

นิพนธ์ต้นฉบับ

เลคตินสกัดจากเมล็ดถั่วแปบียกระตุ้น Phagocytosis: ศึกษาด้วยวิธี Immunofluorescence

สุกัญญา เชยยิ่ง* ปกรณ์ ไทยานันท์**

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของ lectin อย่างกว้างขวางทั้งการนำมาเป็นอาหารเสริมยารักษาโรคและเสริมภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารเลคตินจากถั่วแปบียต่อเม็ดเลือดขาวชนิด phagocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ชนิด innate immunity ของร่างกาย วิธีการศึกษา phagocytosis โดยนำเม็ดเลือดขาวจำนวน 1×10^7 cells/ml 1 ส่วนผสมกับ *C.albicans* ที่เคลือบด้วยสารเรืองแสง FITC จำนวน 1×10^6 cells/ml 1 ส่วน อบไว้ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วนำเซลล์มาส่องดูด้วยกล้องเรืองแสงกำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่เกิด phagocytosis จะเห็นยีสต์เซลล์เรืองแสงอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดขาว จากการศึกษาพบว่าเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยเลคตินจากถั่วแปบียเกิด phagocytosis อยู่ในช่วง 72–98% ค่าเฉลี่ย 87% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 6.5% ในขณะที่เม็ดเลือดขาวที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเลคตินมี phagocytosis อยู่ในช่วง 41–64% ค่าเฉลี่ย 51% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 5.5% เมื่อคำนวณหาค่าทางสถิติพบว่าทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) จึงสรุปได้ว่าสารเลคตินที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วแปบียสามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวของคนให้เกิด phagocytosis ได้สูงขึ้นจริงและน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านการแพทย์และการวิจัยต่อไปได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2547; 37: 19-25.

คำรหัส: ถั่วแปบีย, *C.albicans*, Phagocytosis, Lectin

* หน่วยจุลทรรศนศาสตร์ งานปฏิบัติการกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Lectin from Seed of *Plaseolus liam* Induced Phagocytosis: Study by Immunofluorescent Technique

Sukanya Dechyng * Pakorn Thaiyanan **

Presently, lectins are worldwide studied in various aspects ie. food supplements, medicines and immunopotentiations. This research, therefore, aims to study the effect of lectin from seed of *P.liam* on phagocytosis which plays important role in innate immunity of body defence. In the study of phagocytosis, 1 volume of 1×10^7 cells/ml of white blood cells was mixed with 1 volume of 1×10^6 cells/ml of *C. albicans* labeled with FITC and incubated at 37 °C for 30 minutes. Phagocytes examined by fluorescent microscope (400x) and screened for the fluorescent yeast cells in cytoplasm. It was found that phagocytes mixed with lectin significantly induced phagocytosis with ranged 72–98%, mean 87% and S.D of 6.5% while in control groups, the range was 41–64 %, mean 51% and S.D of 5.8%($p < 0.001$). In conclusion, lectin from seed of *P.liam* was able to induce phagocytosis which might provide advantages in medicine and research purposes. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2004; 37: 19-25.

Key words : *Plaseolus Iiam*, *C.albicans*, Phagocytosis, Immunofluorescent technique Lectin

* Clinical Microscopy Section, Central Laboratory, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

** Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

บทนำ

กระบวนการ phagocytosis เป็นระบบป้องกันแบบหนึ่งของร่างกายเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามารุกรานเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมหรือตัวเชื้อโรค เรียกว่า phagocyte ในการจับกินสิ่งแปลกปลอมถ้ามีแอนติบอดีเข้ามาร่วมด้วยจะทำให้การจับกินมีประสิทธิภาพสูงขึ้น¹ โดยที่แอนติบอดีทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน

กับ phagocyte จึงทำให้ เซลล์สามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมได้ง่ายขึ้น ทำนองเดียวกันเลคติน (lectin) ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับส่วนคาร์โบไฮเดรตในไกลโคโปรตีนของตัวเชื้อโรคและเม็ดเลือดขาว (phagocyte) ได้ ฉะนั้นเลคตินจึงน่าจะทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับแอนติบอดี และจากการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วพบว่าเลคตินจากถั่วแปบียสามารถทำให้เม็ดเลือดขาวเกาะกลุ่มกันได้^{2,3} งานวิจัยนี้

จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเลคตินจากเมล็ดถั่วแปบต่อการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis การประเมิน phagocytosis ใช้เทคนิค Immunofluorescence ปกติแล้วนิยมใช้วิธีย้อมด้วยสี wright stain แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) ซึ่งการตรวจนับ phagocyte ที่กินตัวเชื้อ (phagocytosis) ใช้เวลานานกว่าวิธี IF และหากใช้เชื้อแบคทีเรียในการศึกษาจะยิ่งทำให้การอ่านผลยากกว่าการใช้เชื้อยีสต์เนื่องจากมีขนาดเล็กมาก และอาจทำให้นับผิดพลาดได้ งานวิจัยนี้จึงใช้วิธี IF เป็นเทคนิคสำหรับการศึกษา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการเคลื่อนสารเรืองแสงบนผิวของ yeast cell โดยใช้แอนติบอดี เป็นตัวเชื่อมและศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วแปบต่อกระบวนการ phagocytosis

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมเม็ดเลือดขาว

เจาะเลือดจากคนปกติ จำนวน 30 ราย โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง เติม 6% dextran solution ปริมาตร 2 ml ลงไป จากนั้นผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง แล้วนำไปวางเอียง 45° ในตู้เย็นอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลาแล้วดูดของเหลวส่วนบนมาปั่นล้างด้วย PBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง นับและปรับเม็ดเลือดขาวที่ได้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 เซลล์/มล.

การเตรียม yeast cells

ใช้เชื้อ *Candida albicans* ที่เลี้ยงในอาหาร Trypticase soy agar นำมาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ standard McFarland No. 0.5 ซึ่งจะมีจำนวน yeast cell ประมาณ 1×10^6 เซลล์/มล.

การติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescein isothiocyanate; FITC) บน yeast cells

นำ yeast cells ที่เตรียมไว้ (1×10^6 เซลล์/มล.) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ fresh AB serum 1 มล. นำไปอบไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS ปรับปริมาตรให้เหลือ 1 มล. จากนั้นเติม anti-human immunoglobulin ที่ conjugate กับสารเรืองแสง FITC (เจือจาง 1:20) ปริมาตร 0.1 มล. นำไปอบไว้ที่ 37 °C นาน 30 นาที สุดท้ายนำไปปั่นล้างแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มล.

การสกัดเลคตินจากเมล็ดถั่วแปบ

นำเมล็ดถั่วแห้งน้ำหนัก 250 กรัมมาบดให้ละเอียด จากนั้นเติมน้ำเกลือ 100 มล. คนด้วยเครื่องปั่น (stirrer) 1 ชม. แล้วนำมาแช่ไว้ในตู้เย็นข้ามคืน เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นที่ 400g เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำใสส่วนบนมาใช้ศึกษาต่อไป

การศึกษาผลของเลคตินต่อ Phagocytosis

นำเม็ดเลือดขาว 1×10^7 เซลล์/มล. มาใส่หลอดทดสอบและชุดควบคุมอย่างละ 200 มล. เติม yeast cells ที่เคลื่อนสารเรืองแสงลงไปหลอดละ 200 มล. เติมสารเลคตินจากถั่วแปบ 200 มล. ลงในหลอดชุดทดสอบ และเติม PBS ในหลอดชุดควบคุม ผสมให้เข้ากันนำหลอดไปอบไว้ที่ 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องเรืองแสง (fluorescent microscope) นับจำนวนเซลล์ที่มี phagocytosis จากจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 300 เซลล์ แล้วคำนวณหาค่า % phagocytosis

วิธีทำ phagocytosis และการตรวจนับ

นำเม็ดเลือดขาว (1×10^7 เซลล์/มล.) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ yeast cells (1×10^6 เซลล์/มล.) ปริมาตร 1 มล. อบไว้ที่ 37°C ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 20, 30 และ 40 นาที เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกิด phagocytosis เมื่อครบในแต่ละช่วงเวลา ดูดเซลล์หนึ่งหยดใส่บนแผ่นสไลด์ปิดด้วย cover slip นำไปส่องดูด้วยกล้องเรืองแสงกำลังขยาย 400 เท่า ครั้งแรกส่องดูด้วยแสงธรรมดา นับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เห็นทั้งหมด และที่ตำแหน่งเดิมส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นับเม็ดเลือดขาวที่มี yeast cell เรืองแสงอยู่ภายในไซโตพลาสซึม นับเม็ดเลือดขาวธรรมดา

