สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ -4 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247239
เลขเรียกหนังสือ

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

Aggregometer (AggRAM, Helena Laboratories, Texas, U.S.A.)

5% CO_2 incubator (Forma Scientific Inc, Massachusetts, U.S.A.)

Gel documentation (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, U.K.)

Hemocytometer (Bright-line, Hausser Scientific, Pennsylvania, U.S.A.)

HPLC system

Ultimate 3000 pump, autosampler, variable wavelength detector, Chromelon software (Dionex, CA, U.S.A.)

Column C18, 5 μm, 250 x 4.6 mm with guard (Phenomenex, Cheshire, U.K.)

Microplate reader (Perkin Elmer, Victor 3, Massachusetts, U.S.A.)

Phase-contrast inverted microscope (CK30, Olympus, Tokyo, Japan)

Rotary evaporator (RE120, Buchi, Flawil, Switzerland)

Sieve number 40 (Retsch 5657 HAAN 0.425 nm Mesh No. 40, Germany)

Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany)

Spray drying apparatus (Buchi, Flawil, Switzerland)

TLC densitometer (CAMAG, Muttenz, Switzerland)

สารเคมี

Acetonitrile (J.T. Baker, Kentucky, U.S.A.)

Agarose

Low melting agarose (Invitrogen, Spain)

Normal melting agarose (BDH Chemical, England)

Ascorbic acid (Fluka Chemicals, Steinheim, Germany)

Butylated hydroxyanisole (BHA) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

2-Deoxy-D-ribose (Fluka Chemicals, Steinheim, Germany)

2′, 7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany)

3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Diosmin (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka Chemicals, Steinheim, Germany)

Enhanced chemiluminescence (ECL) prime Western blotting detection reagent (Amersham, Buckinghamshire, U.K.)

Ethyl acetate (Fisher Scientific, California, U.S.A.)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Univar, Sydney, Australia)

Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Utah, U.S.A.)

Formic acid (Univar, Sydney, Australia)

Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L (HRP) (Abcam, Cambridge, U.K.)

Griess reagent (sulfanilamid/N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochlo- ride) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Guaiacol (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Hesperidin (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Fisher Scientific, California, U.S.A.)

Iron (III) chloride ($FeCl_3$) (Merck, Darmstadt, Germany)

D (-)-mannitol (Merck, Darmstadt, Germany)

Medium 199 (Gibco BRL Life Technologies, New York, U.S.A.)

Mouse monoclonal to β-actin, horseradish peroxidase conjugated (Abcam, Cambridge, U.K.)

β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt hydrate (NADH) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Penicillin streptomycin (Gibco BRL Life Technologies, New York, U.S.A.)

Peroxidase type I from horseradish (HRP) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Phenazine methosulfate (PMS) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Protease inhibitor (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.)

Quercetin (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Rabbit polyclonal CAT (Abcam, Cambridge, U.K.)

Rabbit polyclonal to eNOS (Abcam, Cambridge, U.K.)

Rabbit polyclonal to iNOS (Abcam, Cambridge, U.K.)

Rabbit polyclonal to glutathione peroxidase 1 (GPx) (Abcam, Cambridge, U.K.)

Rabbit polyclonal to Cu/Zn-SOD (Abcam, Cambridge, U.K.)

Rabbit polyclonal to Mn-SOD (Abcam, Cambridge, U.K.)

Resveratrol (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Sodium nitroprusside (SNP) (Fluka Chemical, Steinheim, Germany)

SYBR Green (Invitrogen, Paisley, U.K.)

2-Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

Toluene (Merck, Darmstadt, Germany)

Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany)

การเตรียมสารสกัดเพชรสังฆาต

เพชรสังฆาตเก็บที่จังหวัดอยุธยาจำนวน 11.79 กิโลกรัม ในเดือนธันวาคม 2551 ทำการพิสูจน์สัณฐานวิทยาโดยรองศาสตราจารย์ ดร. รุทธ์ สุทธิศรี ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (voucher specimen number RS-160651) และเก็บไว้ตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำส่วนเหนือพื้นดินของเพชรสังฆาต (11.79 กิโลกรัม) อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นบดเป็นผงและนำมาผ่านแร่งเบอร์ 40 เพื่อให้ได้ผงเพชรสังฆาตขนาดเดียวกัน

การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล นำผงเพชรสังฆาต (1.24 กิโลกรัม) สกัดด้วย 95% เอทานอล (ผงแห้ง 25 กรัมต่อเอทานอล 400 มิลลิลิตร) ด้วยอุปกรณ์ soxhlet นาน 7 ชั่วโมง (CQES7) และ 48 ชั่วโมง (CQES48) หรือ reflux 7 ชั่วโมง (CQER7) นำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันด้วยอุปกรณ์ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศา แบ่งสารสกัดเป็นส่วน ๆ บรรจุในขวดป้องกันจากแสง เก็บไว้ที่ -20 องศา

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ นำผงเพชรสังฆาตต้มน้ำนาน 1 ชั่วโมง (ผงแห้ง 25 กรัมต่อน้ำ 400 มิลลิลิตร) นำมาระเหยภายใต้ความดันด้วยอุปกรณ์ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศา ก่อนทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying ได้ผงแห้ง CQWF1 บรรจุในขวดป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การคั้นน้ำจากเพชรสังฆาตสด ส่วนเหนือดินเพชรสังฆาต (1 กิโลกรัม) คั้นเอาน้ำออก และนำน้ำคั้นมาเคี่ยวนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้แห้งด้วยวิธี spray drying ได้ผงแห้ง CQWS1 บรรจุในขวดป้องกันแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin และ resveratrol ในสารสกัดเพชรสังฆาต

เทคนิค TLC densitometer

วิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ในสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสมของ toluene : ethyl acetate : formic acid (6:4:1, v/v/v) กำหนดให้เคลื่อนบนแผ่น TLC silica gel 60 F254 ระยะทาง 100 มิลลิลิตรในถังอิ่มตัว หยดสารมาตรฐาน quercetin (ปริมาณ 100. 200, 300, 400 และ 500 นาโนกรัมต่อจุด) และสารสกัดเพชรสังฆาต (199 ไมโครกรัมต่อจุด) บนแผ่น TLC นำมาวัดความเข้มของสารแต่ละจุดบนแผ่น TLC ด้วยเครื่อง TLC densitometer ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

เทคนิค HPLC

วิเคราะห์ปริมาณ quercetin และ resveratrol ในสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยคอลัมน์ชนิด C18 reversed phase (ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาด 5 ไมครอน) และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย (A) acetonitrile และตัวทำละลาย (B) 0.3% formic acid วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง ดังนี้ ลดอัตราส่วนของตัวทำละลาย (B) จาก 80% ไปเป็น 60% เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นเพิ่มอัตราส่วนตัวทำละลาย (B) เป็น 80% เป็นเวลา 15-20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ quercetin และ 307 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ resveratrol

เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายในเมทานอล ได้แก่ CQES48 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร quercetin และ resveratrol อย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉีดสารละลายของสารทดสอบเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 20 ไมโครลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ วัดความสามารถของสารในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีความคงตัวดี โดย DPPH จะเข้าทำปฏิกิริยาในระยะเวลาที่กำหนด ถ้า

สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน (Williams et al., 1994)

ใส่สารละลายของสารสกัดด้วยน้ำ (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดด้วยเอทานอล (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในเพลท 96 หลุม ๆ ละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ในเอทานอล (ความเข้มข้นสุดท้าย 78 ไมโครโมลาร์) ที่เตรียมใหม่ ๆ อีก 195 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ใช้วิตามินซีเป็นกลุ่มควบคุมบวก คำนวณค่า % scavenging ได้จากสมการ $[(A_a - A_b) \div A_a] \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (สารละลายทั้งหมดแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดและมีสารทดสอบ

จากรายงานวิธีของ Scherer และคณะ (Scherer and Godoy 2009) พบว่าความเข้มข้นของ DPPH ที่แตกต่างกันจะมีผลต่อค่า EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับที่เคยมีรายงานไว้ จึงคำนวณหาค่า antioxidant activity index (AAI) ได้จากสมการ AAI = ความเข้มข้นสุดท้ายของ DPPH $\div$ EC_{50}

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide ($O_2^{\cdot-}$) อาศัยปฏิกิริยาระหว่าง phenazine methosulfate และ nicotinamide adenine dinucleotide (PMS/NADH) ได้ $O_2^{\cdot-}$ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ nitrotetrazolium blue (NBT) ได้สารมีสีดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Valentão et al., 2001)

ใส่สารละลายของสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามด้วยสารผสมที่ประกอบด้วย NADH (166 ไมโครโมลาร์) NBT (43 ไมโครโมลาร์) และ PMS (2.7 ไมโครโมลาร์) ในบัฟเฟอร์ potassium phosphate (0.1 โมลาร์) ลงในเพลท 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที โดยมีปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ใช้ quercetin เป็นกลุ่มควบคุมบวก ค่า % scavenging คำนวณได้จากสมการ $[(A_a - A_b) \div A_a] \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (สารละลายทั้งหมดแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดและมีสารทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้าน H_2O_2

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้าน H_2O_2 อาศัยการเร่งปฏิกิริยาสลาย H_2O_2 ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) โดยมี guaiacol (ไม่มีสี) เป็นตัวให้โปรตอนเพื่อสลาย H_2O_2 ให้เป็น tetraguaiacol (สีน้ำตาลแดง) และน้ำ (Michot *et al.*, 1985) ดังสมการ

$$4\ \text{guaiacol} + 4\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{tetraguaiacol} + 8H_2O$$

เตรียม reaction mixture ประกอบด้วย H_2O_2 (0.5 มิลลิโมลาร์) สารละลายของสารสกัด (ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) guaiacol (0.01%) HRP (1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ potassium phosphate (0.1 โมลาร์ pH 7.4) ลงในเพลท 96 หลุมโดยมีปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ใช้วิตามินซีเป็นกลุ่มควบคุมบวก ค่า % scavenging คำนวณได้จากสมการ $[(A_a - A_b) \div A_a] \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (สารละลายทั้งหมดแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดและมีสารทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^•$

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^•$ ด้วยวิธี deoxyribose จะอาศัยปฏิกิริยา Fenton (Fe^{3+} + EDTA + H_2O_2 + ascorbic acid) ได้อนุมูลอิสระ $OH^·$ ออกมาเพื่อสลาย 2-deoxy-D-ribose ได้ malondialdehyde ซึ่งเมื่อเติม 2-thiobarbituric acid ในภาวะกรดและให้ความร้อนจะได้สารละลายสีชมพู ถ้าสารใดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาข้างต้นเท่ากับไปต้านการเกิดอนุมูลอิสระ $OH^•$ โดยสังเกตการฟอกจางสีชมพูที่เกิดขึ้นเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Hsu et al., 2006)

เตรียมสารผสมจำนวน 1 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย 2-deoxy-D-ribose (2.8 มิลลิโมลาร์) H_2O_2 (0.1 มิลลิโมลาร์) ascorbic acid (0.1 มิลลิโมลาร์) Fe^{3+}-EDTA ($FeCl_3$ 100 ไมโครโมลาร์ และ EDTA 104 ไมโครโมลาร์) ในบัฟเฟอร์ potassium phosphate (0.1 โมลาร์ pH 7.4) จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2-thiobarbituric acid (1% w/v) และ trichloroacetic acid (2.8% w/v) อย่างละ 1 มิลลิลิตร อุ่นที่ 100 องศานาน 15 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Hsu et al., 2006) ใช้ mannitol เป็นกลุ่มควบคุมบวก ค่า % scavenging คำนวณได้จากสมการ $[(A_a - A_b) \div A_a] \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (สารละลายทั้งหมดแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดและมีสารทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO•

หลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO• อาศัย sodium nitroprusside (SNP) ที่ physiological pH และถูกกระตุ้นด้วยแสงจะเป็นตัวให้ NO• ดังสมการ

$$[Fe(CN)_5(NO)]^{2-} \xrightarrow{pH\ 7.4,\ h\nu} NO^{\bullet} + [Fe(CN)_5H_2O)]^{2-}$$

