บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองและสารเคมี

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

ในการทดลองนี้ cone photoreceptor-derived 661W cells จะได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Muayyad Al-ubaidi (University of Oklahoma, OK) ในการจัดเตรียม โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงใน culture medium ที่เตรียมจาก DMEM ซึ่งเสริมด้วย 10% heated activated fetal calf serum และ 1% penicillin/steptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) ในตู้อบที่มีอุณหภูมิภายใน 37°C พร้อมทั้งมีความชื้นที่เหมาะสมและมีความเข้มข้นของ CO_2 ที่ 5% ในการศึกษาส่วนใหญ่จะเลี้ยงเซลล์ใน 6-well plalte จนกระทั่งมีความหนาแน่นที่ 85% โดย berberine, dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย berberineและ DMEM ซึ่งเป็น media ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของ berberine ต่อ 661 W cells

นำ 661W cells มาเลี้ยงด้วย culture medium ใน 6-wells culture plate โดย incubate เซลล์ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C ในความชื้นที่เหมาะสม และบรรยากาศที่มี 5% CO_2 จนกระทั่งมีความหนาแน่นที่ 85% หลังจากนั้นให้เลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ที่เปลี่ยนใหม่หรือ DMSO (20 µl/ml) หรือ berberine (25-200 µM) อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนล้างเซลล์ด้วย culture medium และเลี้ยงต่อใน culture medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย incubate เซลล์ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C ในความชื้นที่เหมาะสม และบรรยากาศที่มี 5% CO_2 โดยกลุ่มควบคุมแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เลี้ยงใน culture media อย่างเดียวและกลุ่มที่ได้รับ culture medium ที่มี DMSO ที่ความเข้มข้นที่เท่ากันกับที่ใช้เป็นตัวทำละลายในกลุ่มที่ให้ berberine ซึ่งเท่ากับ 20 µl/ml สำหรับการศึกษานี้ หลังจากนั้น cell viability จะถูกตรวจสอบโดยใช้ trypan blue exclusion technique โดยมีหลักการที่ว่า trypan blue เป็นสีที่ไม่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายแล้ว trypan blue จะสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ทำให้เซลล์ที่ตายแล้วติดสีน้ำเงินของ trypan blue เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) โดยเซลล์ที่ติดและไม่ติดสีของ trypan blue จะถูกนับ และแสดงผลในรูปของ cell viability ที่เทียบเป็นร้อยละของเซลล์มีชีวิตของกลุ่มควบคุม

โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ประกอบในการเลือกใช้ความเข้มข้นของ berberine ที่จะใช้ในการทดลองอื่นๆ ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

การทดสอบหาขนาดที่เหมาะสมของ hydrogen peroxide ที่จะนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ 661W photoreptor ด้วย oxidative stress

เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate จนมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ 85% หลังจากนั้นเซลล์จะได้รับการเลี้ยงใน culture medium ใหม่ หรือ medium ที่มี H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 600, 800 และ 1000 µM อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ได้รับ culture medium อย่างเดียว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดย incubate ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C ในความชื้นที่เหมาะสม และบรรยากาศที่มี 5% CO_2 หลังจากนั้นทำการสังเกตและถ่ายภาพเซลล์ที่ศึกษาด้วยกล้อง phase contrast ต่อด้วยการหาค่า cell viability ซึ่งจะถูกตรวจสอบโดยใช้ trypan blue exclusion technique และแสดงผลในรูปของ cell viability ที่เทียบเป็นร้อยละของเซลล์มีชีวิตของกลุ่มควบคุม

การทดสอบหาขนาดที่เหมาะสมของ berberine ในการป้องกันการตายของ 661W cells ภายหลังได้ oxidative stress จาก H_2O_2

เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 6-well plate จนมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ 85% หลังจากนั้นเซลล์จะได้รับ berberine ที่ความเข้มข้น 50-100 µM โดยมีกลุ่มควบคุมที่ได้รับ culture media อย่างเดียวหรือ culture media ที่มีส่วนผสมของตัวทำละลาย (DMSO) ที่ความเข้มข้นที่เท่ากันกับที่ใช้ในกลุ่มที่ให้ berberine ซึ่งคือ 10 µl/ml อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดย incubate ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C ในความชื้นที่เหมาะสม และบรรยากาศที่มี 5% CO_2 หลังจากนั้นให้ล้างเซลล์ด้วย culture media ที่ไม่มี serum ก่อนจะ incubate ต่อด้วย condition เดียวกันด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100-400 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนล้างและปล่อยให้เซลล์อยู่ใน culture media ที่ไม่มี serum จากนั้นนำเซลล์ใน culture plate ไปส่องดูและบันทึกภาพผ่านกล้อง phase contrast ก่อนนำไปหาค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) โดยเทียบเป็นร้อยละของค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมโดยใช้ trypan blue exclusion technique

การศึกษาผลของ berberine ต่อการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของ 661W ภายหลังได้ oxidative stress จาก H_2O_2

เซลล์จะถูกเลี้ยงบน cover slips ที่อยู่ใน 6-well plate จนมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ 85% หลังจากนั้นเซลล์จะได้รับ berberine ที่ความเข้มข้น 100 µM โดยมีกลุ่มควบคุมที่ได้รับ culture media อย่างเดียวหรือ culture media ที่มีส่วนผสมของตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 µl/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดย incubate ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C ในความชื้นที่เหมาะสม และบรรยากาศที่มี 5% CO_2 หลังจากนั้นให้ล้างเซลล์ด้วย culture media ที่ไม่มี serum ก่อนจะ incubate ต่อด้วย condition เดียวกัน

ด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100-300 μM เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์บน cover slips มาล้างด้วย phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4 1 ครั้ง ก่อนที่จะตรึง (fixation) เซลล์ใน 4% methanol-free formaldehyde เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นให้ล้างเซลล์ 2 ครั้งใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจะ incubate เซลล์ด้วย DNA specific dye, Hoechst 33342 โดยลักษณะการเหี่ยวของเซลล์ (cell shrinkage) และการอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียส รวมทั้งการแตกของนิวเคลียสซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะได้ถูกศึกษา โดยเซลล์อย่างน้อย 500 เซลล์ จากภาพถ่ายจาก fluorescent microscope อย่างน้อย 5 fields จะถูกตรวจสอบและแสดงเป็น percent ของจำนวนเซลล์ที่มี condensed nuclei ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด

Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จะถูกแสดงเป็นค่า mean ± SEM ของการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งการทดลองแต่ละชนิด การวิเคราะห์ทางสถิติจะประเมินโดยใช้ SPSS version 15 ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (significance) จะถูกประเมินโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Turkey test หรือ pair t-test ที่ p-value น้อยกว่า 0.05