

การเลือกวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการ ศึกษาในหลอดทดลอง

Selection of Appropriate Methods Analysis of Cytotoxicity Assay for *In Vitro* Study

สิริรักษ์ มู่เก็ม, วท.ม.¹, เสาวนีย์ เมืองจันทร์บุรี, วท.ม.²

Sirirak Mukem, MSc.¹, Saowanee Maungchanburi, MSc.²

¹สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160 ประเทศไทย

²สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์และวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่
จังหวัดสงขลา 90110 ประเทศไทย

¹School of Medicine, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand.

²Department of Biomedical Sciences and Biomedical Engineering, Faculty of Medicine,
Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand.

บทคัดย่อ

ความมีชีวิตของเซลล์ หมายถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับการ
ทำความเข้าใจกลไกการทำงานและความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์หรือการตายของเซลล์หลังจากได้
รับสารต่าง ๆ เช่น สารสีกัดหยาบ สารประกอบบริสุทธิ์ และยา ปัจจุบันมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างกว้างขวางเพื่อ
ประเมินคุณลักษณะทางพิษวิทยาและเภสัชวิทยา การทดสอบความมีชีวิตเป็นการตรวจหาการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวน
เซลล์ ดังนั้นการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จึงสำคัญสำหรับการประเมินสารทดสอบว่าส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือ
เป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงหรือไม่ หลักฐานที่รวบรวมมาแสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะใช้การทดสอบโดยใช้เซลล์แบบใดก็ตาม สิ่งสำคัญ
ที่ควรคำนึงถึงคือ มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลือเท่าไรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยมีวิธีการทดสอบที่หลากหลาย เช่น ประเมินความเสี
หายของโครงสร้างเซลล์ (ทั้งวิธีแบบไม่รุกรานและรุกรานเซลล์) โดยการนับจำนวนเซลล์ การวัดกิจกรรมการเผาผลาญของ
เซลล์ และการตรวจสอบปริมาณ deoxyribonucleic acid และ adenosine triphosphate ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อ
สรุปว่าวิธีใดถูกต้องและเหมาะสมที่สุด เนื่องจากทุกงานวิจัยมีความแตกต่างและข้อจำกัด ดังนั้นควรพิจารณาเลือกการทดสอบ
ความมีชีวิตที่เหมาะสมกับประเภทของเซลล์ โมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของสาร ความเข้มข้นของสาร ตลอดจนวิธีการสกัดสาร

Corresponding author: Saowanee Maungchanburi, MSc.
Department of Biomedical Sciences and Biomedical Engineering,
Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand.
E-mail: msawane@medicine.psu.ac.th
doi: 10.31584/psumj.2023254768
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/PSUMJ/>

PSU Med J 2023;3(2):85-91
Received 10 February 2022
Revised 13 June 2022
Accepted 14 June 2022
Published online 7 July 2023

การทบทวนนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมทั้งข้อดีและข้อเสีย นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่จะเลือกความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม ไม่ให้ผลลัพธ์ที่เป็นเท็จ และเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำของการออกแบบการวิจัย

คำสำคัญ: การศึกษาในหลอดทดลอง; ความเป็นพิษต่อเซลล์; ความมีชีวิตของเซลล์

ABSTRACT

Cell viability is defined as the number of living cells and the proliferation of cells. It is a vital indicator for understanding mechanisms of action and cytotoxicity that involve cell survival or cell death following exposure to agents, including crude extract, pure compounds and drugs. A broad spectrum of cytotoxicity assay is currently used to estimate toxicology and pharmacology. In fact, methods used to determine viability are typical for the detection of cell growth and cell proliferation. Therefore, cytotoxicity assays are essentially utilized for agent screening to detect whether the test molecules affect cell proliferation or directly display cytotoxic effects. Accumulating evidence demonstrated that regardless of the cell-based assay being used, it is crucial to know how many viable cells remain at the end of the experiment. There are various assay methods based on various functions, such as evaluating structural cell damage (non-invasive and invasive) by cell counting assay, measuring cellular metabolism activity, and determining deoxyribonucleic acid and adenosine triphosphate contents. However, there is no conclusion on whether any method is most accurate and appropriate. Since every research has differentiations and limitations, choosing the proper viability assay, the cell type, the constituent molecule of the substance, concentration and even the extraction method should be considered. This particular review aims to provide information on different cytotoxicity assays together with their own advantages and disadvantages. Additionally, it may be possible to select the appropriate agent concentration, have no false-positive results, and increase the reproducibility of their research design.

Keywords: cell viability; cytotoxicity; *in vitro* study

บทนำ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) เริ่มมีการศึกษาอย่างยาวนาน อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูล และสอดคล้องกับรูปแบบระเบียบวิจัยที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสารทดสอบหรือใช้ในการคัดกรองความปลอดภัยของสารเคมี โดยตรวจสอบจากความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ซึ่งข้อมูลด้านพิษวิทยาจะช่วยให้การออกแบบการวิจัยบรรลุผล

ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้สารทดสอบในปริมาณที่เหมาะสม ไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิด จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการประเมินฤทธิ์ของสารทดสอบทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ เช่น การนับจำนวนเซลล์ (cell counting) วัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ (metabolic activity) วัดกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ (enzyme activity) วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และวัดปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ (determining deoxyribonucleic acid (DNA) measurement) จุดมุ่งหมายของการทบทวนบทความนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของวิธีการทดสอบความ

เป็นพิษต่อเซลล์รูปแบบต่าง ๆ นำไปสู่การเลือกใช้วิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์จากสารทดสอบได้อย่างเหมาะสมและสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การศึกษาวิจัย โดยมีวิธีทดสอบดังต่อไปนี้

1. การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ (metabolic activity)

1.1 การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์จากสีย้อม tetrazolium เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์ทางอ้อมที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย สามารถทำได้หลายวิธี เช่น 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) และ tetrazolium dye reduction assays (WST-8)¹⁻³

1.1.1 MTT assay เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Mosmann เมื่อปี ค.ศ. 1983 หลักการสำคัญของ MTT assay คือ การวัดประสิทธิภาพของ mitochondrial succinate dehydrogenase ใน cytochrome b และ cytochrome c ของเซลล์มีชีวิตที่มีความสามารถในการตัดแยกวงแหวน tetrazole ได้ จากนั้น MTT จะถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric assay) จากสีเหลืองของ MTT เป็นผลิตภัณฑ์ของ MTT formazan ที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีที่ได้จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยปริมาณของสีที่เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ที่บ่งบอกกิจกรรมการเผาผลาญหรือเมตาบอลิซึมของเซลล์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต การเจริญของเซลล์ในเชิงคุณภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารทดสอบ⁴ MTT assay จึงเป็นการทดสอบเบื้องต้น (primary screening) ที่ทำให้ทราบความเข้มข้นของสารทดสอบที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-lethal dose) และทราบค่า inhibitory concentration (IC_{50}) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50% ทั้งนี้การศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) พบว่าการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT สามารถใช้คาดการณ์การเลือกเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง ใช้ทำนายการไวต่อยาหรือการดื้อยาได้อย่างแม่นยำแต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Karakas และคณะ (2017)¹⁶ พบว่าการทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทานอลในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT มักให้ผลการมีชีวิตของเซลล์เป็นบวกเชิงเทียม (false-positive) ที่อาจนำไปสู่การประเมินค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่สูงเกินไปและทำให้ประเมินศักยภาพของสารทดสอบกับความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าความเป็นจริง⁵⁻⁷ นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยพบว่า MTT สามารถกระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีบทบาทสำคัญในการตายของเซลล์ที่ตั้งโปรแกรมไว้ เช่น caspase-8, caspase-3 หรือเร่งการรื้อของเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากเปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan⁸ ดังนั้น เวลาในการบ่ม MTT เพื่อวัดความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารทดสอบอาจเป็นปัจจัยที่ต้องตระหนักให้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม MTT assay ยังคงเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมและยังคงเป็นการตรวจมาตรฐานสูงสุด (gold standard) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์⁹

1.1.2 Tetrazolium dye reduction assays (WST-8) หรือ WST-8/1-mPMS ใช้ตรวจสอบความมีชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเชิงคุณภาพ¹⁰ เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดที่ใช้ตรวจหา NAD(P)H ในการเพิ่มจำนวนเซลล์และการลดลงของ tetrazolium salt โดย NAD(P)H ที่เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ formazan เป็นสีย้อมสีส้มที่วัดความยาวคลื่นสูงสุดที่ 450 นาโนเมตร การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า WST-8 มีความไว โดยเฉพาะที่ pH เป็นกลาง¹¹ และยังถูกใช้ในการวัดเชิงคุณภาพของกิจกรรมเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase; G6PD) อีกด้วย¹²

