บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของ berberine ต่อ 661 W cells

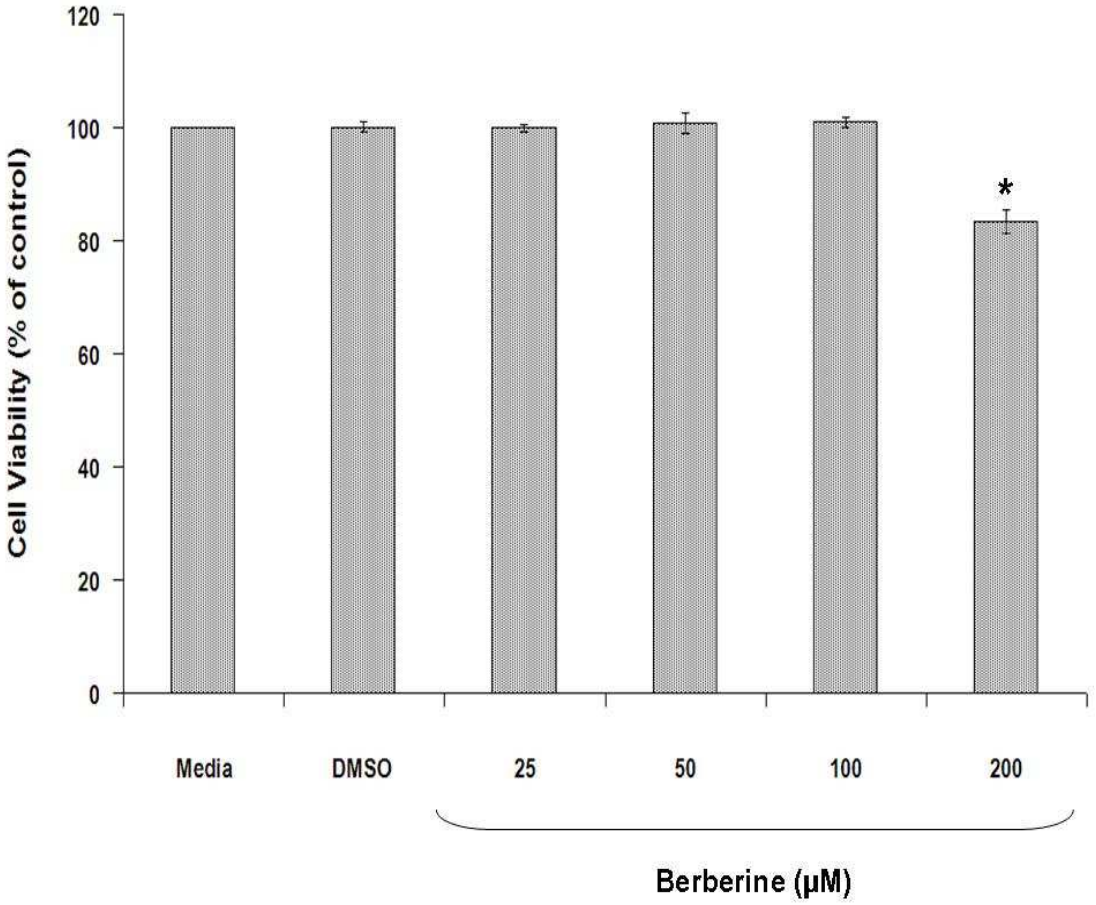
เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ culture medium ที่มี DMSO 20 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 25, 50, 100 และ 200 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์จะถูกวัดด้วยโดยอาศัย trypan blue exclusion technique พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ หรือ % cell viability ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ berberine ที่ขนาด 25-100 µM ยกเว้นกลุ่มที่รับ berberine 200 µM ซึ่งพบว่ามีการลดลงของจำนวนของเซลล์ถึงประมาณร้อยละ 17 และการลดลงนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05\%$) เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ทุกกลุ่ม จากการทดลองนี้ทำให้ได้ความเข้มข้นของ berberine ที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งคือ berberine ขนาด 50 และ 100 µM (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ medium ที่มี DMSO 20 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 25, 50, 100 และ 200 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture media ซึ่งเปลี่ยนใหม่ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์แสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM

Treatment	Cell Viability (% of control): Mean $\pm$ SEM
Media	100.00 $\pm$ 0.00
DMSO (20 µl/ml)	100.07 $\pm$ 0.88
Berberline 25 µM	99.89 $\pm$ 0.58
Berberline 50 µM	100.80 $\pm$ 1.80
Berberine 100 µM	100.94 $\pm$ 0.93
Berberine 200 µM	83.38 $\pm$ 2.06*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 1 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ปกติ หรือ media ที่มี DMSO 20 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 25, 50, 100 และ 200 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ตามปกติต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ถูกแสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การทดสอบหาขนาดที่เหมาะสมของ hydrogen peroxide ที่จะนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ 661W photoreptor ด้วย oxidative stress

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% หลังจากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน culture medium ที่ผสม H_2O_2 ขนาด 0-1000 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์จะถูกวัดด้วยโดยอาศัย trypan blue exclusion technique ผลที่ได้พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของ H_2O_2 เป็นลักษณะ does-dependent manner โดยที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดหลังได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 μM เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ culture medium สำหรับเลี้ยงเซลล์อย่างเดียว มีค่าเป็นร้อยละ 80.16, 69.98, 51.40, 37.21, 33.16, 24.94, 23.23 ตามลำดับ โดยที่ทุกกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 800 และ 1000 μM (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2)

จากการถ่ายภาพด้วย phase contrast microscope (รูปที่ 3) พบว่าเซลล์มีลักษณะเหี่ยว ถูกทำลายและตายเพิ่มขึ้นหลังได้รับ H_2O_2 100-1000 μM ในลักษณะ dose-dependent manner ซึ่งสอดคล้องกับค่า cell viability ที่หาค่าได้จากการทดลอง

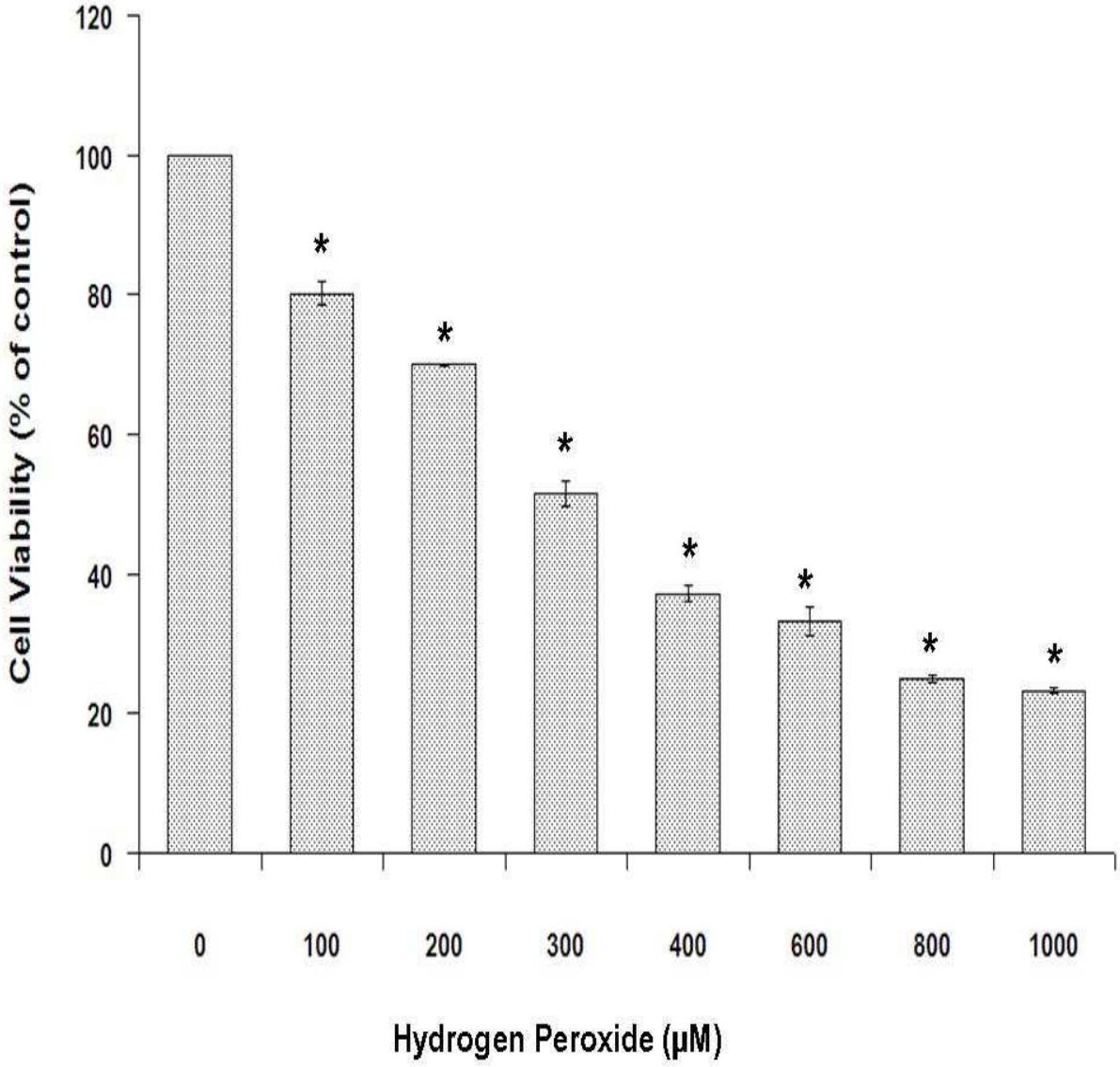
จากการทดลองที่ได้ทำให้เลือกขนาดของ H_2O_2 ที่ 100-400 μM ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดของเซลล์ที่ 40-80% ซึ่งหากเลือกใช้ H_2O_2 ที่ขนาดสูงเกินไปอาจทำให้เป็นการยากที่จะเห็นฤทธิ์ในการป้องกันของ berberine ได้ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2-3)

