

ผลการทดลองความสามารถด้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7 cells)

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

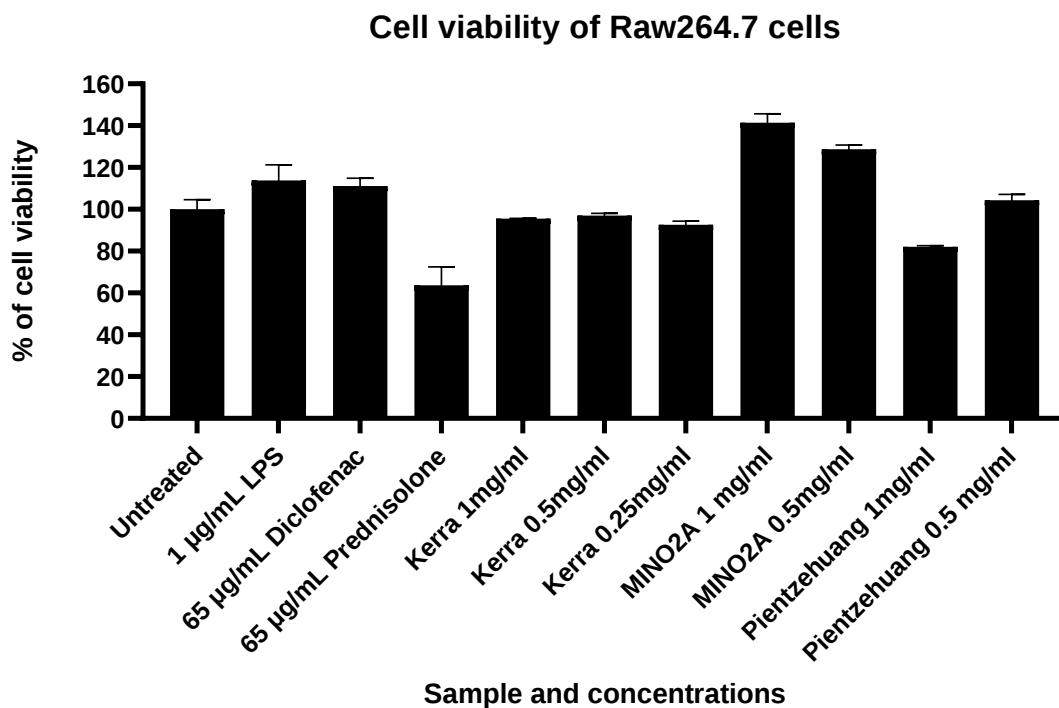
สารสกัดจาก KERRA THAI TRADITIONAL MEDICINE จำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการสกัดด้วย 95% Ethanol จากนั้นละลายด้วย 100% DMSO ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบคือ 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น และ MINO2A, Pientzhuang ละลายด้วย 100% DMSO ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบคือ 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 2 ความเข้มข้น

วิธีการทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium, Fetal Bovine serum (FBS) 10% และ 1% Anti-anti ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, CO₂ 5% ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อเซลล์หนาแน่นร้อยละ 80-90 ทำการย้ายเซลล์ไปยัง 96-well plate จำนวน 100,000 เซลล์ต่อหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 24 ชั่วโมงให้เซลล์ยึดเกาะกับ plate จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แทนที่ด้วยอาหารใหม่ที่มีสารตัวอย่างความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มนาน 24 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารมาทดสอบด้านการอักเสบ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ Griess reagent (เติม Sulfanilamide solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที จากนั้นเติม NED solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่ามาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมด้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจโดยใช้สูตรคำนวณ Anti-inflammation activity (%) = $\frac{A_{control} - A_{test}}{A_{control}}$ และดูดอาหารเก่าที่เหลือออกให้หมดแล้วแทนที่ด้วยอาหารใหม่ที่มีสารละลาย Presto blue ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