1.2 การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์จากสีย้อม neutral red เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบการทำงานของเซลล์ออร์แกเนลล์ เพื่อประเมินการทำงานของไลโซโซม ทั้งนี้สีแดงของ neutral red จะสามารถซึมผ่านเข้าไปในไลโซโซมได้ โดยปกติไลโซโซมของเซลล์ที่มีชีวิตจะมีสภาวะเป็นกรดทำให้เกิด pH gradient ที่ให้ neutral red ซึมผ่านเข้าไปและสะสมอยู่ใน lysosome ขณะที่เซลล์ตายจะไม่เกิดกิจกรรมดังกล่าวนี้ แปลผลความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง¹³

1.3 การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์จากปริมาณเอทีพีภายในเซลล์ (adenosine triphosphate; ATP detection assay) ATP คือ สารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ที่มีชีวิต มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเผาผลาญของเซลล์¹⁴ การตรวจหาปริมาณ ATP จึงเป็นอีก

วิธีที่เหมาะสมในการประเมินความมีชีวิตของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารทดสอบ นิยมใช้ในการประเมินความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของสภาพแวดล้อมของโรงพยาบาลหรืออุตสาหกรรม¹⁵ ซึ่งสามารถวัดปริมาณ ATP ภายในเซลล์ได้ 2 วิธี คือ luminescent และ colorimetric/fluorometric ดังนี้ (1) luminescent เป็นการวัดปริมาณ ATP ในเซลล์ที่นิยมใช้มาเป็นเวลานานและใช้มากกว่าวิธีที่การวัดแบบ colorimetric/fluorometric โดยมีหลักการคือ การย่อยหรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกเพื่อปลดปล่อย

ATP ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสารยับยั้ง ATPase activity จากนั้นทำการวัดปริมาณ ATP โดยการใช้อนุพันธ์ลูซิเฟอริน ลูซิเฟอเรส ไปโอลูมิเนสเซนส์ (luciferin-luciferase bioluminescence reaction) ที่ทำให้เกิดการเปล่งแสง bioluminescence ออกมา ซึ่งสามารถวัดปริมาณแสงที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate-based luminometer (2) colorimetric/fluorometric เป็นการวัดปริมาณ ATP ในเซลล์โดยอาศัย phosphorylation of glycerol ที่สามารถวัดค่าด้วยวิธี colorimetric ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และวิธี fluorometric ที่ช่วงการดูดกลืนแสง (excitation)/คายแสง (emission) คือ 535/587 นาโนเมตร

วิธีการดังกล่าวนี้ทำได้ง่ายมีความไวสูงและเชื่อถือได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทดสอบด้วย MTT assay เนื่องจากมีคุณสมบัติปราศจากการถูกรบกวน และเพื่อลดผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ใช้ผลบวกเชิงเทียมจาก MTT assay¹⁶ ทั้งนี้ในสภาวะปกติเซลล์ที่มีชีวิตจะสร้างสามารถสร้างพลังงาน ATP อยู่ตลอดเวลา แต่จะไม่สะสมไว้ในเซลล์ในปริมาณมากจนเกินไป เพราะเซลล์มีกิจกรรมที่ต้องใช้ ATP อยู่ตลอดเวลา เช่น sodium-potassium adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) ในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) มีหน้าที่รักษาระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีปัจจัยภายนอกมากระตุ้น (resting membrane potential) เป็นต้น ดังนั้นความเข้มข้นของ ATP ที่สูงขึ้นจึงบ่งชี้ว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามสภาวะที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือใกล้ตายจะสร้าง ATP ได้น้อยลง และทันทีที่เซลล์ตายปริมาณการสร้าง ATP จะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นปริมาณ ATP ที่วัดได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง จึงเป็นดัชนีบ่งบอกทั้งได้คุณภาพและจำนวนเซลล์มีชีวิต¹⁷

