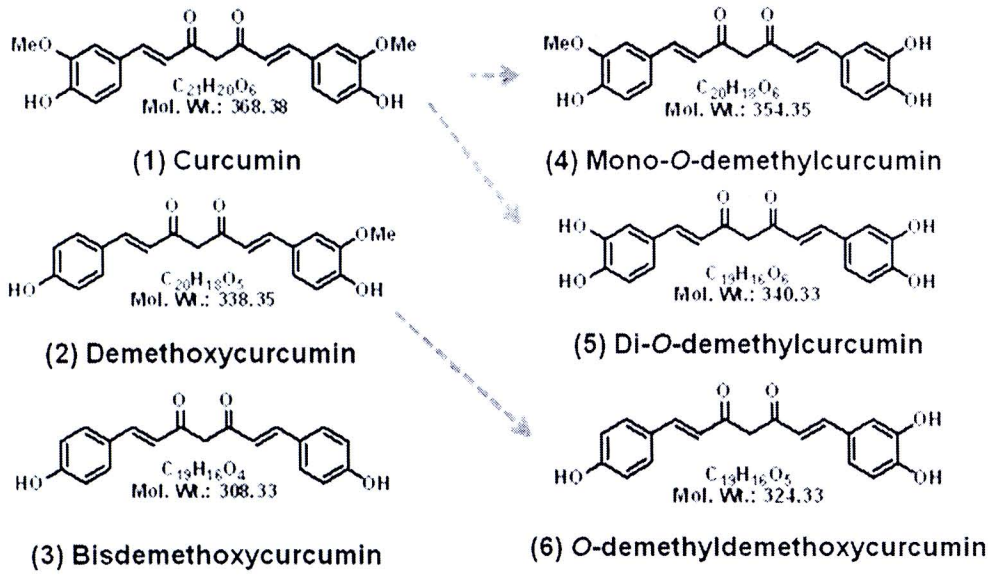
บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารสกัดที่ใช้ในงานวิจัย

Curcuminoids และ analogs เป็นสารสกัดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบสารสกัด curcuminoids สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็น natural curcuminoids ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ และ analogs สารโครงสร้างที่ 4, 5 ซึ่งเป็น demethylation products ของสารที่ 1 และ analog สารโครงสร้างที่ 6 เป็น demethylation product ของสารที่ 2 ดังแสดงในภาพ 24



ภาพ 24 แสดงโครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของสาร curcuminoids โครงสร้างที่ 1, 2, 3 และ analogs โครงสร้างที่ 4, 5, 6

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไตเพาะเลี้ยง Human embryonic kidney (HEK-293) จาก American Type Culture Collection (ATCC)

เครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์** (Culture medium preparation)

1.1 Aluminium foil (Aro, Thailand)

1.2 Beaker (Pyrex, Germany)

1.3 Bottle (Duran, Germany)

1.4 Cellulose acatate filter (pore size 0.45 μm) (Satorius, Germany)

1.5 Cylinder (Pyrex, Germany)

1.6 Distilled water 18 mΩ

1.7 Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (GIBCO™, New Zeland)

1.8 Fetal bovine serum (GIBCO™, New Zeland)

1.9 Penicillin/Streptomycin (GIBCO™, New Zeland)

1.10 Polycarbonate filter holder (Satorius, Germany)

1.11 Sodium bicarbonate (Sigma, ST Louis, MO, USA)

1.12 Sterile filter (Variomag®, Germany)

1.13 Vacuum pump (TODAY'S, Rocker400, Taiwan)

2. **การเลี้ยงเซลล์** (Cell culture)

2.1 Autoclave (Astell, england)

2.2 Bunsen burner (Integra Biosciences, Switzerland)

2.3 Biosafety cabinet (Affinitech, Thailand)

2.4 Cell culture incubator (Sanyo, Japan)

2.5 Centrifuge (Labofuge 400R, Heraeus, Germany)

2.6 Centrifuged tube (Corning®, Mexico)

2.7 Culture plate (Flacon®, U.S.A.)

2.8 Cryogenic vial (Cryos™, Japan)

2.9 Ethanol (Merk, Germany)

2.10 Grass pipette (precicolor HBG, Germany)

2.11 Light inverted microscope (Leica, Germany)

2.12 Pipette aid (Bio-Rad, USA)

2.13 Phosphate buffer saline (Ameresco®, USA)

2.14 Trypsin (GIBCO®, Canda)

2.15 Water bath (Heto, Lab Equipment, Denmark)

3. **การทดสอบความเป็นพิษ และการประเมินการมีชีวิตของเซลล์** (Toxicity test and cell viability evaluation)