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน culture medium ที่ผสม H_2O_2 ขนาด 0-1000 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์แสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM

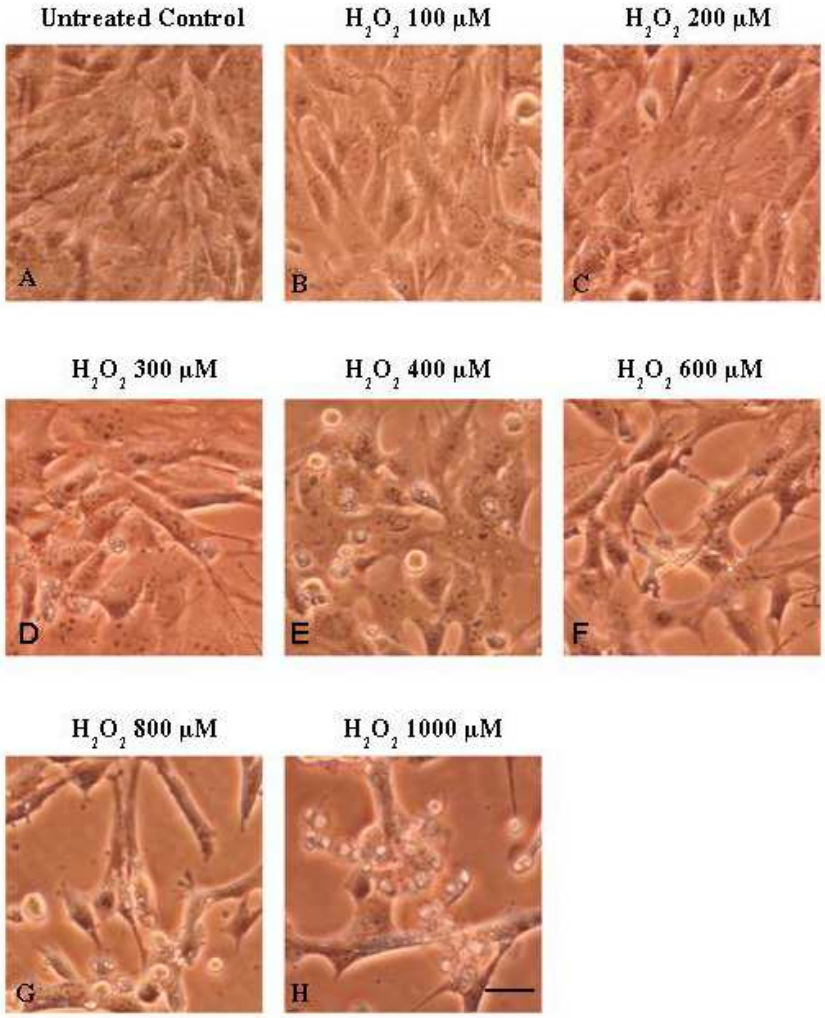
Treatment	Cell Viability (% of Control) (Mean $\pm$ SEM)
Fresh Media	100.00 $\pm$ 0.00
Hydrogen Peroxide 100 µM	80.16 $\pm$ 1.71*
Hydrogen Peroxide 200 µM	69.98 $\pm$ 0.08*
Hydrogen Peroxide 300 µM	51.40 $\pm$ 1.81*
Hydrogen Peroxide 400 µM	37.21 $\pm$ 1.21*
Hydrogen Peroxide 600 µM	33.16 $\pm$ 2.00*
Hydrogen Peroxide 800 µM	24.94 $\pm$ 0.47*
Hydrogen Peroxide 1000 µM	23.25 $\pm$ 0.43*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน media ที่ผสม H_2O_2 ขนาด 0-1000 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์แสดงด้วยค่า mean ± SEM * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 3 ภาพ phase contrast micrograph แสดงลักษณะของเซลล์ 661W ภายหลังการได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน media ที่ผสม H_2O_2 ขนาด 0-1000 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกภาพกลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 100-1000 µM (B-H) ด้วย phase contrast microscope

