

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากส่วนใบของต้นอินทนิลน้ำ (*Lagetroemiaspeciosa* (L.) Pers) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท บรอนสันแอนด์จาคอบส์อินเตอร์เนชันแนล จำกัด โดยถูกละลายและเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) 1 % และยางเลือดมังกร (*Croton Lecchleri* Muell. Arg) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท คอสมีเทค จำกัด ถูกละลายอยู่ในโพเพนไดออลต่อน้ำในอัตราส่วน 1:1 เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) 1 % สารสกัดที่เตรียมได้นำมาทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### 3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนมา

เซลล์เมลาโนมาของคน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. รัชนิย์ อุดมแสงเพชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10 % (10 % offetal bovine serum) และถูกอบในตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5 % มีการให้อาหารแก่เซลล์อย่างสม่ำเสมอทุก ๆ 2-3 วัน และเซลล์จะต้องถูก subculture ทุก ๆ สัปดาห์เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพพร้อมใช้งานและปลอดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์ให้เข้าไปใช้ห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) เนื่องจากเซลล์เมลาโนมาที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว (adherent cells) ในขั้นตอนการ subculture จึงต้องทำการย่อยเซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วย เอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด จึงนำเซลล์ดังกล่าวในจำนวนที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงต่อไป โดยขั้นตอนในการย่อยเซลล์มีดังนี้ 1) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (flask) ให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อไม่ให้มีอาหารเลี้ยงเซลล์เคลือบอยู่ เพราะโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเซลล์จะรบกวนการทำงานของสารละลายทริปซิน (Trypsin/EDTA) จากนั้นให้ดูดสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ทั้ง 2) เติมสารละลายทริปซิน (Trypsin/EDTA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในภาชนะเพื่อทำการย่อยเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ รอจนเซลล์หลุดออกจนหมด 3) เมื่อเซลล์หลุดหมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ ดูดฟันทิ้ง ๆ ให้เซลล์หลุดจากพื้นขวดและกระจายออกจากกัน จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่น (Centrifuge Tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง G8-15R -

centrifuge ที่ความเร็ว 1,600 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 4) ดูดน้ำส่วนบนทิ้งไป จะได้กลุ่มเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นหลอดปั่น ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ แบ่งเซลล์ที่ได้จากการย่อยเซลล์ไปนับจำนวนเซลล์ โดยนำเซลล์ที่ได้ไปย้อมด้วยสีทริแพนบลู (trypan blue) ในอัตราส่วน 1:10 (cell 10  $\mu$ l : trypan blue 90  $\mu$ l) จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer คำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ เซลล์ถูกนำไปเพาะเลี้ยงในภาชนะใหม่ต่อไป

### 3.3 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ (growth curve)

เป็นการหาค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ในแต่ละวัน เพื่อเลือกจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอินทนิลน้ำที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เมลาโนมา โดยเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  และ  $4 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ในอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10 % (10 % of fetal bovine serum) และถูกอบในตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) 5 % ในจานหลุม 6 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พร้อมทั้งทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) ทำการย่อยเซลล์ด้วยสารละลายทริปซิน (Trypsin) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวัน นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ในแต่ละวันมาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการเจริญของเซลล์ หรือค่า Doubling time คือ เวลาที่เซลล์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์ตั้งต้น (Freshney, 1987)

### 3.4 ศึกษาการเจริญของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร

ทำการทดสอบฤทธิ์สารสกัดอินทนิลน้ำต่อการเจริญของเซลล์ เนื่องจากสารสกัดอินทนิลน้ำมีลักษณะเป็นผงถูกละลายในดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethylsulfonyloxide) และยางเลือดมังกรถูกละลายอยู่ในโพรเพนไดออลต่อน้ำ (PW, Propanediol:Water) จึงทำการทดสอบฤทธิ์ของดีเอ็มเอสโอและโพรเพนไดออลต่อน้ำด้วย โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทนิลน้ำ ดีเอ็มเอสโอ ยางเลือดมังกรและโพรเพนไดออลต่อน้ำในความเข้มข้นของสารสกัดอินทนิลน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001 และ 0.01% ยางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ โพรเพนไดออลต่อน้ำที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032 และ 0.32% เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน พร้อมทั้งทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทุกวัน

### 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างการเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาวะควบคุมคือ ในอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10 % โดยไม่มีสารสกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดอินทินน้ำ และ ดีเอ็มเอสโอในความเข้มข้นของสารสกัดอินทินน้ำ 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และดีเอ็มเอสโอที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001 และ 0.01% ตามลำดับ ยางเลือดมังกรที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ โพรเพนไดออลต่อน้ำที่ความเข้มข้น 0.0032, 0.032 และ 0.32%เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้โปรแกรม SPSS v.11.5 เลือกใช้การวิเคราะห์แบบ Complete Randomized Design (CRD) หรือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p \leq 0.05$ )