NO• ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้เป็น NO_2^- ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยา diazotization กับ Griess reagent [sulfanilamide และ napthylethylenediaminedihydrochloride (NED)] ได้สารละลายสีชมพู ถ้าสารใดสามารถต้านอนุมูลอิสระ NO• จะไปแย่งทำปฏิกิริยากับ NO• ทำให้ปริมาณ NO_2^- ลดลง ทำให้สีชมพูลดลงตามไปด้วยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Jagetia et al., 2004)

เติมสารสกัด (ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร และ SNP ในบัฟเฟอร์ PBS (4 มิลลิโมลาร์ pH 7.4) จำนวน 80 ไมโครลิตรลงในเพลท 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีแสงเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เพื่อให้ปล่อย NO• ออกมาจาก SNP จากนั้นเติม Griess reagent จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่านาน 10 นาที ใช้ quercetin เป็นกลุ่มควบคุมบวก และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีชมพูที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ค่า % scavenging คำนวณได้จากสมการ $[(A_a - A_b) \div A_a] \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (สารละลายทั้งหมดแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดและมีสารทดสอบ

การศึกษาผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อเซลล์บุผิวหลอดเลือดดำ ECV304

การเพาะเลี้ยงเซลล์ ECV304

เซลล์บุผิวหลอดเลือดดำ human umbilical cord endothelial ECV304 cells (CLS Germany: Lot. No. 600560-2) เพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในอาหาร M199 ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum (FBS, 10%) และ penicillin-streptomycin (1%) บ่มเซลล์ใน CO_2 incubator อุณหภูมิ 37 องศา ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันด้วย EDTA (1 มิลลิโมลาร์) ผสมกับเอนไซม์ trypsin (0.25%) ในบัฟเฟอร์ PBS

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเพชรสังฆาตหรือ H_2O_2

หลักการวัดจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) โดยวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสาร MTT ซึ่งมีสีเหลืองสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงของ formazanโดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่พบเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตได้ผลึก formazan สีม่วงซึ่งละลายได้ใน DMSO วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Carmichael et al., 1987)

เลี้ยงเซลล์ ECV304 (ความหนาแน่น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในเพลท 96 หลุม บ่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5, 1, 2, 5, 8, 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือ H_2O_2 (ความเข้มข้นสุดท้าย 12.5, 25, 50, 100, 200 ไมโครโมลาร์) บ่มอีก 0.5, 6, 12, 24 ชั่วโมง โดยแต่ละหลุมจะควบคุมความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลาย DMSO เท่ากับ 0.5 % เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมสารละลาย MTT (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์) บ่มใน CO_2 incubator นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลาย MTT ออกและละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นในเซลล์มีชีวิตด้วย DMSO วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์คำนวณได้จากสมการ $(A_b \div A_a) \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

การทดสอบผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2

เลี้ยงเซลล์ ($1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในเพลท 96 หลุม บ่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มอีก 24 ชั่วโมง ต่อมาเติม H_2O_2 (100 ไมโครโมลาร์) บ่มนาน 0.5, 2 และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมสารละลาย MTT (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์) บ่มใน CO_2 incubator นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลาย MTT ออกและละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นในเซลล์มีชีวิตด้วย DMSO วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Kosem et al. 2007) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์คำนวณได้จากสมการ $(A_b \div A_a) \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษต่อยีนของเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี Comet

การศึกษาความเป็นพิษต่อยีนด้วยวิธี Comet อาศัยหลักการของ electrophoresis ในการตรวจหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกหักด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเลี้ยงเซลล์บนสไลด์ จากนั้นทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสก่อนนำไปทำ electrophoresis โดยดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกด้วยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่เป็นปฏิภาคผกผันกับขนาดดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่แตกหัก เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายหางฟุ้งออกมาจากส่วนของดีเอ็นเอหลัก (Bony et al., 2006)