1.4 การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมด้วยวิธี Resazurin reduction assay เพื่อลดข้อจำกัดหรือผลกระทบต่อเซลล์ที่เกิดจาก MTT assay การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ด้วย PrestoBlue จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะสม เนื่องจาก PrestoBlue เป็นสารประกอบ resazurin ที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้สามารถวัดแบบ kinetic assay ได้ รวมถึงเซลล์ที่ใช้วัดแล้วสามารถนำมาทำการทดลองต่อได้² โดยมีหลักการคือ เป็นการวัดสภาวะ reduction environment (mitochondrial reductase) ของเซลล์และเป็นวิธีหลักการเปลี่ยนแปลงสี เช่นเดียวกันกับ MTT assay ทั้งนี้เมื่อสารละลาย PrestoBlue เข้าสู่เซลล์ จะถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase และเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารเรืองแสงสีแดง เรียกว่า resorufin อย่างไรก็ตามความเข้มของสีแดงที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับสภาวะ reducing ของเซลล์ ที่บ่งบอกความมีชีวิตของเซลล์และกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ในเชิงปริมาณ สิ่งสำคัญที่เป็นข้อได้เปรียบของ PrestoBlue คือมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเซลล์มีชีวิต เนื่องจากเซลล์ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสารประกอบ resazurin เป็น resorufin ได้ จึงไม่เกิดสัญญาณเรืองแสงขึ้น¹⁸

2. การวัดการเจริญของเซลล์ (cell growth) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation)

2.1 การนับจำนวนเซลล์ (cell counting assay) เป็นวิธีพื้นฐานสำหรับตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์แบบทางตรง การนับจำนวนเซลล์ทำได้ด้วยการย้อมด้วยสี trypan blue โดยหลักการแล้ว trypan blue สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ตายแล้วได้เท่านั้น จึงสามารถนับแยกจำนวนเซลล์เป็นหรือเซลล์ตายได้ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ปัจจุบันนี้วิธีการนับเซลล์ได้พัฒนาให้มีความแม่นยำมากขึ้นยิ่งขึ้น โดยการใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (automated cell counter)¹⁹⁻²⁰

2.2 การวัดการเจริญของเซลล์จากสีย้อมที่เป็นสัดส่วนกับมวลเซลล์โดยรวม เช่น วัดปริมาณโปรตีนด้วย sulforhodamine B (SRB) หรือวัดปริมาณ DNA ด้วย CyQuant cell proliferation assay

2.2.1 Sulforhodamine B (SRB) เริ่มมีการใช้ตั้งแต่ปี 1990²¹ และใช้อย่างแพร่หลาย เป็นวิธีการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วยสีที่เป็น anionic protein stain โดย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีทดสอบ (assays)	ข้อดี (advantages)	ข้อเสีย (disadvantages)
การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ (metabolic activity)		
MTT assay	- ทำได้ง่าย และราคาไม่แพง - มีความแม่นยำ - เวลาในการบ่ม (2-4 ชั่วโมง)	- มีความไวต่อแสง - ให้ผลบวกเชิงเทียม (false-positive) ได้ - ต้องวัดที่จุดยุติ (end point assay) เท่านั้น จึงเป็นวิธีการวัดความมีชีวิตของเซลล์แบบทางอ้อม เนื่องจาก MTT เมื่อถูก reduced ให้เป็นผลึก formazan จะต้องทำการละลายด้วย DMSO ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงนั้นๆ ไม่สามารถนำไปใช้หรือศึกษาต่อได้
WST-8 assay	- ทำได้ง่าย - มีความไว (sensitivity) และความแม่นยำสูง	- ราคาแพง (consistency) - เป็นสารที่มีพิษ (poisonous) เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) และเป็นอันตรายหากสูดดมหรือกลืน หากสัมผัสสดุดซึมได้ทางผิวหนัง ตา และระบบหายใจ
Neutral red uptake (NRU) assay	- ทำได้ง่าย และราคาค่อนข้างถูก	- ไม่เหมาะกับการทดสอบในสารที่ส่งผลต่อการทำงานของไลโซโซม
ATP detection assay	- ทำได้ง่าย รวดเร็ว และทำได้ปริมาณมาก - มีความไวสูง - มีความแม่นยำสูงมาก ให้ผลทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ - ช่วงเวลาทดสอบสั้น: luminescent (30 นาที) และ colorimetric/fluorometric (1 ชั่วโมง)	- ราคาสูง
Resazurin reduction assay: PrestoBlue	- เซลล์สามารถนำมาทำการทดลองต่อได้ เนื่องจากสาร resazurin สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ - สามารถวัดแบบ kinetic assay ได้ - มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเซลล์มีชีวิต - มีความไวสูง สามารถวัดเซลล์ปริมาณน้อยได้ - เวลาในการบ่มสั้น (10 ถึง 30 นาที)²⁵⁻²⁷ - สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นาน 7 วัน หลังจากทำการทดสอบ โดยไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทดสอบอื่น²⁸	- เกิดสภาวะรบกวน เนื่องจาก superoxide ภายในเซลล์มีผลต่อสีขุ่น
การวัดการเจริญของเซลล์ (cell growth)		
Cell counting assay	- ตรวจสอบความเป็นอยู่ที่ดีของเซลล์ได้ - ทำได้ง่าย - Trypan blue: ราคาถูก - Automated cell counter: มีความแม่นยำสูง	- ต้องวัดที่จุดยุติ (end point assay) เท่านั้น - Trypan blue จะให้ผลการประเมินความมีชีวิตค่อนข้างสูงเกินไป (overestimated)²⁹ ทำให้ข้อมูลที่ได้อาจมีความแม่นยำและเที่ยงตรง
Sulphorhodamine B (SRB) assay	- ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก	- ต้องวัดที่จุดยุติ (end point assay) เท่านั้น
CyQuant	- ทำได้ง่ายและรวดเร็ว - มีความไวสูง - ใช้เซลล์ในปริมาณที่น้อยได้ (ตั้งแต่ 10-50 เซลล์ ไปจนถึง 25,000-50,000 เซลล์) และให้ผลแม่นยำมากกว่าการนับเซลล์³⁰	- ต้องมีการทำซ้ำหลายครั้งเพื่อความแม่นยำ และให้ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่สามารถยอมรับได้

