242864

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

242864

รหัสโครงการ SUT1-104-43-24-11

รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

(A Basic Development of Immunotoxicological Assays as A Screening Tool for Detecting Immuno-modulating Activities of Thai Herbal Plants)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รหัสโครงกา
242864

b00247218

รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

(A Basic Development of Immunotoxicological Assays as A Screening Tool for Detecting Immuno-modulating Activities of Thai Herbal Plants)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2543

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2543 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เล็งเห็นความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสถานวิจัยสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ที่ให้ความสนับสนุนและอำนวยความสะดวกอย่างต่อเนื่อง

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. Nakao Nomura จาก University of Tsukuba ที่ให้ข้อแนะนำเกี่ยวกับเทคนิค MTT เมื่อเริ่มต้นโครงการ คุณวัชระ วงศ์วิริยะ ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้สัตว์ทดลอง คุณสิรินยา บุญภูมิ สำหรับความช่วยเหลือด้านงานเอกสาร

ท้ายสุดขอขอบคุณคุณพ่อ-คุณแม่ สมาชิกในครอบครัว รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์ และ นายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจให้มีพลังในการทำงานและฟันฝ่าอุปสรรคต่าง ๆ จนท้ายสุดสามารถปิดโครงการวิจัยและสามารถเขียนรายงานวิจัยได้สำเร็จ แม้จะใช้เวลานานมากกว่าที่ตั้งใจไว้

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์
หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

242864

วิธีการทดสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันได้ถูกดัดแปลงเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โครงการวิจัยนี้ได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบ mitogenesis assay และ mixed lymphocyte reaction (MLR) โดยวัดการตอบสนองด้วยการใช้สีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี [^{3}H]-thymidine ตามวิธีมาตรฐาน ในวิธีทดสอบ mitogenesis ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 บ่มร่วมกับ media ที่มี หรือไม่มี mitogen ใน 96 microtiter plate ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมใช้ปริมาณเซลล์ 8x10^5 เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองของ B lymphochyte โดยกระตุ้นด้วย 1-100 μg/ml lipopolysaccharide และวัดการตอบสนองที่ 24-48 ชม. ภายหลังการกระตุ้น การทดสอบการตอบสนองของ T เซลล์ใช้ 2.5-10 μg/ml concanavalin A mitogen และวัดการตอบสนองที่ 48-72 ชม. ส่วนการทดสอบการตอบสนองของทั้ง T และ B เซลล์ ใช้ 1-100 μg/ml pokeweed mitogen และวัดการตอบสนองที่ 24 ชม. ในวิธีทดสอบ MLR ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 เป็นเซลล์ responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย DBA/2 ที่ผ่านการบ่มร่วมกับ 50 μg/ml mitomycin C เป็นระยะเวลา 45 นาทีเป็นเซลล์ stimulator สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมคือปริมาณเซลล์ของ responder 4-8x10^5 เซลล์/หลุม อัตราส่วนของเซลล์ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ 5 การใช้ MTT colorimetric assay อาจเหมาะสมในการใช้คัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันใน mitogenesis assay แต่สำหรับการทดสอบของ MLR ที่ต้องการวัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ความเชื่อมั่นของการแปลผลจะน้อยกว่าในวิธีมาตรฐาน

Abstract

242864

Two basic immunotoxicological tests were modified for screening medicinal plants with immunomodulating activity The present project used the tetrazolium dye -3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for the measurement of lymphoproliferative response in mitogenesis assay and mixed lymphocyte reaction (MLR) as an alternative to the standard method using the radioactive [^{3}H]-thymidine. In the mitogenesis assay, splenocytes from female C57Bl/6 mice were cultured in the presence or absence of mitogen in a 96-well plate, incubated at 37°C and 5% CO_2. The optimized cell number of the culture was $8x10^5$ cells/well. For the optimum B cell mitogenic response, 1-100 μg/ml lipopolysaccharide was used, and the peak response was 24-48 h post stimulation. For the T-cell mitogenic response, the optimum concentration of concanavalin A was 2.5-10 μg/ml, and the response was evaluated at 48-72 hr. For the optimum mitogenic response of both T and B cells, 1-100 μg/ml poke weed mitogen was used and the response was evaluated at 24 hr.. In MLR, splenocytes from female C57Bl/6 mice was used as responder cells and the 50 μg/ml mitomycin C-treated splenocytes from DBA/2 mice were used as stimulator cells. The optimum concentration of responder cells in the culture was $4-8x10^5$ cells/well, the ratio of responders to stimulators was 1 to 4, and the peak response occurred at day 4 or 5. Overall, MTT colorimetric method could be used for determining lymphoproliferative response in the mitogenesis assay, and applied for selecting medicinal plants with immunomodulating activity. However, using the MTT method for measurement of the response in one-way mixed lymphocyte reaction in MLR could be difficult to interprete and might be less relevant compared to the traditional method.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ ขอบเขต และประโยชน์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี	14
น้ำ	14
วัสดุ	14
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย	15
วิธีดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 การวิจารณ์	44
บทที่ 6 บทสรุป	
สรุป	53
ข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	61
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	64
ประวัติผู้วิจัย	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้การทดสอบ Tier I	8
2	แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้การทดสอบ Tier II	8
3	การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของ lymphocyte ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน	36
4	การตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ใน mixed lymphocyte reaction ในวันที่ 4 และ 5	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay	12
2	การตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml เมื่อระยะเวลา 24 ชม.	25
3	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)	26
4	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $2x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	27
5	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	27
6	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)	28
7	แสดงการตอบสนองของ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่มีความเข้มข้น 0.1-100 μg/ml (* และ ** หมายถึง ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.001$ ตาม ลำดับ)	29
8	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)	30
9	แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $2x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

10 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$) 31

11 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (**, * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.001$ และ 0.05 ตามลำดับ) 32

12 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$) 33

13 การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A 2.5-10 μg/ml ของ culture ที่มีปริมาณเซลล์ $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. หลังจากกระตุ้นด้วย Con A (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$) 34

14 การตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$) 35

15 การตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$) 35

16 การตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$) 36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

17 การตอบสนองของ lymphocyte $1x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อเซลล์ stimulatorใน mixed lymphocyte reaction เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 R= responder, S = stimulator 38

18 การตอบสนองของ lymphocyte $1x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อเซลล์ stimulatorใน MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 5 ภายหลังการกระตุ้น R= responder, stimulator (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$) 38

19 การตอบสนองของ responder (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ stimulator ที่ความเข้มข้นของเซลล์ responder ต่างกันในอัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ใน one-way MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 (R =responder, S = stimulator กราฟที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test) 39

20 การตอบสนองของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A mitogen เทียบกับการตอบสนองของเซลล์ responder ในการทดสอบใช้เซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม 5 μg/ml Con A และวัดการตอบสนองในวันที่ 3 (R = responder, S = stimulator * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$) 41

21 การตอบสนองของเซลล์ stimulator (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ที่ได้รับและไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A การทดลองใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม Con A 5 μg/ml และวัดการตอบสนองในวันที่ 2 (ก) และวันที่ 3 (ข) (R = responder, US = stimulator ที่ไม่ได้รับ mitomycin C, S = stimulator ที่ได้รับ mitomycin C. * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$) 43