3.1 Bunsen burner (Integra Bioscience, Switzerland)

3.2 Cadmium Chloride ($CdCl_2$) (Sigma cat. no.C3141)

3.3 Centrifuged tube (Corning®, Mexico)

3.4 Curcumin compound (provided by Prof. Dr. Apichart Suksamran)

3.5 Curcuminoid analog (provided by Prof. Dr. Apichart Suksamran)

3.6 Dimethyl sulfoxide (Sigma, ST Louis, MO, USA)

3.7 Ethanol (Merk, Germany)

3.8 Micropipette (Bio-Rad, USA)

3.9 Microplate shaker (National Labnet, USA)

3.10 Microtiter plate reader (Bio-Tek, Instruments, Winooski, VT, USA)

3.11 Neubauer hemocytometer (Fischer Sciencetific, Germany)

3.12 Glass pipette (Calbiochem, Germany)

3.13 Pipette Tip (Trefflab, Switzerland)

3.14 Trypan blue (Sigma, St Louis, MO, USA)

3.15 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma, St Louis, MO, USA)

3.16 96-well plate (Nunc™, Denmark)

4. **การสกัดโปรตีน**

4.1 Bottle (Duran, Germany)

4.2 Cytosol and Mitochondrial protein extraction Kit (Biobasiic Inc, Canada)

4.3 Distilled water 15 m Ω

4.4 Eppendrof (Trefflab, Switzerland)

4.5 Groves (Semperguard, Thailand)

4.6 Micropipette (Bio-Rad, USA)

4.7 Phosphate buffer saline (Ameresco®, USA)

4.8 Pipette tips (Trefflab, Switzerland)

4.9 Refrigerated centrifuge (D3750 Osterode, Kendro, Germany)

4.9.1 Vortex (Paramix D-77960, Julabo, Germany)

5. **Western blot analysis**

5.1 Acrylamide (Amersharm Bioscience, Sweden)

5.2 Ammonium persulfate (Amersharm Bioscience, Sweden)

5.3 Acetic acid (Merk, Germany)

5.4 Bromophenol blue (Sigma, ST Louis, MO, USA)

5.5 Casting stand with clamp (Miniprotein ® System, Biorad, China)

5.6 Chemiluminescent HRP substrate (Immobillon™ Western, Milipore, USA)

5.7 Chromatography paper (Whatman®, England)

5.8 Heat block (Wealtec, USA)

5.9 Methanol (AnalaR®, England)

5.10 Polyvinylidene Difluoride (Amersham Hypond™-P, UK)

5.11 Skimmed mlik (Morinagamilk, Japan)

5.12 Sodium chloride (Merk, Germany)

5.13 Sodium dodecyl sulfate (Bio basic inc., Canada)

5.14 TEMED (Bio basic inc., Canada)

5.15 Tris-base (Amersco®, USA)

5.16 Tween 20 (USB, USA)

5.17 Vortex (Paramix D-77960, Julabo, Germany)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. **การเพาะเลี้ยงเซลล์** Human embryonic kidney (HEK-293)

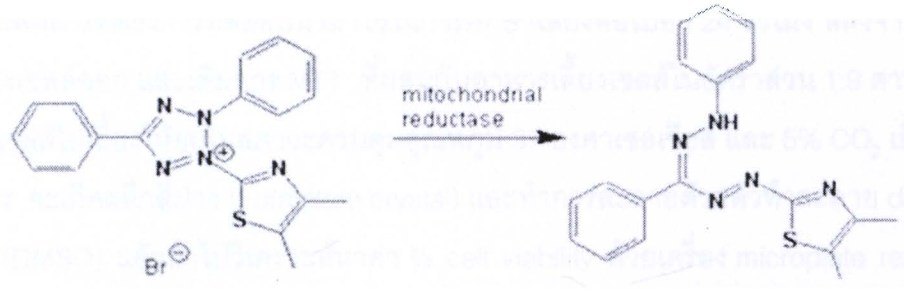
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต (HEK-293) ด้วยอาหารสูตร Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของ 10% bovine serum (BS) และ 1% penicillin-streptomycin ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2

2. **การเตรียมสารสกัด curcuminoids และ analogs**

ก่อนนำสาร curcuminoids และ analogs มาใช้ในการทดสอบ จะต้องนำมาทำละลายด้วยตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ซึ่งการเตรียมสารสกัด curcuminoids และ analogs ที่ความเข้มข้นต่างกัน ทำโดยการเจือจางความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's Modified Essential Medium) ที่ไม่มีส่วนผสมของ serum และจะถูกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. **ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์** (Cell viability)

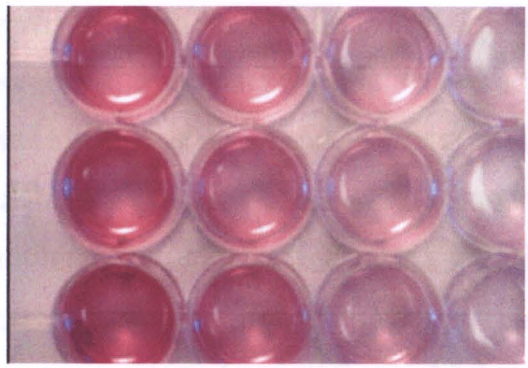
การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง จะทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นการศึกษาการทำปฏิกริยากับเอนไซม์ (enzyme) ที่พบใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์ใน mitochondria จะทำปฏิกริยากับสีของ MTT จากเดิมสีของ MTT เป็นสีเหลืองถูกเปลี่ยนกลายเป็นผลึกสีม่วงที่เรียกว่า Formazan crystal



MTT (สีเหลือง) **Formazan (สีม่วง)**

ภาพ 25 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของ MTT เป็น Formazan โดย mitochondrial Reductase

ที่มา : American Type Culture Collection ATCC Product, 2002



ภาพ 26 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสี MTT ตามการมีชีวิตของเซลล์ หลังทำการละลายผลึกสีม่วง (Formazan crystal) พบว่า การมีชีวิตของเซลล์แสดงออกโดยการเกิดสี ซึ่งสีม่วงเข้ม แสดงการมีชีวิตของเซลล์มาก ส่วนสีม่วงอ่อนแสดงการมีชีวิตของเซลล์น้อย

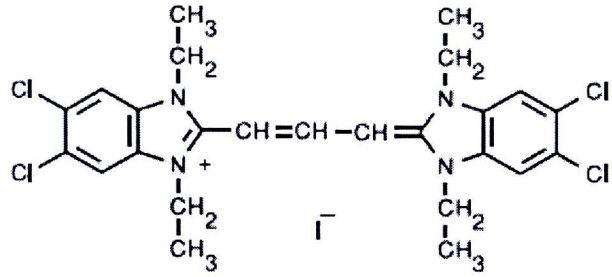
ที่มา : http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M1475

ในการศึกษาสารที่นำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของแคดเมียม ($CdCl_2$) และสารสกัด curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) ในการทดสอบจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate ที่ความเข้มข้นของเซลล์ 3 x 10^4 cells/well ที่สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเติมสารที่ต้องการทดสอบนำมาใช้ในการศึกษาเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสาร MTT ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:9 ตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จะเกิดผลึกสีม่วง (Formazan crystal) และทำการละลายด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่า % cell viability ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น (Optical density; OD) 540 นาโนเมตร (Bio-Tek, Instruments, Winooski, VT, USA) สำหรับกลุ่มเซลล์ control จะทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ในสภาวะเดียวกัน โดยค่า OD ที่ได้นำไปคำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) โดยเทียบให้กลุ่มควบคุมเป็น 100% ดังนี้

$$\% \text{ Cell Viability} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential (MMP)