micron bar=20 µm

การทดสอบหาขนาดที่เหมาะสมของ berberine ในการป้องกันการตายของเซลล์ 661W ภายหลังได้รับ oxidative stress ด้วย hydrogen peroxide

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ปกติ หรือ media ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 50 และ 100 µM อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติ หรือ media ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-400 µM ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์จะถูกวัดด้วยโดยอาศัย trypan blue exclusion technique จากผลการทดลองพบว่าร้อยละของเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอดของกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ DMSO 10 µl และ berberine ที่ 50 และ 100 µM อย่างเดียวนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตระหว่างกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียว กับ กลุ่มที่ได้รับ DMSO (10 ul/ml) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มที่ได้รับ berberine ที่ขนาด 50 µM ก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100 µM พบว่าสามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W อย่างมีนัยสำคัญโดยสามารถเพิ่มเซลล์ที่อยู่รอดจาก 80.67% เป็น 91.70% เมื่อเพิ่มขนาดของ H_2O_2 เป็น 200-400 µM พบว่า berberine 50 µM ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ได้ ส่วนกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM ก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 µM พบว่าสามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสามารถเพิ่มเซลล์ที่อยู่รอดจาก 80.67, 71.81,51.83% เป็น 97.55, 83.22, 62.43% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม berberine ที่ขนาด 100 µM ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 400 µM ได้ (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 4)