เลี้ยงเซลล์ ECV304 ($2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม) ในเพลท 6 หลุม บ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย IC_{10}, IC_{25} และ IC_{50} ซึ่งได้จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์) บ่มอีก 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มควบคุมบวกจะบ่มเซลล์ด้วย H_2O_2 (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) นาน 30 นาที เก็บเซลล์ด้วย trypsin/EDTA นำเซลล์ที่ได้ ($1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน PBS) ผสมกับ 1% low melting agarose (1:1) หยดลงบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วย normal melting agarose (0.8%) รอจนเจลแข็งตัว จากนั้นนำสไลด์ไปแช่ใน lysis solution ประกอบด้วย NaCl (2.5 โมลาร์) EDTA (0.1 โมลาร์) Tris (10 มิลลิโมลาร์ pH 10) Triton X-100 (1% v/v) DMSO (10%v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศา นาน 1 ชั่วโมง ต่อมานำสไลด์ไปแช่ในบัฟเฟอร์ (NaOH 300 มิลลิโมลาร์ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH > 13) นาน 5 นาทีเพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียว นำไปทำ electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 25 โวลต์ (กระแสไฟฟ้า 300 มิลลิแอมแปร์) นาน 5 นาที ล้างสไลด์ด้วย neutralizing buffer (Tris 4 โมลาร์ pH 7.50) ตรึงดีเอ็นเอบนสไลด์ด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิห้องจนสไลด์แห้ง ย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR Green แล้วนำไปถ่ายรูปด้วย fluorescence microscope และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CometScore 1.5 (TriTek Ltd)

การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี DCFH-DA

หลักการวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยใช้สีย้อม dichlorodihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA) ซึ่งเป็นสารไม่มีขั้วจะซึมผ่านเข้าเซลล์และถูกเอนไซม์ esterase เปลี่ยนเป็น dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระภายในไซโตซอลจะถูกออกซิไดซ์โดยอาศัยเอนไซม์ peroxidase เปลี่ยนเป็น dichlorofluorescein (DCF) สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยปริมาณการเรืองแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Wang and Joseph, 1999)

การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเพชรสังฆาต หรือ H_2O_2

เลี้ยงเซลล์ ECV304 ($1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในเพลท 96 หลุมบ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือ H_2O_2 (ความเข้มข้นสุดท้าย 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์) บ่มต่ออีก 0.5, 2, 6, 12 หรือ 24 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS อีก 2 ครั้ง เติม DCFH-DA (5 ไมโครโมลาร์) บ่มอีก 30 นาที วัดการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น excitation 485 นาโนเมตรและ emission 535 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้จากสมการ $(A_b \div A_a) \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเพชรสังฆาตก่อนได้รับ H_2O_2

เลี้ยงเซลล์ ECV304 ($1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในเพลท 96 หลุมบ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS อีก 2 ครั้ง จากนั้นเติม DCFH-DA (5 ไมโครโมลาร์) บ่มอีก 30 นาที เทสารละลายสีย้อมออก ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น 2 ครั้ง จากนั้นเติม H_2O_2 (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์) บ่มต่อ 30 นาที วัดการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น excitation 485 นาโนเมตรและ emission 535 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้จากสมการ $(A_b \div A_a) \times 100$ โดยให้ A_a เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ) และ A_b เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนภายหลังเซลล์ได้รับสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยวิธี Western blotting

หลักการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting อาศัยการจำแนกโปรตีนตามขนาดด้วยอิเล็กโทโฟเรซิส ก่อนวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา

นำเซลล์มาบ่มกับสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในเพลท 6 หลุมนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม H_2O_2 (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์) บ่มอีก 6 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS รวบรวมเซลล์แล้วนำไปปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที นาน 8 นาที เก็บเซลล์ที่ตกตะกอนนำมาใส่ lysis buffer [ประกอบด้วย NaCl (300 มิลลิโมลาร์) Tris HCl (40 มิลลิโมลาร์ pH 7.4) Pefabloc (2 มิลลิโมลาร์) และ protease inhibitor] บ่ม 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4