Mitochondria เป็นศูนย์กลางที่สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ภายในเยื่อหุ้มชั้นของ mitochondria มีการทำงานแลกเปลี่ยนอิเลคตรอน (e^-) เกิดเป็นศักย์ไฟฟ้าอยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นของ mitochondria ที่เรียกว่า mitochondrial membrane potential (MMP) หากเมื่อการทำหน้าที่ของ mitochondria ผิดปกติไป ทำให้เกิดการสูญเสียของ mitochondrial membrane potential นำไปสู่การปล่อยกลุ่มสาร apoptogenic factors ที่ภายใน mitochondria เช่น cytochrome C ออกสู่ cytosol ซึ่งจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสตามมา

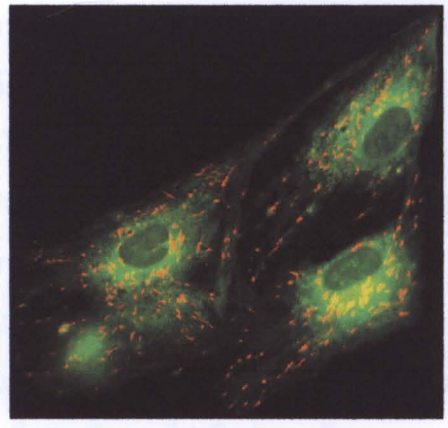


ภาพ 27 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสี JC-1

ที่มา : http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34152.pdf

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สีย้อม JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic cationic dye ในภาวะเซลล์ปกติ จะมีระดับ MMP สูง เมื่อนำเซลล์ย้อมด้วยสี JC-1 สีสามารถแทรกซึมเข้าสู่ mitochondria และจะพบการแสดงของสี JC-1 ติดสีส้มแดง อยู่ภายใน mitochondria โดยการทำงานของสี JC-1 จะผ่านเข้าไปสะสมใน mitochondrial matrix เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregates) เปลี่ยนจากสีเขียว กลายเป็นสีส้มแดง ดังแสดงในภาพ 28 แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้น หรือ เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การทำงานของ mitochondria ผิดปกติ เกิดการสูญเสีย MMP ส่งผลทำให้สี JC-1 ไม่สามารถผ่านเข้าไปใน mitochondrial matrix สี JC-1 จึงแสดงการติดเป็นสีเขียว คั่งอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ ผลที่ได้สามารถวิเคราะห์ผลได้ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งสีแดงมีความยาวคลื่น

(Optical density) 585/590 นาโนเมตร ส่วนสีเขียวมีความยาวคลื่น (Optical density) 510/527 นาโนเมตร ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของสี JC-1 บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential และสามารถบ่งบอกถึงสุขภาพของเซลล์ได้



ภาพ 28 แสดงการติดของสี JC-1 ภายใน mitochondria ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ที่มา : http://www.med.unipg.it/imagelab/mitoch.html

5. **การสกัดโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน**

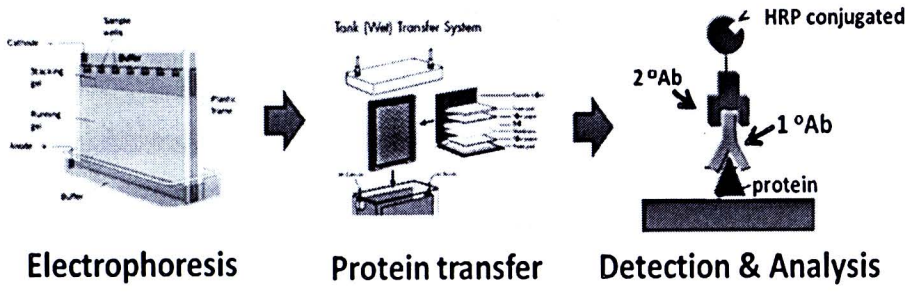
การศึกษาตรวจวัดปริมาณโปรตีน โดยการสกัดแยกโปรตีน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาโปรตีนทั้งใน cytosol และ mitochondria โดยใช้ชุดสกัด cytosol และ mitochondria buffer Kit (cytosol and Mitochondria Protein Extraction Kit) จากบริษัท Bio basic (Cat.no.BSP051) ในขั้นตอนการสกัด หลังจากเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ เก็บเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1X PBS ที่แช่เย็น นำไปปั่น (vortex) เพื่อให้ละลาย PBS ชะล้างทั่วเซลล์ จากนั้นทำการปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 รอบ) หลังจากปั่นตกครบรอบ จะได้เซลล์เกาะกลุ่ม (cell pack) ตกอยู่ที่ก้นหลอด เติมสารละลาย cytosol buffer ที่มีส่วนผสมของ proteinase และ DTT (อัตราส่วน 1ml:1µl:1µl) และปั่น (vortex) เพื่อให้เซลล์แตก ซึ่งขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้โปรตีนใน cytosol ทำโดยปั่นเซลล์ (vortex) เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งไว้เพื่อให้สารละลายทำการย่อย (lysis) เพื่อให้ได้โปรตีน เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 3 รอบ) หลังจากครบรอบทำการปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งจะได้

สารละลายด้านบน (supernatant) ย้ายสาร supernatant ที่ได้ นำไปใส่ในหลอดที่แช่เย็นไว้ (pre-cold tube) อันใหม่ และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้สาร supernatant และนำสารที่ได้ประมาณ 80% จากปริมาณทั้งหมด (คงเหลือไว้ที่หลอดประมาณ 20%) นำไปใส่ในหลอดที่แช่เย็นไว้ (pre-cold tube) อันใหม่ สิ่งที่ได้คือ cytosol proteins จากนั้นส่วนที่เหลือ 20% เติมสารละลาย mitochondria buffer ที่มีส่วนผสมของ proteinase และ DTT (อัตราส่วน 500µl:0.5µl:0.5µl) และทำการปั่น (vortex) เพื่อให้ได้ organelles หรือ mitochondria โดยปั่น เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งไว้ 10 นาที (ทำซ้ำ 3 รอบ) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สิ่งที่ได้คือ mitochondria proteins และเก็บโปรตีนที่ -80 องศาเซลเซียส

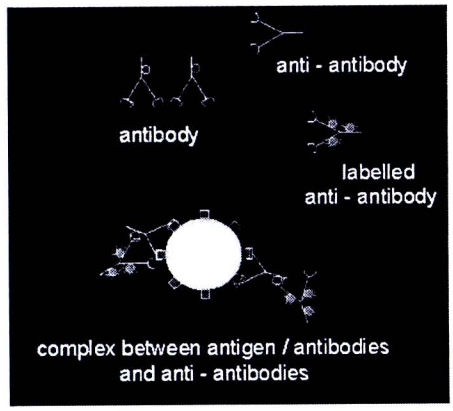
ในส่วนการวัดปริมาณโปรตีนใช้ Bradford protein assay เทียบกับ BSA (Bovine serum albumin) standard โดยนำโปรตีนมาเจือจาง (dilute) 20x (โปรตีนจาก stock 1 µl + DW 19 µl) เติม Bradford reagent ซึ่งวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง Microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

6. Western blot analysis

หลังจากได้โปรตีน และวัดปริมาณโปรตีน นำโปรตีนที่ได้มาทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 180 Volts เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นทำการย้ายโปรตีนบนเจลไปยังแผ่น membrane polyvinylidene fluoride (PVDF) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 mA เป็นเวลา 30 นาที ทำการ block แผ่น membrane ด้วยหางนม 5% (5 % skimmed milk) ทิ้งไว้ over night ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการ blotting ต่อโปรตีนที่ต้องการสำหรับโปรตีน Bcl-2 ใช้ mouse anti-Bcl-2 เป็น primary antibody ความเข้มข้น 1:1000 ใน TBST บ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน Bax ใช้ mouse anti-Bax เป็น primary antibody ความเข้มข้น 1:1000 ใน TBST บ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และโปรตีน Actin ใช้ mouse anti-actin เป็น loading control บ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้าง primary antibody ด้วย TBST แล้วจึงเติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase (horseradish peroxidase anti-mouse IgG) ความเข้มข้น 1:40,000 และทำการวิเคราะห์ผลโปรตีนโดย chemiluminescent detection



ภาพ 29 แสดงหลักการ western blot analysis



ภาพ 30 แสดงหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี

ที่มา : http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e17/17j.htm

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองเชิงปริมาณได้จากค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดลองหรือการตรวจวัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และรายงานค่าเป็น Mean ±SD การวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย one-way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Bonferri test ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดคำนวณโดยใช้ SPSS v.11.5 บริษัท SPSS Inc.