

การเตรียมสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง

เพื่อศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโต
และการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว

Preparation of crude red kidney bean extract for growth stimulation and cell division of peripheral blood mononuclear cells



สิงห์คำ ธิมา¹
Singkome Tima¹

กริธา ดอนเลย์²
Greeta Donle²

¹ แผนกวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ปีการศึกษา 2553 สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹ Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology,
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Thailand.

² The 4th year Medical Technology student, Academic year 2010,
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบบทความ

* Corresponding author

Abstract

Phytohemagglutinin (PHA) is a lectin extracted from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* Linn). It has been widely used as mitogen for lymphocyte culture and chromosome study. However, commercial PHA is expensive. This study aimed to prepare crude red kidney bean extract and study its effect on cell growth and cell division (mitosis) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) at the different concentrations ranking from 0 to 100 µg/mL using MTT assay and conventional chromosome culture and karyotyping, respectively. The results showed that crude red kidney bean extract was able to stimulate growth of PBMCs in a dose and time dependent manner. Moreover, the crude extract at 25 µg/mL demonstrated the maximal stimulation on cell growth. Nevertheless, crude extract at high concentrations (50 and 100 µg/mL) were likely to decrease rate of cell growth and proliferation. In addition, crude red kidney bean extract induce cell division was detected in various concentrations (5-25 µg/mL). The highest number of metaphase cell was found when stimulate with 25 µg/mL of crude red kidney bean extract. In summary, crude red kidney bean extract demonstrated an excellent stimulation on cell growth and cell division of PBMCs. It can be used for chromosome culture and karyotyping. However, the further investigation of the crude red kidney bean extract's properties should be performed to develop its quality and apply for laboratory used in the future.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* Linn, Mitosis, Metaphase, Phytohemagglutinin, PBMCs

บทคัดย่อ

ไฟโตฮีแมกกลูตินิน (Phytohemagglutinin; PHA) คือเลคตินชนิดหนึ่งที่สกัดจากถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* Linn) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) ของเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมได้ แต่ PHA บริสุทธิ์ที่จำหน่ายอยู่ตามท้องตลาดมีราคาแพง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบตั้งแต่ 0 ถึง 100 µg/mL นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดหยาบในการกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ PBMCs เพื่อศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี conventional chromosome culture and karyotyping จากการศึกษพบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงมีแนวโน้มในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 25 µg/mL สามารถกระตุ้นได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้นสูง ๆ (50, 100 µg/mL) เริ่มทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs มีแนวโน้มที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 25 µg/mL สามารถกระตุ้นให้เซลล์ PBMCs แบ่งตัวแบบไมโทซิส และมีโครโมโซมระยะเมตาเฟส (metaphase) ได้มากที่สุด จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่สกัดได้มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เซลล์ PBMCs เกิดการแบ่งตัวแบบไมโทซิส และสามารถทำ chromosome culture and karyotyping ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาคูณสมบัติของสารสกัดหยาบดังกล่าวต่อไป เพื่อพัฒนาคุณภาพของสารสกัดให้ดียิ่งขึ้น และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้จริงในอนาคต

คำรหัส: ถั่วแดงหลวง ไมโทซิส เมตาเฟส ไฟโตฮีแมกกลูตินิน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว

บทนำ

ถั่วแดงหลวงเป็นพืชล้มลุกซึ่งมีต้นกำเนิดในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ชาวยุโรปและอเมริกาเรียกชื่อโดยทั่วไปว่า red kidney bean เนื่องจากรูปร่างของเมล็ดถั่วแดงหลวงมีลักษณะคล้ายไต มีตั้งแต่สีชมพู แดงอ่อน แดงเข้ม น้ำตาล เกือบดำ โดยถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรกโดยโครงการหลวงในปี พ.ศ. 2516 เพื่อจุดประสงค์ให้ชาวไทยภูเขาปลูกเป็นพืชทดแทนฝิ่นและช่วยรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินบนที่สูง ปัจจุบันถั่วแดงหลวงได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของชาวไทยภูเขาและเป็นที่สนใจของเกษตรกรในพื้นที่ราบทั่วไปในเขตภาคเหนือ ถั่วแดงหลวงจัดอยู่ใน Genus *Phaseolus* มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phaseolus vulgaris* Linn. ถั่วแดงหลวงเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ใบและลำต้นมีลักษณะคล้ายถั่วเหลืองมาก ลักษณะเป็นทรงพุ่มตั้งตรง มีความสูงตั้งแต่ 40-65 เซนติเมตร (ซม.) รูปร่างของใบส่วนมากด้านโคนใบจะกลมส่วนด้านปลายใบจะแหลมขนาดของใบกว้างประมาณ 5-10 ซม. และยาวประมาณ 8-15 ซม. ดอกของถั่วแดงหลวงจะรวมกันเป็นช่อ ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศมีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีของ

ดอกจะเป็นสีขาวหรือชมพูขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฝักถั่วมีความยาวประมาณ 8-10 ซม. กว้าง 1.2-1.5 ซม. โดยเมล็ดมีความยาวประมาณ 0.8-1.5 ซม. และกว้างประมาณ 0.4 ซม.¹ ถั่วแดงหลวงประกอบไปด้วยสารชีวโมเลกุลต่างๆ มากมาย แต่องค์ประกอบที่ผู้วิจัยสนใจในการศึกษาค้นครั้งนี้คือไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phytohemagglutinin; PHA)

ไฟโตฮีแมกกลูตินิน เป็นเลคติน (lectin) ชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากพืช เช่น พืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในถั่วแดงหลวง โดยในระยะแรก ๆ เลคตินถูกเรียกว่า phytohemagglutinin หรือ agglutinin เนื่องจากมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ไฟโตฮีแมกกลูตินินเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนหรือมิวโคโปรตีน ประกอบด้วย leucoagglutinating (L)-subunit และ erythroagglutinating (E)-subunit รวมตัวกันเป็นโครงสร้าง tetrameric structure ซึ่งสามารถประกอบกันเป็นไอโซเลคติน 5 ชนิด ได้แก่ L_4 , L_3E_1 , L_2E_2 , L_1E_3 และ E_4 โดยพบว่า E-subunit และ L-subunit มีน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกันแต่มีความจำเพาะต่อ carbohydrate

binding site ที่แตกต่างกัน² ทั้งนี้ L-subunits ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะกลุ่มกัน และช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว ในขณะที่ E-subunit ทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน โดยคุณสมบัติเหล่านี้อาศัย specific sugar binding site ของ PHA ที่แตกต่างกัน³ สำหรับคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์นั้นพบว่า PHA สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และโมโนไซต์ (monocyte) โดยอาศัยการจับกับ specific oligosaccharide ของ receptor บนผิวเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และเพิ่ม metabolite permeability ของผนังเซลล์ ส่งผลให้มีการนำสารสำคัญต่าง ๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส, กรดอะมิโน และอิออนต่าง ๆ มีการเติมหมู่ phosphate ให้แก่โปรตีนในนิวเคลียส ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของไขมัน และโปรตีน จนส่งผลให้เซลล์เร่งสร้างอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน ทำให้เซลล์มีขนาดโตขึ้นและรูปร่างเปลี่ยนแปลงภายในระยะเวลา 10-20 ชั่วโมง จากนั้นหลังถูกกระตุ้นประมาณ 48 ชั่วโมง เซลล์จะเริ่มมีการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) และต่อมาเซลล์จึงแบ่งตัว^{4, 5}

การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Rigas และคณะ⁶ ได้เสนอวิธีการสกัดโปรตีนจากถั่วแดงหลวงอยู่ 2 วิธีคือการสกัดด้วย 1% NaCl และ 0.1N HCl ซึ่งพบว่าได้โปรตีนที่แตกต่างกัน โดยวิธีแรกได้ mucoprotein PHA ในขณะที่การสกัดด้วย 0.1N HCl จะได้ active protein PHA ซึ่งเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดการเกาะกลุ่มพบว่า active protein PHA มีความสามารถที่มากกว่า mucoprotein PHA นอกจากนี้ Dahlgren และคณะ⁷ ได้สกัดและแยกไฟโตแมกกลูตินินจากถั่วแดงหลวง ด้วยวิธี saline extraction และแยกด้วยวิธี gel filtration column chromatography พบว่าสามารถแยกได้เป็น 2 ส่วน โดยไฟโตแมกกลูตินินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 82,000 ดาลตัน และพบว่าทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้มีลักษณะเช่นเดียวกันและใกล้เคียงกันมาก และเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มและการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ผลปรากฏว่าไฟโตแมกกลูตินินทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม และกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ได้เหมือนกัน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) นอกจากนี้ในปี ค.ศ 1977 Leavitt และคณะ⁸ ได้สกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงด้วยวิธี saline extraction จากนั้นนำไป dialysis ในน้ำกลั่น แล้วระเหิดแห้งด้วย lyophilizer แล้วนำผงสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยก PHA ด้วยวิธี ion exchange chromatography พบว่าสามารถแยก PHA ได้ 5 ส่วนคือ L_4 ,

