 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ที่มี skim milk ในความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [10]
- นำแผ่น PVDF ไปบ่มกับ monoclonal mouse anti-human MMP-1 หรือ monoclonal mouse anti-human procollagen type I โดยความแรงของ antibody และสภาวะที่ใช้บ่มเป็นไปตามคำแนะนำที่กำหนดโดยผู้ผลิต antibody

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 249794
เลขเรียกหนังสือ

- หลังจากนั้น นำแผ่น PVDF ไปบ่มกับ secondary antibody (goat anti-mouse IgG) ที่มีโครงสร้างเชื่อมต่ออยู่กับ horseradish peroxide

- หลังจากนั้น นำแผ่น PVDF ไปบ่มกับ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)

- ทำการศึกษาอย่างน้อย 3 ครั้ง และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากสารสกัด) เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติพร้อมกับได้รับรังสี UVB และเซลล์ที่ถูกบ่มกับวิตะมินซีพร้อมกับได้รับรังสี UVB [10]

3.3.6 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) เส้นใย collagen และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย

1. การเตรียม fibroblasts-embedded collagen matrix (FECM)

ในการศึกษานี้ จะใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ฝังตัวอยู่ในคอลลาเจนเมทริกซ์ (fibroblasts-embedded collagen matrix, FECM) เป็นแม่แบบในการศึกษา โดยวิธีการเตรียม FECM ได้พัฒนามาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ [19, 25] โดยมีรายละเอียดพอสังเขปดังนี้ collagen matrix ซึ่งมีรูปร่างเป็นแผ่นทรงกลมประกอบไปด้วย DMEM ความเข้มข้น 10X ในปริมาณ 0.45 มิลลิลิตร, type I collagen ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร, NaOH ความเข้มข้น 0.1 N ในปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร, $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย ที่แขวนลอยอยู่ใน DMEM ที่มี FBS ในปริมาณ 4×10^5 เซลล์ต่อ DMEM ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เมทริกซ์จะถูกเตรียมใน Petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร และทำการบ่มเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเมทริกซ์แข็งตัว จะถูกทำให้หลุดออกจาก dish และลอยใน DMEM ที่มีสารสกัด

2. การประเมินศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) คอลลาเจน และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ศักยภาพในการจัดระเบียบคอลลาเจน และการหดตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกประ เมินจากอัตราการลดลงของเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลลาเจนเมทริกซ์เมื่อเวลาต่างๆ (วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการบ่มเซลล์) การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจะทำโดยใช้ไม้บรรทัด

ทำการศึกษาอย่างน้อย 3 ครั้ง และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (ปราศจากสารสกัด)

3.3.7 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล จะดำเนินการโดยนำข้อมูลที่ได้จากกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุม (กลุ่มของเซลล์ที่ไม่ถูกบ่มการสารสกัด) และกลุ่มของเซลล์ที่ถูกบ่มกับวิตะมินซี มา

เปรียบเทียบกัน และใช้ค่าทางสถิติในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างทั้งสองกลุ่มนี้ โดยใช้ Student's *t*-test