องศา จากนั้นนำไปปั่นที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และส่วนน้ำใสที่เหลือเติม loading buffer [ประกอบด้วยTris-base (60 มิลลิโมลาร์ pH 6.8) SDS (2%) glycerol (25%) β-mercaptoethanol (14.4 มิลลิโมลาร์) และ bromophenol blue (0.1%)] และบ่มที่ 95 องศานาน 5 นาที ปิเปตโปรตีน (30 ไมโครกรัม) ลงในแต่ละหลุมของ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE สำหรับการวิเคราะห์ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, CAT, GPx จะใช้ 12% SDS-PAGE ขณะที่การวิเคราะห์ eNOS และ iNOS ใช้ 8% SDS-PAGE) โปรตีนบนเจลจะถ่ายไปยังเมมเบรน PVDF ซึ่งต่อมาแช่ใน 5% skimmed milk ใน TBST buffer [Tris-base (10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5) NaCl (0.1 โมลาร์) และ Tween 20 (0.05%)] ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเทบัฟเฟอร์และเติม primary antibody ได้แก่ Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, CAT, eNOS, iNOS และ β-actin ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศา ล้างเมมเบรนด้วย TBST buffer ก่อนที่เติม goat polyclonal secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1ชั่วโมง สามารถตรวจวัดแถบของโปรตีน Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx และ CAT ด้วย enhanced chemiluminescence detection reagent ก่อนประกบแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ สำหรับแถบของโปรตีน eNOS และ iNOS ใช้ gel documentation คำนวณความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ 1.41o (NIH, Bethesda, MD, USA)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยเครื่อง aggregometer อาศัยหลักการ light transmission โดยค่าการส่องผ่านแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และกำหนดให้ค่าการส่องผ่านแสงของ platelet rich plasma (PRP) เป็น 0% aggregation และ platelet poor plasma (PPP) เป็น 100% aggregation

การเตรียม platelet-rich plasma

เจาะเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีคนละ 30 มิลลิลิตร (ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมของการศึกษาวิจัยในมนุษย์ หมายเลข 09 – 33 - จธม. 017) โดยเก็บเลือดในหลอดที่บรรจุ 3.2 % sodium citrate ในอัตราส่วนเลือดต่อ sodium citrate เป็น 9:1 จากนั้นนำไปปั่นที่ 200 g นาน 10 นาที เก็บ PRP ส่วนบนไว้ใช้ในการศึกษาการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด จากนั้นนำส่วนที่เหลือไปปั่นต่อที่ 1,500 g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บส่วนของ PPP ไว้ใช้ในการเจือจาง PRP และไว้ใช้เป็น blank ในการศึกษาการวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจะนับจำนวนเกล็ดเลือดเมื่ออยู่ในช่วง 150,000 – 600,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร จึงนำมาใช้ในการทดสอบ (Chang et al., 2005)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของสารสกัดเพชรสังฆาต

ขั้นตอนการศึกษา ใส่ PRP 200 ไมโครลิตรลงในคิวเวทท์ที่เคลือบด้วยซิลิโคน พร้อมแท่งแม่เหล็กเพื่อการคน เติมสารทดสอบได้แก่ สารสกัดเพชรสังฆาต แอสไพริน (กลุ่มควบคุมบวก) หรือ DMSO (กลุ่มควบคุม) จำนวน 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำคิวเวทท์ไปใส่ในเครื่อง aggregometer โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นทำการคนแท่งแม่เหล็กที่ 600 รอบต่อนาทีและเริ่มวัดค่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด จากนั้น 1 นาทีเติม ADP 1-10 ไมโครโมลาร์เพื่อกระตุ้นให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกัน วัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยเครื่อง aggregometer เป็นเวลา 6 นาที ใช้ aspirin เป็นกลุ่มควบคุมบวก นำค่า % maximum aggregation มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (% inhibition) ได้จากสมการ (A-B) ÷ A] x100 โดยให้ A เป็นค่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสารทดสอบ) และ B เป็นค่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ได้รับสารทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.E.M.) ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ กรณีเปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลตั้งแต่ 2 กลุ่มใช้สถิติ student t-test สำหรับข้อมูลตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ร่วมกับ LSD post hoc ค่าสถิติที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ $p < 0.05$