โมเลกุลของสีมี sulfonic group 2 หมู่ ที่จับโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน ๆ วิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งเซลล์เกาะผิว (adherent cell) และเซลล์แขวนลอย (suspended cell)²² โดยหลังจากตรึงเซลล์ด้วย trichloroacetic Acid (TCA) และบ่มกับ SRB ใน acetic acid หลังจากนั้นล้างสีส่วนเกินออกทิ้งไว้ให้แห้งแล้วสกัดสีที่จับอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ด้วย tris base buffer วัดค่าความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร ทั้งนี้ความเข้มของสีจะมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ นอกจากนี้ SRB ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินการแสดงออกของยีนจากการศึกษาด้วยวิธี knockdown หรือ miRNA ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์²³

2.2.2 CyQuant cell proliferation assay ในกรณีที่สารทดสอบหรือยาบางชนิดมีผลรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์และอาจทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่มีความเที่ยงตรงหรือไม่ถูกต้องการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถแปรผันตรงกันกับความมีชีวิตของเซลล์และบอกอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้โดยตรงและมีความถูกต้องที่สุด ได้แก่ CyQuant cell proliferation assay ที่ใช้หลักการของสี green fluorescent ซึ่งสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้และเมื่อจับกับสายของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ปริมาณความเข้มของสีฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA content ในแต่ละเซลล์และบ่งบอกปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า CyQuant มีความเหมาะสมมีความไวสูงในการใช้คัดกรองยาต้านมาลาเรียจำนวนมากในหลอดทดลอง²⁴ วิธีนี้อาจจะเหมาะสำหรับเซลล์ยึดเกาะ (adherent cell) มากกว่าเซลล์แขวนลอย (suspended cell) เนื่องจากสีฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมจับกับ DNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายแต่ในขั้นตอนการวัดสามารถจัดเซลล์ตายออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทดสอบด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ CyQUAN NF ได้ (ตารางที่ 1)

สรุป

จากการบททวนวรรณกรรม ได้ข้อสรุปว่าการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารทดสอบ โดยการวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ของเซลล์จากสีย้อม tetrazolium เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายไม่สูง และเชื่อถือได้ อย่างไร

ก็ตามประสิทธิภาพของเอนไซม์เมตาบอลิซึมขึ้นอยู่กับตัวแปรมากมาย เช่น ชนิดของเซลล์ ระยะเวลาของการทดสอบ วิธีการสกัดสารสมุนไพรรวมถึงแหล่งที่จะส่งผลการมีชีวิตของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ ในขณะที่การตรวจวัดปริมาณ ATP assay ภายในเซลล์ หรือ CyQuant ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำในการวัดปริมาณ DNA ภายในเซลล์แต่อาจจะต้องตระหนักถึงองค์ประกอบของสารทดสอบด้วย เช่น ปริมาณเกลือและโปรตีนที่อาจรบกวนความจำเพาะเจาะจงของการตรวจปริมาณ DNA เป็นต้น ดังนั้นควรเลือกวิธีการศึกษาให้เหมาะสมกับสภาวะพื้นฐานของเซลล์สารทดสอบและวัตถุประสงค์ของการศึกษา จึงสรุปได้ การเลือกวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองอาจจะต้องใช้มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลประสิทธิภาพหรือความเป็นพิษของเซลล์ทดสอบที่มีความเที่ยง เชื่อถือได้ และแม่นยำมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;p.127-52.
2. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hubner H. Basic Colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol Bio* 2017;1601:1-17.
3. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blazquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labelin perspectives. *Acta Histochem* 2018;120:159-67.
4. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
5. Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy* 2004;50:43-50.
6. Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro* 2008;22:232-9.
7. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 45:108-11.
8. Lü, L, Zhang L, Wai MS, Yew DT, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol In Vitro* 2012; 26:636-44.
9. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium

- bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Note* 2015;8:47.
10. Tahara H, Matsuda S, Yamamoto Y, Yoshizawa H, Fujita M, Katsuoka Y, et al. High-content image analysis (HCIA) assay has the highest correlation with direct counting cell suspension compared to the ATP, WST-8 and Alamar blue assays for measurement of cyto-toxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2017;88(Pt 1):92-9.
 11. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 1997;44:1299-305.
 12. Espino FE, Bibit JA, Sornillo JB, Tan A, von Seidlein L, Ley B. Comparison of three screening test kits for G6PD enzyme deficiency: implications for Its Use in the radical cure of vivax malaria in remote and resource-poor areas in the Philippines. *PLoS One* 2016;11:e0148172.
 13. Gomez-Gutierrez JG, Bhutiani N, McNally MW, Chuong P, Yin W, Jones MA, et al. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro. *Biotech Histochem* 2021;96:302-10.
 14. Lu L, Li B, Ding S, Fan Y, Wang S, Sun C, Zhao M, Zhao CX, Zhang F. NIR-II bioluminescence for in vivo high contrast imaging and in situ ATP-mediated metastases tracing. *Nat Commun* 2020;11:4192.
 15. Whyte C, Ma TF, Sindelar J, Rankin S. Rapid hygiene assay sensitive to cumulative adenylate homologues exhibits equal or higher frequencies of soil contamination detection than assay limited to ATP detection. *J Food Prot* 2021;84:1937-44.
 16. Karakas D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol* 2017;41:919-25.
 17. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [monograph on the Internet]. Bethesda (MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [cited 2022 Jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
 18. ThermoFisher.com. Invitrogen, "Presto Blue cell viability reagent protocol," Product information sheet by life technologies. [homepage on the Internet] Waltham: Thermo Fisher Scientific; 2012 [cited 2021 Dec 2]. Available from: <https://www.thermoFisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermoFisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0018370PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>
 19. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011;740:7-12.
 20. Cadena-Herrera D, Esparza-De Lara JE, Ramírez-Ibañez ND, Lopez-Morales CA, Perez NO, Flores-Ortiz LF, et al. Validation of three viable-cell counting methods: manual, semi-automated, and automated. *Biotechnol Rep (Amst)* 2015;7:9-16.
 21. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107-12.
 22. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio Protoc* 2016;6:e1984.
 23. Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana EA, Zhao J, Shimer E, et al. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2015;34:3547-55.
 24. Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Riscoe M, Wilairat P. Cyquant cell proliferation assay as a fluorescence-based method for in vitro screening of antimalarial activity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;35:840-4.
 25. Lall N, Henley-Smith CJ, De Canha MN, Oosthuizen CB, Berrington D. Viability reagent, presto blue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int J Microbiol* 2013;420601.
 26. Boncler M, Rozalski M, Krajewska U, Podsedek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2014;69:9-16.
 27. Gonzalez Gonzalez M, Cichon I, Scisłowska-Czarnecka A, Kolaczowska E. Challenges in 3D culturing of neutrophils: Assessment of cell viability. *J Immunol Methods* 2018;457:73-7.
 28. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2015;71:1-7.
 29. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 1993;9:671-674.
 30. Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 2001;254:85-98.