ทั้งหมด 300 เซลล์ แล้วนำไปคำนวณหา % phagocytosis

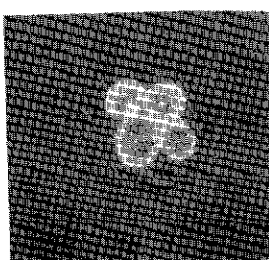
ผลการทดลอง

ผลของเวลาต่อการเกิด phagocytosis

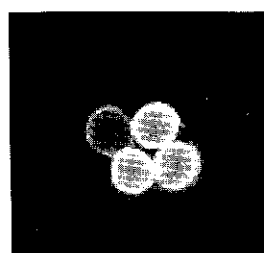
จากการผสมเม็ดเลือดขาวกับ yeast cells ในเวลาต่างๆ กันพบว่าที่เวลาน้อยๆ การเกิด phagocytosis น้อยเมื่อเวลานานขึ้นการเกิด phagocytosis ก็สูงขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ในการทดลองนี้ได้เลือกเวลาที่เหมาะสมคือนาน 30 นาที เพื่อต้องการให้เห็นผลของการกระตุ้นของเลคตินต่อกระบวนการ phagocytosis ทั้งการส่งเสริมและการยับยั้ง

ตารางที่ 1 ผลของเวลาต่อการเกิด phagocytosis

Incubation time (min)	% phagocytosis
5	4
10	9
20	23
30	50
40	55



A



B

รูปที่ 1 เม็ดเลือดขาวจับกิน Yeast cells ภายใต้แสง visible ร่วมกับแสง UV (A) และเม็ดเลือดขาวจับกิน Yeast cells ภายใต้แสง UV (B) จาก fluorescent microscope (400x)

ผลการตรวจนับ % phagocytosis ในเซลล์ phagocytes ของคนปกติจำนวน 30 ราย ที่ถูกกระตุ้นด้วยเลคตินเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค immunofluorescence พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยเลคติน ได้ค่า phagocy-

tosis อยู่ในช่วง 41–64% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51% ในขณะที่กลุ่มทดสอบได้ค่าอยู่ในช่วง 72–98% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87% เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวน phagocytosis ในคนปกติ 30 ราย ทั้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเลคติน และไม่ได้ถูกกระตุ้น

Sample number	% phagocytosis		Sample number	% phagocytosis	
	control	test		Control	Test
1	51	90	16	52	92
2	46	85	17	61	79
3	46	79	18	47	87
4	54	86	19	44	94
5	43	75	20	54	78
6	41	76	21	55	93
7	58	89	22	58	94
8	60	72	23	60	97
9	64	94	24	49	90
10	52	98	25	49	89
11	49	79	26	45	81
12	55	80	27	47	84
13	55	85	28	51	86
14	51	87	29	42	91
15	50	89	30	48	83

Control : mean = 51%, SD = 5.8

Test : mean = 87%, SD = 6.5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การติดฉลากสารเรืองแสงบนเชื้อยีสต์ อาจจะใช้วิธีผสมสารเรืองแสงกับเชื้อยีสต์ใน PBS buffer และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาในที่เย็น⁵

แต่งงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีที่อาศัยแอนติบอดีมาช่วยในการเคลือบ ซึ่งเป็นวิธีใหม่ที่คิดขึ้นเอง โดยในซีรัมของคนทั่วไปจะต้องมีแอนติบอดีต่อเชื้อยีสต์ (*C.albicans*) เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีอยู่ทั่วไปใน

ธรรมชาติและทุกคนได้รับเป็นประจำทำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้น และในการศึกษานี้เลือกเฉพาะซีรัมของบุคคลที่มีหมู่เลือด AB เนื่องจาก ไม่มี anti-A และ anti-B ด้วยเหตุผลคือหากในซีรัมที่ต้องการนำไปใช้งานมีแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้อยู่ด้วยจะไปจับกับเม็ดเลือดขาวทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ของมันได้ เมื่อ anti-*C.albicans* จับกับตัวเชื้อ *C.albicans* และเติม FITC conjugated anti-human immunoglobins จะเกิดการจับกันกับ anti *C.albicans* นั้นและล้างไม่หลุด สุดท้ายจะได้สารเรืองแสง FITC เกาะติดอยู่บนตัวเชื้อยีสต์ โดยปกติการศึกษา phagocytosis ไม่ว่าจะใช้เชื้อยีสต์หรือแบคทีเรีย ต้องผสม AB serum กับตัวเชื้อนั้นอยู่แล้ว เพื่อให้แอนติบอดีใน AB serum ไปจับกับตัวเชื้อเกิด Ag-Ab reaction ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complement) เมื่อคอมพลีเมนต์เข้าร่วมด้วยจะปล่อยสารที่เรียกว่า chemotactic factor ทำหน้าที่ไปดึงให้ phagocyte เข้ามายังบริเวณที่มี Ag-Ab reaction เกิดขึ้น และเกิดกระบวนการ phagocytosis ซึ่งจะสามารถมองเห็นตัวเชื้อเรืองแสงอยู่ใน ไซโตพลาสซึมของเซลล์ phagocytes

จากการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการ incubate sensitized yeast cells กับเม็ดเลือดขาว ในงานทดลองนี้ได้เลือกที่เวลา 30 นาที ซึ่งมี phagocytosis ที่ 50% ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงกลางๆ เมื่อผสมสารเลคตินเข้าด้วยกัน หากเลคตินมีผลในการส่งเสริม phagocytosis คาดได้ว่า % phagocytosis ควรสูงขึ้น และหากเลคตินยับยั้งกระบวนการ phagocytosis เปอร์เซนต์จะลดลงให้เห็นได้เช่นกัน

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเลคตินจากเมล็ดถั่วแปบสามารถกระตุ้นหรือส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis ให้เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด กลุ่ม

ควบคุมได้ค่าเฉลี่ย 51% ในขณะที่กลุ่มทดสอบได้ค่าเฉลี่ย 87% และมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) มีงานวิจัยหลายเรื่องแสดงให้เห็นว่า เลคตินจากถั่วสามารถกระตุ้น phagocytosis ได้^{6,7} เชื่อว่าเลคตินอาจจะกระตุ้น phagocyte โดยตรงเพื่อให้งานสูงขึ้น เช่นเดียวกับ PHA (phytohemagglutinin) ซึ่งเป็นเลคตินจากถั่วเหมือนกัน สามารถกระตุ้นให้ macrophage มี activity สูงขึ้นในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะกระบวนการ phagocytosis นอกจากนี้เลคตินยังอาจจะทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่าง phagocyte กับ yeast cell ก็ได้ เพราะเลคตินมีคุณสมบัติจับได้กับทั้ง phagocyte และ yeast cell จึงช่วยให้ phagocyte จับกิน yeast cell ได้ง่ายขึ้น

การศึกษา phagocytosis ด้วยวิธี immunofluorescence นี้เมื่อส่องดูด้วยกล้องเรืองแสง จะเห็น yeast cell เรืองแสงสีเหลืองแกมเขียว อยู่ในไซโตพลาสซึมของ phagocyte ตรวจพบได้ง่าย และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีที่ย้อมด้วยสี wright stain yeast cell ที่เรืองแสงนี้เมื่อผ่านการ incubate นานขึ้น จะเห็น yeast cell ค่อยๆ ถูกย่อยสลายไปที่ละน้อยๆ สุดท้ายจะเห็นเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เรืองแสงและไม่เห็นอีกเลยเมื่อการ incubation นานเกิน 60 นาที แสดงว่าวิธี immunofluorescence สามารถนำไปใช้ศึกษา kinetic killing function ของ phagocyte ได้และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเครื่อง flow cytometer ได้ด้วย นอกจากนี้ยังรวมไปถึงการประยุกต์ใช้กับเชื้ออื่นๆ ด้วย เช่น เชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. แสงเดือน มูลสม. ผลของสมุนไพรต่อการกินและฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต

- (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2540.
2. สุพรรณษา ปาติ๊ะ. สารสกัดเลคตินจากถั่วชนิดต่างๆ. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2543.
 3. สุทธิรัตน์ พรหมจิต. ผลของสารสกัดเลคตินจากถั่วชนิดต่างๆ ต่อฟาโกไซต์. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.
 4. Gabins HJ and Gabins S. Lectin and Cancer. Berlin, Springer Verlag, 1991.
 5. Loyola W, Gaziri DA, Gaziri LCJ and Felipe I. Concanavalin A enhance phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophage. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 33:201-8.
 6. Vonk AG, Wieland CW, Natea MG and Kullberg BJ. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* blastocinidia by neutrophil and macrophage: A comparison of different microbiological test systems. J Microb Meth 2002; 49:52- 62.