

The Effect of Phytohaemagglutinin on Measurement and Evaluation of Lymphocytes using MTT Assay

**Kittima Tungprasertpol, Suparat Wichitwiengrat, Sasiprapa Thongbopit
and Tatsanee Phermthai***

*Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine
Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

MTT assay is a technique used to detect immunological property of cells. However, the limitation of this technique is the aggregation of cells in experiment wells. The PBMC aggregation, which is found after stimulation with PHA, affected absorbance measurement. To reduce PBMC aggregation, the present study investigated the optimal concentration and incubation time of PHA to induce PBMC proliferation under chelating agent (EDTA) supplemented medium. Peripheral blood samples were provided for PBMC isolation using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The PBMC was induced proliferation under various concentrations of PHA with a supplementation of EDTA. The reactions were measured by MTT assay. The results showed that PHA at a concentration of 1 µg/mL presented a low amount of PBMC aggregations resulting in significantly high absorbance value, whereas, a concentration of 5 µg/mL PHA showed high aggregation amount of PBMC and a low absorbance value as compared to that at 1 µg/mL PHA. EDTA was found to be an effective supplement for reduction of aggregation in PBMC cultures and it was concluded that optimal concentration of PHA and supplementation of EDTA can reduce PBMC aggregation in reaction for MTT assay.

Keywords: Phytohaemagglutinin, Peripheral blood mononuclear cell, EDTA

*Corresponding author E-mail address: bsuteevun_1@yahoo.com, stemcells_siriraj@yahoo.com

Received: 26 December 2019

Revised: 14 February 2020

Accepted: 29 May 2020

ความเข้มข้นของไฟโตฮีแมกกกลูตินินในปฏิกิริยามีผลต่อการวัดและวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเทคนิค MTT assay

กฤติมา ตังประเสริฐผล สุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์ ศศิประภา ทองบพิตร และ ทศนีย์ เพิ่มไทย*

หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสรีรศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติภูมิคุ้มกันของเซลล์ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดจากการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) หลังใส่สารกระตุ้นไฟโตฮีแมกกกลูตินิน (PHA) โดยพบว่ามีการอ่านค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาด ส่งผลให้ผลวิเคราะห์การทดลองคลาดเคลื่อน การวิจัยนี้ได้ศึกษา (1) ผลกระทบของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC หลังการกระตุ้นด้วย PHA ต่อผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในเทคนิค MTT และ (2) ศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาของ PHA ที่เหมาะสมในปฏิกิริยากระตุ้นเซลล์ PBMC ร่วมกับการใช้สารคีเลตเพื่อลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC โดยได้จัดเก็บเลือดและเตรียมเซลล์ PBMC เพื่อทำปฏิกิริยากับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ส่วนการทดลองที่สองได้ทดสอบบ่มเพาะเซลล์ PBMC ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาต่างกัน โดยมีการใช้สารคีเลตร่วมในบางช่วงเวลา และนำไปเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง ผลการศึกษาพบว่า PHA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดกลุ่มก้อน PBMC ขนาดใหญ่มีปริมาณมากกว่า และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งพบว่าการใช้ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลานาน 5 ชั่วโมง ร่วมกับการเติมสารคีเลต (EDTA) ส่งผลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงและลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC สรุปได้ว่าการเติม EDTA ร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการกระตุ้นเซลล์ PBMC สามารถลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมต่อการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay

คำสำคัญ: ไฟโตฮีแมกกกลูตินิน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว อีดีทีเอ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: bsuteevun_1@yahoo.com, stemcells_siriraj@yahoo.com

รับบทความ: 26 ธันวาคม 2562

แก้ไขบทความ: 14 กุมภาพันธ์ 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 29 พฤษภาคม 2563

บทนำ

MTT assay เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ผลด้วยการแสดงค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นเทคนิคที่แพร่หลายเนื่องจากมีกระบวนการทดสอบไม่ยุ่งยาก และใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปปรับปรุงเพื่อใช้ประกอบในการวิเคราะห์ผลการวิจัยที่หลากหลาย เช่น การนำมาใช้ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (viability cell count)^(1, 2) ศึกษาความเป็นพิษของยา (drug cytotoxicity)^(3, 5) และวัดปริมาณการสังเคราะห์ lymphokines^(6, 7) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT ยังมีการนำมาปรับใช้ในการศึกษาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นได้อีกหลายชนิด ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Venugopal และคณะ⁽⁸⁾ ที่คัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดสายสะดือ และตรวจสอบสมบัติ immunosuppressive ด้วยเทคนิค MTT assay โดยการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน (PHA) แล้วจึงนำเซลล์ต้นกำเนิดที่ต้องการจะใช้ปลูกถ่ายใส่ร่วมในปฏิกิริยาเพื่อดูปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์ PBMC และวัดผลด้วยเทคนิค MTT ซึ่งทำให้ผู้วิจัยสามารถคาดเดาคุณสมบัติการถูกต่อต้านของภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนั้นๆ และการปฏิเสธเซลล์โดยระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับการปลูกถ่าย แต่ปัญหาหนึ่งที่มักพบในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT คือ การเกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่มีสาเหตุจากการทำปฏิกิริยากับ PHA เนื่องจาก PHA เป็นไกลโคโปรตีนจากพืชที่มี leucoagglutinating (L)-subunit เป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้าง และส่วนประกอบนี้มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเกาะกลุ่มกันได้⁽⁹⁻¹¹⁾ ซึ่งอาจมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ผล โดยเฉพาะต่อค่าการดูดกลืนแสงในขั้นตอนการอ่านผล ดังนั้นเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าปริมาณและขนาด

กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับสาร PHA จะส่งผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT หรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนการทดลองวิเคราะห์ยืนยันความแน่ชัด และได้ค้นหาวิธลดภาวะการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ในปฏิกิริยา โดยศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ภายใต้อิทธิพลของ PHA ที่แตกต่างกัน ตามระยะเวลาบ่มเซลล์ PBMC ที่แตกต่างกัน รวมถึงการใช้สารคีเลต (chelating agent) ในระหว่างการเตรียมเซลล์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT ให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดคนปกติจากอาสาสมัคร ปริมาตร 10-12 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด heparin (10-30 UPS Units/mL blood; Greiner Bio-One, Kremsmünster) โดยอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการได้ทราบรายละเอียดของโครงการก่อนลงลายลักษณ์อักษร เพื่อแสดงความยินยอมก่อนเข้าร่วมโครงการ ซึ่งโครงการนี้อยู่ภายใต้การดูแลควบคุมของคณะกรรมการจริยธรรมในคนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

2. การแยกเซลล์ PBMC

เติม phosphate buffered saline (PBS) ในตัวอย่างเลือดในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แยกส่วน buffy coat ซึ่งเป็นส่วนของเม็ดเลือดขาวและเติม PBS ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดขาวที่เก็บได้ (อัตราส่วน 4:1) ผสมให้เข้ากันและค่อยๆ ปล่อยให้ลงบนน้ำยา Ficoll-

Hypaque ในอัตราส่วน 10:3 จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (no break) เพื่อแยกเซลล์ PBMC ปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็ว 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที ก่อนละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ Minimum Essential Medium Alpha, (MEM- α) ร่วมกับ 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% antibiotic (penicillin G sodium และ streptomycin sulfate)

3. การเปรียบเทียบการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ($n = 11$) ที่มีเซลล์ PBMC เพียงอย่างเดียว กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 11$) และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 11$) โดยแต่ละกลุ่มลงเลี้ยงเซลล์จำนวน 1.0×10^5 เซลล์ร่วมกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม

isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 570/630 นาโนเมตร

4. การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (%viability) ของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA

ปั่นแยกเซลล์ PBMC จากตัวอย่างเลือดอาสาสมัคร 5 คน แบ่งเซลล์ PBMC หลอดละ 2.5×10^5 เซลล์ จำนวน 11 หลอด โดยแยกเซลล์ที่แบ่งใส่หลอดออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกมีเฉพาะเซลล์ PBMC จำนวน 1 หลอด (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่สองคือเซลล์ PBMC ที่มี PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด และกลุ่มที่สามคือเซลล์ PBMC ที่มี PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด นำเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่สองและสามมาบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาในแต่ละชั่วโมงนำเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA มาปั่น 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อแยกน้ำยามี PHA ออก และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์เป็นเซลล์ตายด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ร้อยละเซลล์รอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เป็น} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เป็น} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}}$$

5. การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในช่วงเวลาต่างกัน

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 3 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มมีเซลล์ PBMC 1.0×10^5 เซลล์ กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ประกอบด้วยเซลล์ PBMC

เดียวไม่ทำปฏิกิริยากับสาร PHA ($n = 10$) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 10$) และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 10$) โดย

เซลล์ในกลุ่มที่สองและสามทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ เซลล์ PBMC ในแต่ละกลุ่มทดสอบแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในแต่ละชั่วโมง นำไปวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT ส่วนการทดลองที่ 2 กลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในเวลาต่างกัน เมื่อครบเวลาแล้วเปลี่ยนน้ำยาเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อภายใต้ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

6. การทดสอบการใช้สารทีเลต ร่วมกับเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยากับ PHA

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 4 กลุ่มทดสอบ ในแต่ละกลุ่มมีเซลล์ PBMC 2.5×10^5 เซลล์ กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มเซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) กลุ่มที่ 2 ใช้ PBS ร่วมกับ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพื่อปั่นล้างเซลล์ PBMC ก่อนทำปฏิกิริยากับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) กลุ่มที่ 3 ใช้ PBS ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปั่นล้างเซลล์ PBMC ภายหลังการทำปฏิกิริยากับ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) และกลุ่มที่ 4 ใช้ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ร่วมอยู่ในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) โดยกลุ่มควบคุม ($n = 12$) คือกลุ่มเซลล์ที่ไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA โดยเซลล์ PBMC ในแต่ละกลุ่มถูกเพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์แต่ละกลุ่มมาปั่น 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อแยกน้ำยาที่มี PHA ออก จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำยา

เพาะเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากเทคนิค MTT แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ paired t-test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มโดยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการทดสอบเซลล์ PBMC กับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสังเกตการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ในลักษณะที่แตกต่างกัน และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องถึง 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่เพาะเลี้ยงใน PHA ทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดกลุ่มก้อนที่ใหญ่กว่า (Fig. 1) และเมื่อนำเซลล์ PBMC ทั้งสองความเข้มข้นมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) เมื่อเทียบกับเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 2) โดยมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.2630 ± 0.0661 และ 0.2969 ± 0.049 ตามลำดับ เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5

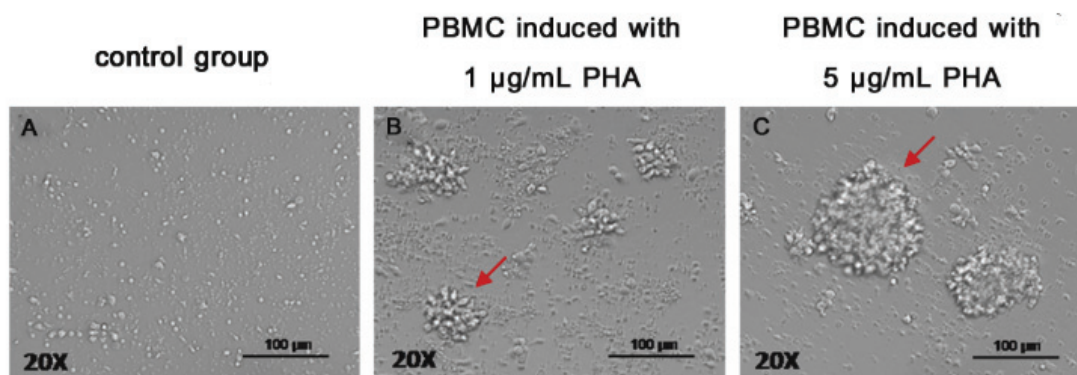


Fig. 1 Appearance of PBMC under control medium (A) and PBMC after induced with 1 µg/mL PHA (B) and 5 µg/mL PHA (C) for 72 hours. The aggregated PBMC demonstrated by red arrow under inverted microscopy (20X).

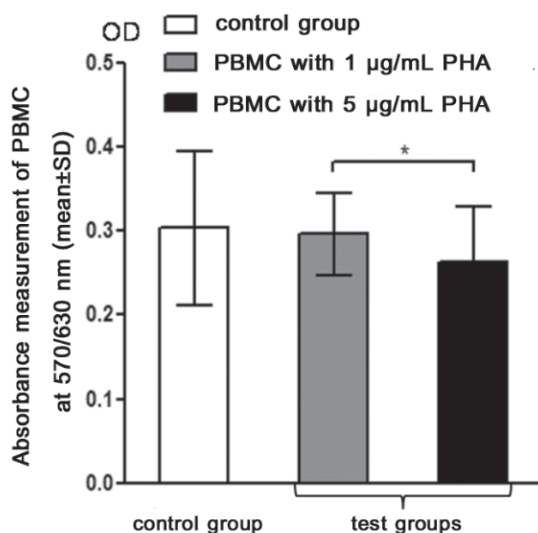


Fig. 2 The average of absorbance value of PBMC stimulated with 1 µg/mL PHA and 5 µg/mL PHA for 72 hours as compared between the control group and the internal test groups. Data were shown as mean ± SD of OD570/630 nm. (**p* value < 0.05)

ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC หลังถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 5 ชั่วโมง มีความใกล้เคียงกัน

โดยพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับร้อยละ 98.36 ± 0.84 และร้อยละ 94.35 ± 4.18 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ร้อยละ 98.27 ± 0.83 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p value > 0.05) แสดงว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ PBMC

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาต่างกัน

เซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยากับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ ประเมินอัตราการเกิดกลุ่มก้อนเซลล์ต่อ low power field ได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า รวมถึงตรวจสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ PBMC ด้วยเทคนิค MTT พบมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ภายหลังทำปฏิกิริยากับ PHA ทั้งสองความเข้มข้น โดยเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น

5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field มากกว่าเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 3) ส่วนผลการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC พบว่ากลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงให้ผลค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน คือ 0.3005 ± 0.0350 , 0.2991 ± 0.0341 และ 0.2979 ± 0.0351 ตามลำดับ ซึ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2822 ± 0.0390) (p value < 0.05) โดยกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แสดงความแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA นาน 1 ชั่วโมง (0.2814 ± 0.0283) อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (Fig. 4A) ส่วนกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา คือ 0.279 ± 0.0339 ,

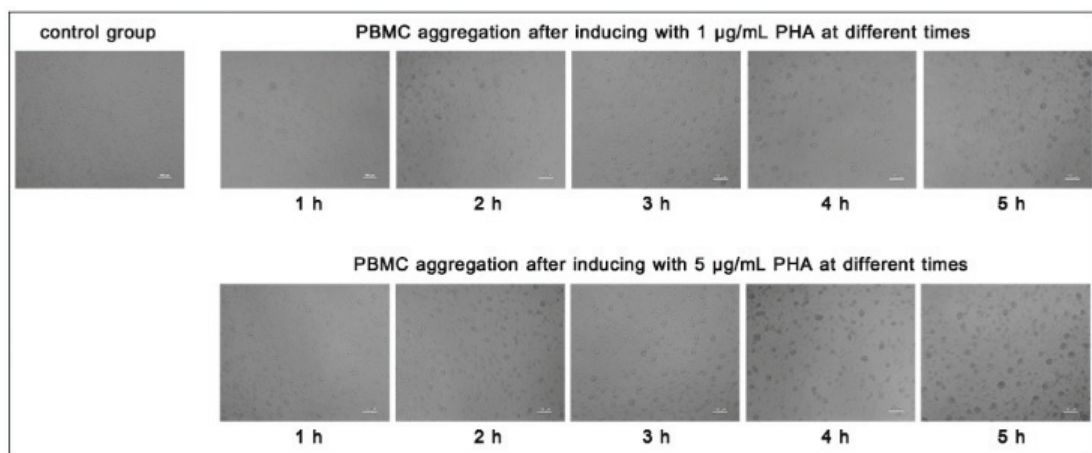


Fig. 3 Appearance of PBMC stimulated with 1 µg/mL PHA and 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours. The aggregated PBMC was observed under inverted microscopy at 10x

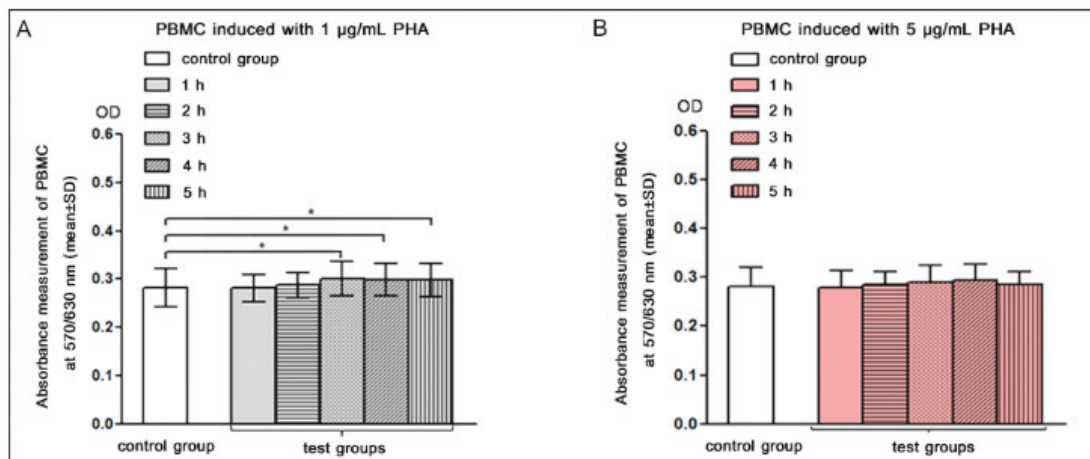


Fig. 4 The average of absorbance value of PBMC stimulated with (A) 1 µg/mL PHA and (B) 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours as compared between the control group and the internal test groups. Data were shown as mean ± SD of OD 570/630 nm (**p* value < 0.05)

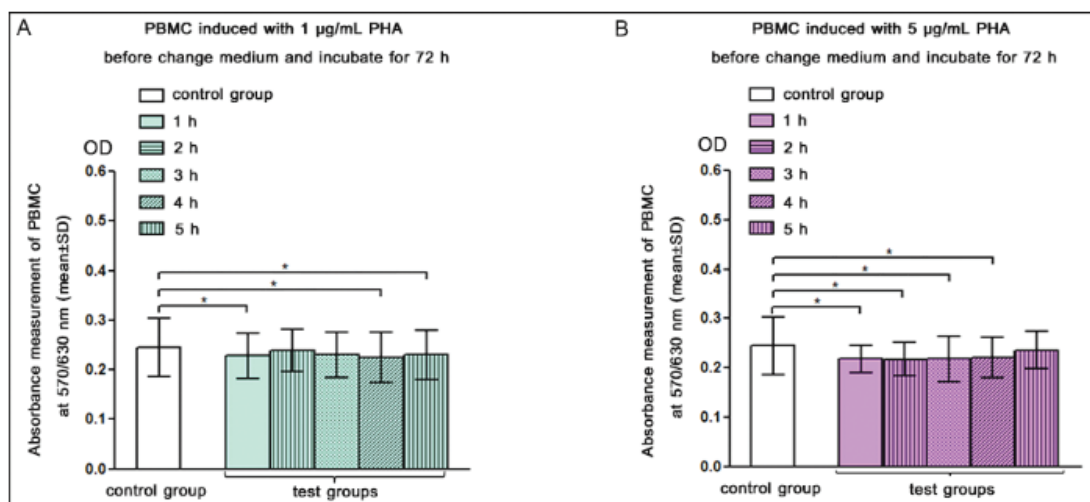


Fig. 5 The average of absorbance value of PBMC stimulated with (A) 1 µg/mL PHA and (B) 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours. PHA-stimulated PBMC samples, incubated at different times, were changed medium and cultured for 72 hours. Data were shown as mean ± SD of OD 570/630 nm and compared between the control group and the internal test groups. (**p* value < 0.05)

0.2861 ± 0.0256 , 0.2896 ± 0.0349 , 0.2941 ± 0.0331 และ 0.2858 ± 0.0248 ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

(*p* value > 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2822 ± 0.0390) (Fig. 4B) นอกจากนี้กลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงให้ผลค่าการดูดกลืนแสงมากกว่ากลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) หลังการทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในสองความเข้มข้นที่เวลาต่างกัน แล้วเปลี่ยนน้ำยาและเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 72 ชั่วโมง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในแต่ละชั่วโมง ให้ผลใกล้เคียงกันคือ 0.2283 ± 0.0454 , 0.2393 ± 0.0427 , 0.2299 ± 0.045 , 0.2248 ± 0.0506 และ 0.2305 ± 0.0495 ตามลำดับ ซึ่งที่เวลา 1, 4 และ 5 ชั่วโมงแสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (0.2445 ± 0.0585) (Fig 5A) ส่วนกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 0.2359 ± 0.038 ซึ่งแตกต่างจากที่ 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05)

นอกจากนี้เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน คือ 0.218 ± 0.0278 , 0.2171 ± 0.0335 และ 0.2179 ± 0.0466 ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงแสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (0.2445 ± 0.0585) โดยที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้ผลค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2207 ± 0.038 (Fig. 5B) เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ชั่วโมงเดียวกัน พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกัน และไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

แสดงว่าเวลาและความเข้มข้นที่ต่างกันไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ PBMC

ผลการใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA ในช่วงต่าง ๆ

เพื่อตรวจสอบการใช้สารคีเลต ต่อการรอดชีวิต การเกิดกลุ่มก้อน และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC การทดลองนี้จึงแบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือเซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA กลุ่มที่ 2 ใช้ EDTA เพื่อล้างเซลล์ PBMC ก่อนทำปฏิกิริยากับ PHA กลุ่มที่ 3 ใช้ EDTA หลังการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA กลุ่มที่ 4 ใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA โดยกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเซลล์ที่ไม่มีในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA

เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า PHA ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวัดค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า PHA ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร การทดลองนี้จึงเลือกใช้ PHA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากการทดลองตรวจอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ด้วยการย้อม trypan blue dye exclusion พบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC เท่ากับร้อยละ 92.7 ± 3.26 , 95.8 ± 7.75 , 94.51 ± 5.15 และ 93.98 ± 11.76 ตามลำดับ โดยอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 1 และ 3 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 98.09 ± 3.03) (Fig. 6) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ EDTA ในทั้ง 3 ช่วงเวลาให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่าเพื่อดูลักษณะการเกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ในกลุ่มเซลล์ 3 กลุ่มที่ใช้

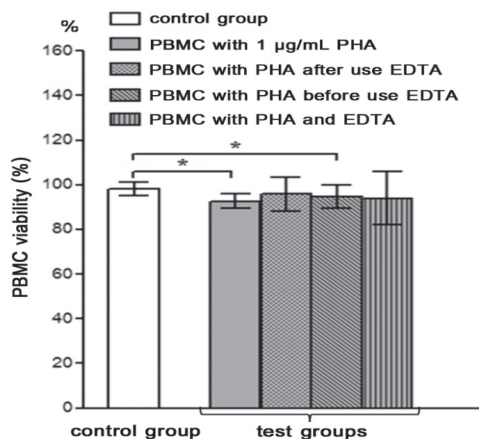


Fig. 6 Effect of EDTA on PHA-PBMC reaction. PBMC was cultured with 1 µg/mL PHA and a supplementation of 2 mM EDTA at different times. The cell viability was analyzed by trypan blue assay. Data were shown the percentage of cell viability and compared between the control group and the internal test groups. (Mean $\pm$ SD and * p value < 0.05)

EDTA ในช่วงเวลาต่างกัน พบการเกิดกลุ่มก้อนของ เซลล์ PBMC ทั้งสามกลุ่ม และในการศึกษาการเติม EDTA ในช่วงต่างๆ ของการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่า เซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น

0.2354 ± 0.0453 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) และเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 2 ให้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.2496 ± 0.0664 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) และให้ค่าใกล้เคียง

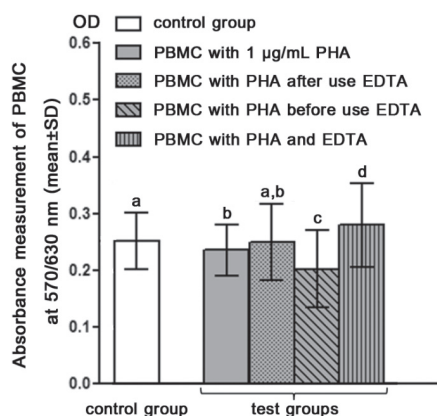


Fig. 7 The average of absorbance value of PBMC cultured with 1 µg/mL PHA and a supplementation of 2mM EDTA at different times. The OD measurement was analyzed by MTT assay. Data were shown as mean $\pm$ SD of OD 570/630 nm and compared between the control group and the internal test groups. The different letters (a, b, c and d) indicate a significant different. (p value < 0.05)

กับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 4 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.2795 ± 0.0737 ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) ในขณะที่เซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 3 ให้ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำที่สุดใน 4 กลุ่มโดยมีค่าเท่ากับ 0.2022 ± 0.0685 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) (Fig. 7) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC

วิจารณ์และสรุป

จากผลทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC ที่ความเข้มข้นต่างกันโดยใช้ความเข้มข้นของ PHA ที่ 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ โดยการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC เกิดจาก L-subunit ที่เป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้างของ PHA ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมถึงเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเกาะกลุ่มกัน⁽⁹⁻¹¹⁾ ปัญหาการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ทำให้ผลการทดสอบด้านภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค MTT เกิดการผิดพลาดได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้นต่างกัน โดยเลือกความเข้มข้นของ PHA ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ในงานวิจัยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบเซลล์ PBMC กับ PHA เปรียบเทียบกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และวิเคราะห์ผลค่าการดูดกลืนแสงในเทคนิค MTT โดยพบว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีขนาดของกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC เล็กกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม

ก้อนของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ในความเข้มข้นต่ำให้ค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ในความเข้มข้นมาตรฐาน (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue ผลพบว่าเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ทั้งสองความเข้มข้น มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ไม่แตกต่างทางสถิติ (p value > 0.05) ซึ่งทำให้ทราบว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ PBMC และเมื่อเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์เดี่ยว PBMC และ PHA ในความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่าการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC หลังทำปฏิกิริยากับ PHA ทั้งสองความเข้มข้น แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าความเข้มข้นของ PHA และระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับเซลล์ PBMC ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์ PBMC โดยเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ให้อัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น ในขณะที่ผลค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง ในทางกลับกันเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ให้อัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กลับสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า PHA ที่ความเข้มข้นน้อยนั้นอาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ

การกระตุ้นให้เซลล์ PBMC เพิ่มจำนวน แม้จะทำให้เกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นสูง พบว่าขนาดของกลุ่มก้อนที่ใหญ่ขึ้นส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าการใช้ PHA ที่ความเข้มข้นต่ำ

นอกจากนี้เพื่อแก้ปัญหาการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในงานวิจัยของ Kay⁽⁹⁾ ได้ทดลองนำสาร EDTA เข้ามาป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึมของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA และยังมีผลการทดลองของ Alford⁽¹⁰⁾ ที่พบว่า EDTA ความเข้มข้น 1.6 - 2 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เซลล์ลิมโฟไซต์เกาะกลุ่มกันได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงนำ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่ปลอดภัยเพื่อลดการจับตัวของเซลล์ PBMC โดยตรวจสอบผลการรอดชีวิต การเกิดกลุ่มก้อน และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC ซึ่งพบว่าการใช้ EDTA ในกลุ่มทดสอบทั้ง 3 กลุ่มให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน และไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า เพื่อดูลักษณะการเกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC พบว่าในกลุ่มที่ 3 ซึ่งใช้ EDTA เลี่ยงร่วมในปฏิกิริยาของเซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลการเกิดกลุ่มก้อนน้อยที่สุด และเมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค MTT พบว่า การใช้ EDTA ในช่วงก่อนปฏิกิริยาหรือร่วมในปฏิกิริยาของเซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC

เอกสารอ้างอิง

1. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjrat-tanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 1118-22.
2. Vinjamuri S, Shanker D, Ramesh RS, Nagarajan S. *In vitro* evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia Ferruginea* Benth. World J Pharm Pharm Sci 2015; 4: 1263-8.
3. Tofzikovskaya Z, Casey A, Howe O, Connor CO, Mamara MM. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of a folate-modified b-cyclodextrin as a new anti-cancer drug delivery system. J Incl Phenom Macrocycl Chem 2015; 81: 85-94.
4. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 2006; 160: 171-7.
5. Jo HY, Kim Y, Park HW, *et al.* The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. Exp Neurobiol 2015; 24: 235-45.

6. Sun W, Xing L, Lin H, Leng K, Zhai Y, Liu X. Assessment and comparison of *in vitro* immunoregulatory activity of three astaxanthin stereoisomers. J Ocean Univ China 2016; 15: 283-7.
7. Price P, McMillan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. Cancer Res 1990; 50: 1392-6.
8. Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. Stem Cells Cloning 2011; 4: 39-50.
9. Kay JE. Interaction of lymphocytes and phytohaemagglutinin: inhibition by chelating agents. Exp Cell Res 1971; 68: 11-6.
10. Alford RH. Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. J Immunol 1970; 104: 698-703.
11. Singkome T, Greeta D. Preparation of crude red kidney bean extract for growth stimulation and cell division of peripheral blood mononuclear cells. J Assoc Med Sci 2012; 45: 23-31. (in Thai)