L_3E_1 , L_2E_2 , L_1E_3 , E_4

เนื่องจาก PHA มีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) โดยใช้เป็นตัวกระตุ้น (mitogenic stimulant) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาลักษณะ และความผิดปกติของโครโมโซม ต้องใช้สารสกัด PHA ที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยเฉพาะ L_4 ไอโซเลคติน (PHA- L_4) ซึ่งมีราคาแพง การศึกษานี้จึงมุ่งทำการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง และนำมาศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) เพื่อนำสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่สกัดได้เองมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง

นำถั่วแดงหลวง (ผลิตภัณฑ์จากมูลนิธิโครงการหลวง) มาสกัดโดยวิธี saline extraction ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Leavitt และคณะ⁸ โดยมีรายละเอียดดังนี้ ชั่งถั่วแดงหลวง 10 กรัม แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นให้พูน โดยแช่ข้ามคืนในตู้เย็น เมื่อครบเวลานำถั่วแดงที่แช่ไว้มาปั่นร่วมกับน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (0.85% saline solution; normal saline solution; NSS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปเก็บไว้ในตู้เย็นข้ามคืน เมื่อครบเวลาดูเก็บส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วแยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดเก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำไปทำ dialysis ในน้ำกลั่นปลอดอิออน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ dialysis bag ที่มี MW cut-off 5,000 ดาลตัน เมื่อครบเวลานำสารละลายที่ผ่านการทำ dialysis มาบรรจุในขวดสำหรับการทำ lyophilize แล้วนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C หลังจากนั้น lyophilize เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง หา % yield และหาปริมาณโปรตีนรวมในสารสกัดหยาบที่สกัดได้ด้วยวิธี Folin-Lowry method⁹ เก็บผงสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

2. การเตรียมเซลล์ PBMCs

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (venepuncture) คนสุขภาพดี ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยผสมรวมกับสารกันเลือดแข็ง heparin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม sterile phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงค่อย ๆ เติม Ficoll-hypaque ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำ

เลือดไปปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วน PBMCs ปั่นล้างเซลล์ PBMCs ด้วย sterile PBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที แล้วทดสอบที่เกี่ยวข้องต่อไป

3. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ด้วยวิธี MTT assay โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1×10^6 cells/mL ใน 96-well tissue culture plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยในกลุ่มควบคุม (vehicle control) เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบต่อไปอีก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม MTT dye solution แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 nm คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ได้

4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ PBMCs ด้วยวิธี conventional chromosome culture and karyotyping

เพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs ปริมาณ 1×10^6 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 20, และ 25 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 71 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มควบคุมเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสม phosphate buffer saline (PBS) ครบเวลาเติมสาร colcemid ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยทำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเติม 0.56% หรือ 0.075 M KCl

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมน้ำและเขย่าไปพร้อมๆ กัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 นาที ครบเวลาปั่นตกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำ Carnoy's fixative (Glacial acetic acid 1 ส่วน ต่อ methanol 3 ส่วน) ที่เตรียมใหม่ และแช่เย็นที่ -20 °C ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายใช้ปริมาตร Carnoy's fixative 0.5-1 มิลลิลิตร ผสมตะกอนเซลล์กับ Carnoy's fixative ให้เข้ากัน แล้วหยดลงบนสไลด์แช่เย็นที่ -20 °C โดยวางสไลด์ทำมุมเอียง 30 องศา กับแนวระนาบ และให้ระยะการหยดสูงประมาณ 1-2 เมตร จากนั้นนำสไลด์ที่เตรียมได้มาย้อมโครโมโซมด้วยสี Wright-Giemsa stain และตรวจนับ metaphase cell ต่อเซลล์ PBMCs 500 เซลล์ และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ metaphase cell ต่อไป

ผลการศึกษา

1. ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง

จากการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงด้วยวิธี saline-extraction พบว่าได้น้ำหนักของสารสกัดหยาบภายหลังการทำ lyophilized เท่ากับ 0.391 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 3.91% และมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs ร่วมกับสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-5 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ได้ โดยมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงขึ้นไปจนถึง 100 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ 3 และยังพบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นสูงๆ (50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$) เริ่มทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs มีแนวโน้มที่ลดลงดังแสดงในรูปที่ 2

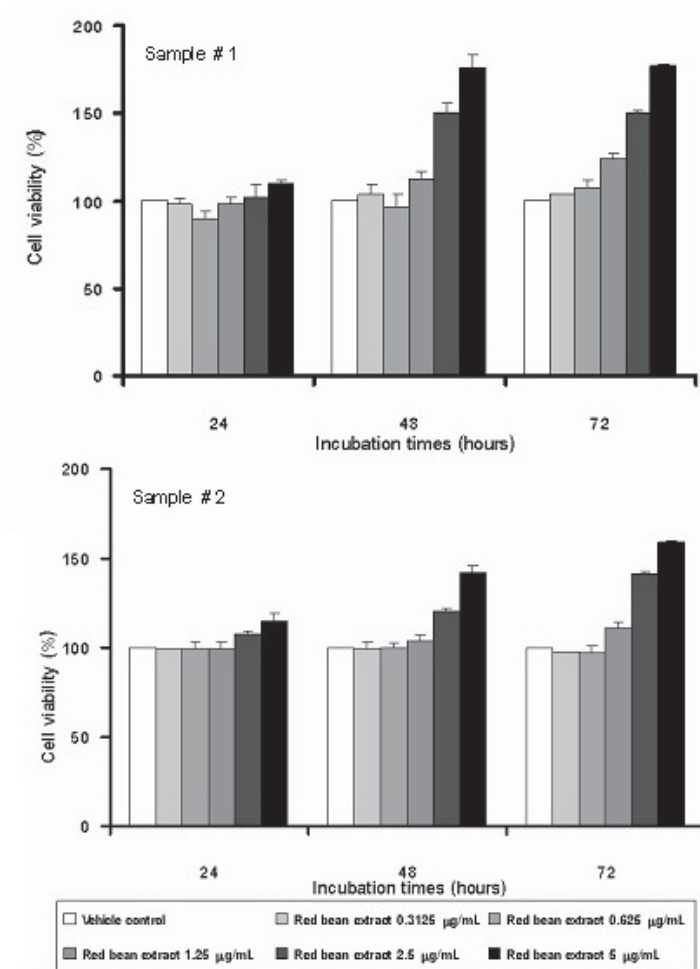


Figure 1: Effect of crude red kidney bean extract (0.3125 to 5 µg/mL) on PBMCs growth in 24, 48, and 72 hours of experiment compared with the vehicle control by MTT assay

Note: Each point represents the mean value $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate

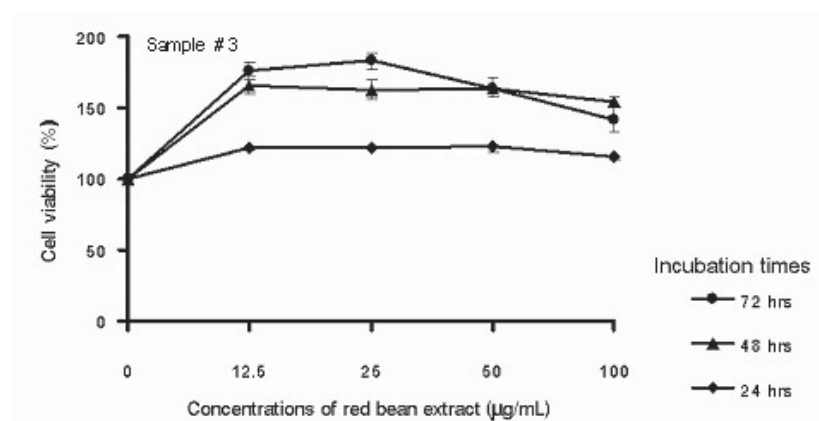


Figure 2: Effect of crude red kidney bean extract (12.5 to 100 µg/mL) on PBMCs growth in 24, 48, and 72 hours of experiment compared with the vehicle control by MTT assay