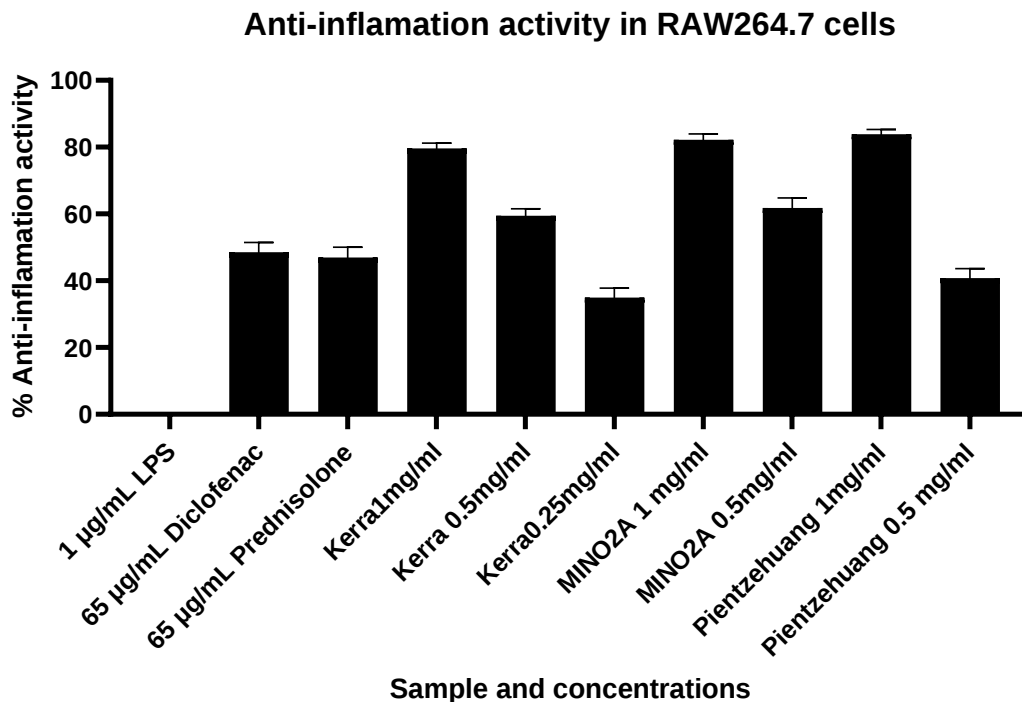
ผลการทดลอง

อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ ทดสอบโดย PrestoBlue™ Cell Viability Reagent



รูปที่ 1 กราฟแสดงร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7 cells) หลังจากทำการทดสอบกับตัวอย่าง KERRA, MINO2A และ Pientzhuang ที่ 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่าง KERRA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม (Untreated) โดยมีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ร้อยละ 95.51, 96.94 และ 92.65 ตามลำดับ ตัวอย่าง MINO2A และ Pientzhuang ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับตัวควบคุม (Untreated) เช่นกันโดยมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 141.39, 128.80, 82.00 และ 104.39 ตามลำดับ



รูปที่ 2 กราฟแสดงกิจกรรมด้านการอักเสบเซลล์ของแมคโครฟาจ (RAW264.7 cells) ที่ถูกทดสอบด้วยตัวอย่าง KERRA, MINO2A และ Pientzhuang ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองด้านการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ LPS เป็นตัวควบคุมเชิงลบโดยความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดลองคือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและมี Diclofenac เป็นตัวควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ Prednisolone ที่ความเข้มข้น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรค่ากิจกรรมด้านการอักเสบสูงที่สุดคือ Pientzhuang, MINO2A และ KERRA ตามลำดับโดยอยู่ที่ร้อยละ 83.84, 82.23 และ 79.66 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่ากิจกรรมด้านการอักเสบอยู่ที่ร้อยละ 40.75, 61.79 และ 59.46 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ KERRA มีค่ากิจกรรมด้านการอักเสบร้อยละ 34.99 ค่ากิจกรรมด้านการอักเสบของ Diclofenac และ Prednisolone ที่ความเข้มข้น 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละ 48.57 และ 46.99 ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า Pientzhuang ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่ากิจกรรมด้านการอักเสบได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารและความเข้มข้นอื่นๆ การรอดชีวิตของเซลล์มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 ตามด้วยสาร, MINO2A และ KERRA ที่มีค่ากิจกรรมด้านการอักเสบสูงรองลงมา Diclofenac และ Prednisolone มีค่าร้อยละของกิจกรรมด้านการอักเสบที่ต่ำกว่าสารตัวอย่างทั้งนี้ อันเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองของ Diclofenac และ Prednisolone มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองของสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด