รหัสโครงการ SUT1-104-42-12-34

รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน

The Development of A Basic Immunotoxicology Assay

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2542

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2545

บทคัดย่อ

เพื่อแสวงหาพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน วิธีการทดสอบต่าง ๆ ด้านวิทยาระบบภูมิคุ้มกันได้ถูกดัดแปลงและพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าว โครงการวิจัยนี้ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบวิธีหนึ่งคือ mitogenesis assay และดัดแปลงวิธีวัดการตอบสนองของเซลล์ต่อ mitogen โดยวัดการเกิด bioreduction ของสีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็น formazan product แทนวิธีมาตรฐานที่วัดการใช้ [^{3}H]-thymidine ของเซลล์ ผลการทดสอบ MTT colorimetric assay เบื้องต้นพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT คือ 1 mg/ml สารละลาย DMSO เป็นตัวทำละลาย formazan product ที่ดีกว่า isopropanol และสามารถใช้ MTT colorimetric assay วัดปริมาณการแบ่งเซลล์ที่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เพราะมีความสัมพันธ์ที่สูงระหว่างปริมาณเซลล์ใน culture และค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ formazan product ทั้งในเซลล์ธรรมดา และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย concanavalin A (Con A) ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ mitogenesis เซลล์ถูกเตรียมจากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6J ที่ถูกพลีชีพด้วยวิธี cervical dislocation เซลล์ถูกบ่มใน 96 microtiter plate ร่วมกับ media ที่มีหรือไม่มี T cell mitogens (phytohemagglutinin; PHA และ Con A) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO_2 และความชื้น 95% ในระยะเวลาแตกต่างกัน ก่อนวัดการตอบสนองด้วยการใช้ MTT colorimetric assay ผลการทดลองพบว่า Con A สามารถกระตุ้น lymphocyte ได้สูงกว่า PHA เซลล์ที่ผ่านการกำจัดเม็ดเลือดแดงก่อนใช้ในการทดสอบให้ค่าการตอบสนองสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเม็ดเลือดแดง ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบคือ 4-8x10^{5}cells/well ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเซลล์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน 2-4 เท่า ความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมคือ 2.5-10 μg/ml และการตอบสนองสูงสุดเกิดในวันที่ 2 หลังจากกระตุ้นด้วย Con A การศึกษาระยะเวลาการเกิด reduction ของ MTT ใน culture พบว่าการเปลี่ยนแปลง MTT เป็น formazan product เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย 90% ของการเปลี่ยนแปลง MTT เกิดภายในหนึ่งชม. และมีค่าสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 4 ชม. การทดสอบ mitogenesis ที่ถูกดัดแปลงในงานวิจัยนี้สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้ร่วมกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ ด้านพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกันในการคัดเลือก หรือศึกษาผลของพืชสมุนไพรที่มีฤทธ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้

Abstract

In order to search for Thai medicinal plants with immunoregulatory activities, a battery of tests in immunology have been investigated as the screening tools. Here, we reported a modification and optimization of one test, mitogenesis assay, using the bioreduction of tetrazolium dye, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan product as alternate to the standard method of [^{3}H]-thymidine incorporation in cells for the measurement of lymphoproliferative responses to mitogens. Preliminary studies of MTT colorimetric assay indicated that the optimum final concentration of MTT in the culture was 1 mg/ml. DMSO was the better solvent than isopropanol in dissolving formazan product at the end of MTT incubation. The MTT colorimetric assay can be used to measue the proliferative response of cells as evidenced by a high relationship between the absorbance measurement at 590 nm with live-cell numbers from both normal and concanavalin A (Con A) activated lymphocyte. For the optimization studies of mitogenesis assay, female C57Bl/6J mice were sacrificed by cervical dislocation, spleens were aseptically removed, pooled, and the single cell suspensions were prepared. Different concentrations of splenocytes were cultured in replicates with media or with different concentrations of T cell mitogens , Con A or phytoheamagglutinin A (PHA), in a flat-bottomed 96 well plate. The cultures were incubated in 5% CO_2 at 37^{o}C for different periods of time. The proliferative responses were measured using the MTT colorimetric method. Results of the studies indicated that Con A was able to induce stronger mitogenic response compared to PHA. The assay performed with pre-lysed red blood cell splenocytes gave higher mitogenic response compared to non-lysed cells. The optimum cell number of culture was 4-8x10^5 cells/well. Results from titering concentration of Con A mitogen showed the optimum response at 2.5-10 μg/ml, and the peak response occurred on day 2 after ConA sensitization. The kinetics of bioreduction of MTT by proliferating lymphocytes was rapid and the formation of the formazan product was at 90% of maximum within 1 hr. and almost reached its plateau in 4 hr. The modified mitogenesis with MTT colorimetric method in this study could be used with other immunotoxicology test methods to screen, or study the effects of medicinal plants with immunomodulating activities in the future.