Note: Each point represents the mean value $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate

3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการกระตุ้นการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ของเซลล์ PBMCs ด้วยวิธี conventional chromosome culture and karyotyping

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs

(1×10^6 cells/5 mL media) ร่วมกับสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้น 5-25 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงสามารถกระตุ้นให้เซลล์ PBMCs เกิดการแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้ (รูปที่ 3) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงมีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์

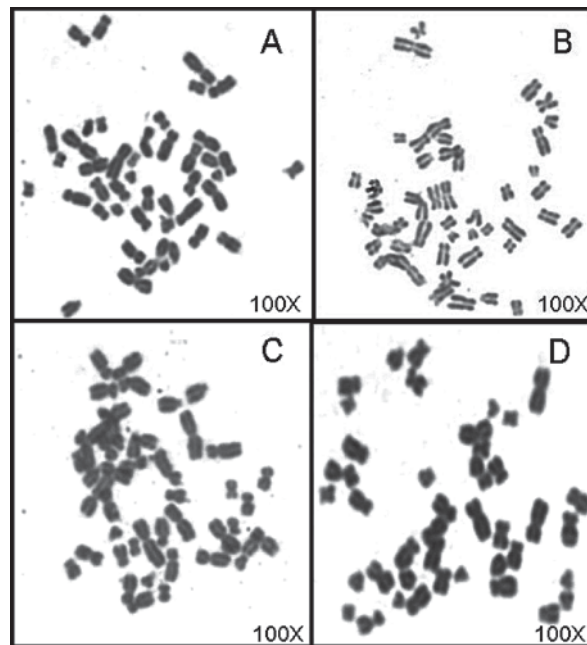


Figure 3: Example of metaphase chromosomes which harvested from PBMCs samples after 72 hours of treatment with 25 $\mu\text{g/mL}$ crude red kidney bean extract

Note: Three independent experiments were performed. The example of metaphase chromosomes from the first experiment (A), the second experiment (B), and the third experiment (C&D) were shown

PBMCs ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, และ 25 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวน metaphase cell เท่ากับ 1.6%, 2.2%, 2.5%, และ 5.5% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุม ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 เพียงอย่างเดียวไม่พบ metaphase cell เลย และเมื่อได้โครโมโซมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs ด้วยสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ มาทำ karyotyping จะได้ดังแสดงในรูปที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงด้วยวิธี saline extraction method และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Folin-Lowry method พบว่ามี % yield เท่ากับ 3.91% และมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 13 mg/mL ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของภาณุวัฒน์ ดันดิเสรีรัตน์¹⁰ ที่สกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงด้วยวิธี saline extraction และพบว่า

ได้ % yield เท่ากับ 5.34% นอกจากนี้สุพรรณษา ปาตะ ในปี ค.ศ 2003¹¹ ได้สกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงด้วยวิธี saline extraction method และได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 18 mg/mL อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Leavitt และคณะ⁸ พบว่าสามารถสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงได้ โดยมี % yield เท่ากับ 15.5% ซึ่งมีปริมาณที่มากกว่าผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของถั่วแดงหลวงที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน จึงทำให้ได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่มากกว่าผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ทั้งนี้หากพิจารณาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือวิธี saline extraction นั้นจะพบว่าเป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงได้ และมีข้อดีคือมีค่าใช้จ่ายในการสกัดที่ต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้การระเหิดแห้ง (lyophilized) สารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงเพื่อเก็บสารสกัดหยาบไว้ในรูปผงแห้งยังเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บสารสกัดหยาบให้มีอายุ

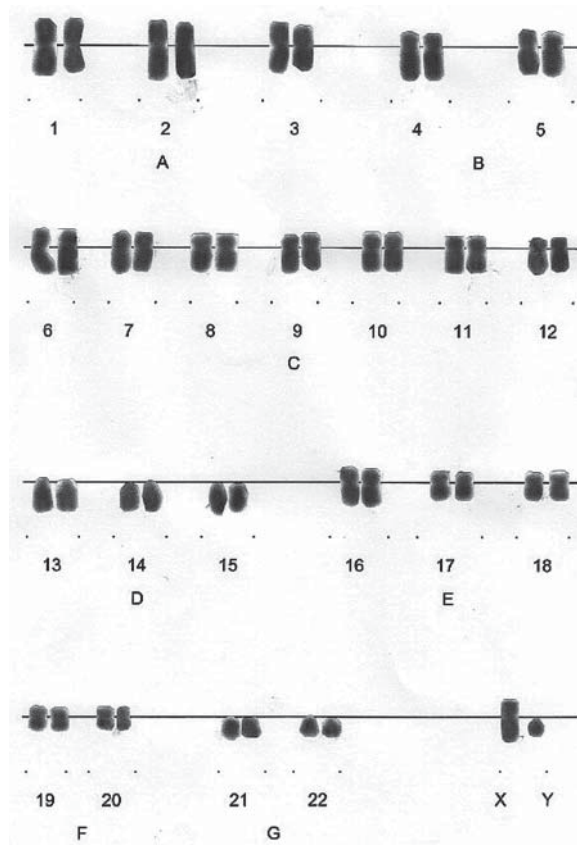


Figure 4: Example of chromosome karyotype, which prepared from PBMCs sample after induced with 25 µg/mL crude red kidney bean extract for 72 hours

การใช้งานที่ยาวนานขึ้นอีกด้วย

หลังจากได้สารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงแล้ว จึงนำมาศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงต่ออัตราการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 µg/mL พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีแนวโน้มที่จะกระตุ้นให้เซลล์ PBMCs มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น (dose and time dependent manner) โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้น 25 µg/mL มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ PBMCs มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อคณะผู้ทำการวิจัยเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับการทดลองใช้สารสกัด PHA-L บริสุทธิ์ (Biochrom AG; Berlin, Germany) ที่ความเข้มข้น 0-5 µg/mL พบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้นเดียวกันสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ได้น้อยกว่าสารสกัด PHA-L บริสุทธิ์ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ทั้งนี้อาจเกิดจากสารสกัดจากถั่วแดงหลวงที่สกัดได้นี้เป็นเพียงสารสกัดหยาบ จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นเดียวกันกับสารสกัด PHA-L บริสุทธิ์ นั้นสารสกัด

หยาบที่สกัดได้มีปริมาณของ PHA-L₄ (isolectin L₄) ซึ่งมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปริมาณที่น้อยกว่าสารสกัด PHA-L บริสุทธิ์ ซึ่งเป็น purified PHA-L₄ ทั้งหมด โดยจากการศึกษาสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงของ Ren และคณะ² พบว่ามี PHA เป็นองค์ประกอบประมาณ 2 % และเมื่อทำการแยกชนิด isolectin ต่าง ๆ ของ PHA พบว่ามีปริมาณของ isolectin L₄, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃, E₄ คิดเป็น 7.44%, 10.75%, 13.06%, 15.88%, 52.88% ตามลำดับ จึงเป็นเหตุผลที่สนับสนุนผลการทดลองครั้งนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้นสูง ๆ (50 และ 100 µg/mL) เริ่มทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs มีแนวโน้มที่ลดลง และคาดว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบให้มากกว่า 100 µg/mL ขึ้นไปน่าจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs ชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงทำให้ปริมาณ PHA ในสารสกัดหยาบจากถั่วหลวงมีปริมาณสูงขึ้นจนทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ren และคณะ² ที่พบว่าความเข้มข้นสูง ๆ ของ PHA-L₄ จะแสดงความเป็นพิษต่อ

เซลล์ลิมโฟไซต์ นอกจากเหตุผลข้างต้นแล้วยังอาจเกิดจาก สารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่ใช้ในการทดลองนี้มีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs หรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PHA ปนอยู่ ซึ่งที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงน้อยๆ ยังไม่แสดงผลที่ชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงทำให้ความเข้มข้นของสารดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มขึ้น จึงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs หรือยับยั้งการทำงานของ PHA ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งต้องมีการตรวจพิสูจน์ต่อไปในอนาคต

หลังจากศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงต่ออัตราการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs พบว่าที่ความเข้มข้น 25 µg/mL มีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ PBMCs ได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 25 µg/mL มาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงในการกระตุ้นเซลล์ PBMCs ให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส พบว่าสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่มีความเข้มข้นต่างๆ มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวแบบไมโทซิสได้ โดยสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงสามารถกระตุ้นให้เกิด metaphase cell เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวงที่เพิ่มสูงขึ้น (dose dependent manner) และพบว่าที่ความเข้มข้น 25 µg/mL สามารถกระตุ้นให้เกิด metaphase cell มากที่สุด (5.5%) ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งผล

ต่อการเกิด metaphase cell นั้นมีหลายปัจจัย เช่น ปริมาณเซลล์ที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาถึงความเหมาะสมของปัจจัยดังกล่าวต่อไป นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองก็อาจส่งผลต่อผลการทดสอบได้ เช่น สารละลาย hypotonic solution (0.56 % KCl) หากมีความเข้มข้นน้อยเกินไปก็อาจทำให้เซลล์แตกก่อนถึงขั้นตอนการตรึงเซลล์ได้ หรือหากมีความเข้มข้นมากเกินไปก็จะทำให้เซลล์ไม่บวม ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ยังคงพบลักษณะของเซลล์ที่มีลักษณะที่บวมไม่เต็มที่และไม่แตก ทำให้ได้ metaphase cell ที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็นได้ ซึ่งหากทำการศึกษาถึงความเหมาะสมของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ก็อาจทำให้ได้ metaphase cell ที่เพิ่มสูงขึ้นได้

การศึกษานี้เป็นการเริ่มต้นสกัดสารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง และศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ PBMCs ซึ่งถือได้ว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากถั่วแดงหลวงที่สกัดได้นี้ยังเป็นสารสกัดหยาบ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาและพัฒนาคุณภาพของสารสกัดดังกล่าวให้ดียิ่งขึ้น เช่น การแยกเอาเฉพาะส่วน PHA หรือการแยกชนิดของ PHA isolectin ชนิดต่างๆ ออกมา เพื่อนำสารสกัดที่พัฒนาได้มาทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ และใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น การศึกษาผลกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และใช้ประโยชน์ในการศึกษาโครโมโซมต่อไป



คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณแขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และแขนงวิชาอื่นๆ ในภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำการทดลอง ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ทรงยศ อนุชปรีดา และ อ.วารุณี คำสายใย ที่ให้ความรู้ และอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำ dialysis และการทำระเหิดแห้ง (lyophilization) สารสกัดหยาบจากถั่วแดงหลวง ขอขอบคุณ อ.สมศักดิ์ จันทน์น้อย คุณฟ้า เชื้อหงษ์ทอง และ คุณสุวรรณา เสมศรี ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการศึกษาดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

1. Srichuwong S. Red kidney bean. Chiang Mai: Faculty of Agriculture,
2. Chiang Mai University, 1983.
3. Ren J, Shi J, Kakuda Y, Kim D, Xue SJ, Zhao M, *et al.* Phytohemagglutinin isolectins extracted and purified from red kidney beans and its cytotoxicity on human H9 lymphoma cell line. Separation and Purification Technology. 2008; 63: 122-8.
4. Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science. 1972; 177 (53): 949-59.
5. Liener IE, Sharon N, Goldstain IJ. The lectins. Florida: Academic press INC; 1986.
6. Hamerton J. Human Cytogenetics. General cytogenetics vol. 1. New York: London Academic press; 1971.
7. Rigas DA, Osgood EE. Purification and properties of the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J Biol Chem. 1955; 212 (2): 607-15.
8. Dahlgren K, Porath J, Lindahl-Kiessling K. On the purification of phytohemagglutinins from Phaseolus vulgaris seeds. Arch Biochem Biophys. 1970; 137 (2); 306-14.
9. Leavitt RD, Felsted RL, Bachur NR. Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris isolectins. J Biol Chem. 1977; 252 (9): 2961-6.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193 (1): 265-75.
11. Tontisareerat P. Effects of phytohemagglutinin extracted from red kidney beans (Phaseolus vulgaris Linn.) on growth and division of human lymphocytes cultured *in vitro*. [Independent study, Master of Sciences (Teaching Biology)]. Chiang Mai: Chiang Mai University, 1988.
12. Pata S. Lectins extraction from various beans. [Term paper, Bachelor of Sciences (Medical Technology)]. Chiang Mai: Chiang Mai University, 2000.