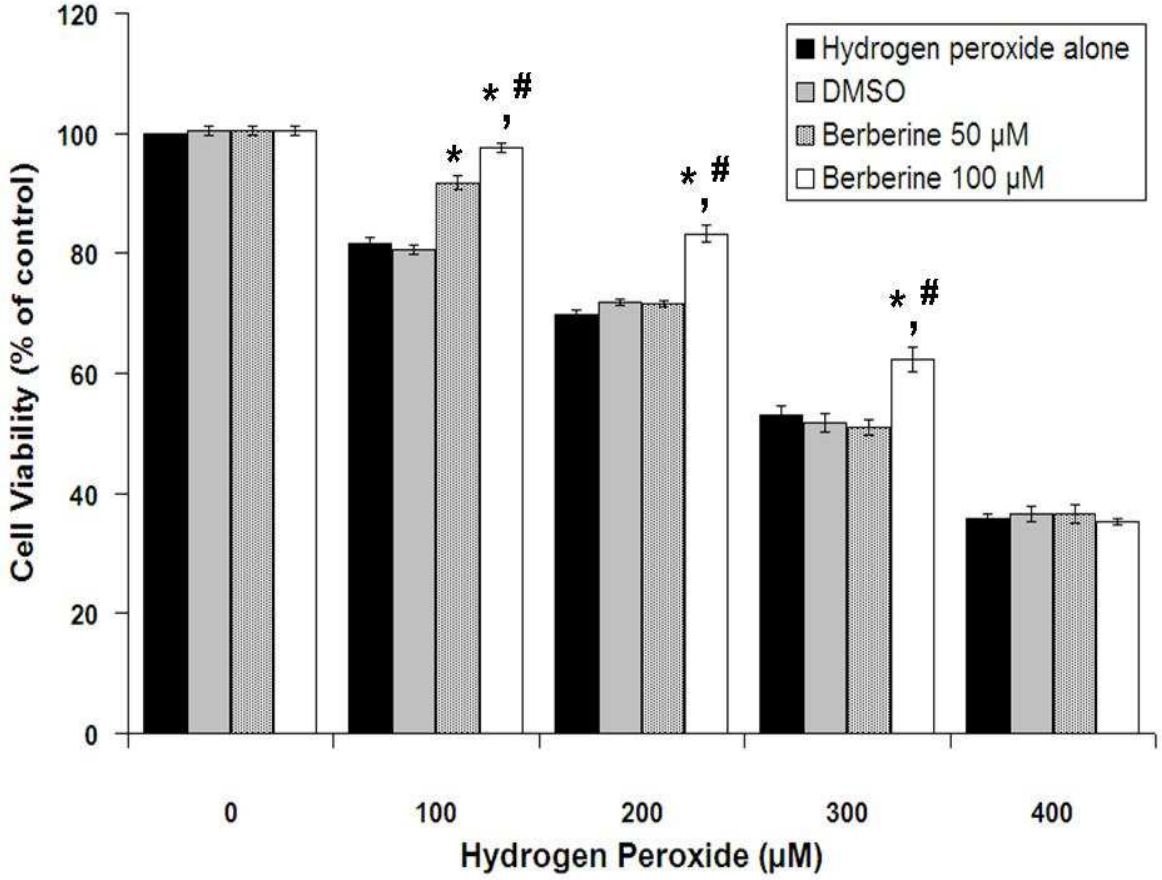
จากการศึกษา กลุ่มควบคุม (A) กลุ่มที่ได้รับ DMSO อย่างเดียว (B) กลุ่มที่ได้รับ berberine อย่างเดียว (C) กลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 100-200 µM อย่างเดียว(D,F) และกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM ก่อนการได้รับ H_2O_2 100-200 µM (E,G) ด้วย phase contrast (รูปที่ 5) พบว่าเซลล์มีการถูกทำลายลดลงเมื่อได้รับ berberine ที่ขนาด 100 µM ก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-200 µM (รูปที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากค่า cell viability

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ medium ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 50 และ 100 µM อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ตามปกติ หรือ culture medium ที่ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-400 µM ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Treatment	Cell Viability (% of Control) (Mean ± SEM)
Media	100.00 ± 0.00
DMSO 10 µl	100.45 ± 0.81
Berberline 100 µM	100.46 ± 0.74
Berberline 50 µM	100.48 ± 0.79
Hydrogen Peroxide 100 µM	81.61 ± 0.95
Hydrogen Peroxide 200 µM	69.86 ± 0.80
Hydrogen Peroxide 300 µM	53.02 ± 1.51
Hydrogen Peroxide 400 µM	35.73 ± 0.81
DMSO 10 µM + Hydrogen Peroxide 100 µM	80.67 ± 0.79
DMSO 10 µM + Hydrogen Peroxide 200 µM	71.81 ± 0.50
DMSO 10 µM + Hydrogen Peroxide 300 µM	51.83 ± 1.54
DMSO 10 µM + Hydrogen Peroxide 400 µM	36.62 ± 1.30
Berberline 50 µM + Hydrogen Peroxide 100 µM	91.70 ± 1.14*
Berberline 50 µM + Hydrogen Peroxide 200 µM	71.50 ± 0.53
Berberline 50 µM + Hydrogen Peroxide 300 µM	51.30 ± 1.30
Berberline 50 µM + Hydrogen Peroxide 400 µM	36.57 ± 1.59
Berberline 100 µM + Hydrogen Peroxide 100 µM	97.55 ± 0.76*,#
Berberline 100 µM + Hydrogen Peroxide 200 µM	83.22 ± 1.43*,#
Berberline 100 µM + Hydrogen Peroxide 300 µM	62.43 ± 2.06*,#
Berberline 100 µM + Hydrogen Peroxide 400 µM	35.27 ± 0.61

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DMSO และ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกันโดยไม่ได้รับ berberine #แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ berberine ขนาด 50 µM ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกัน

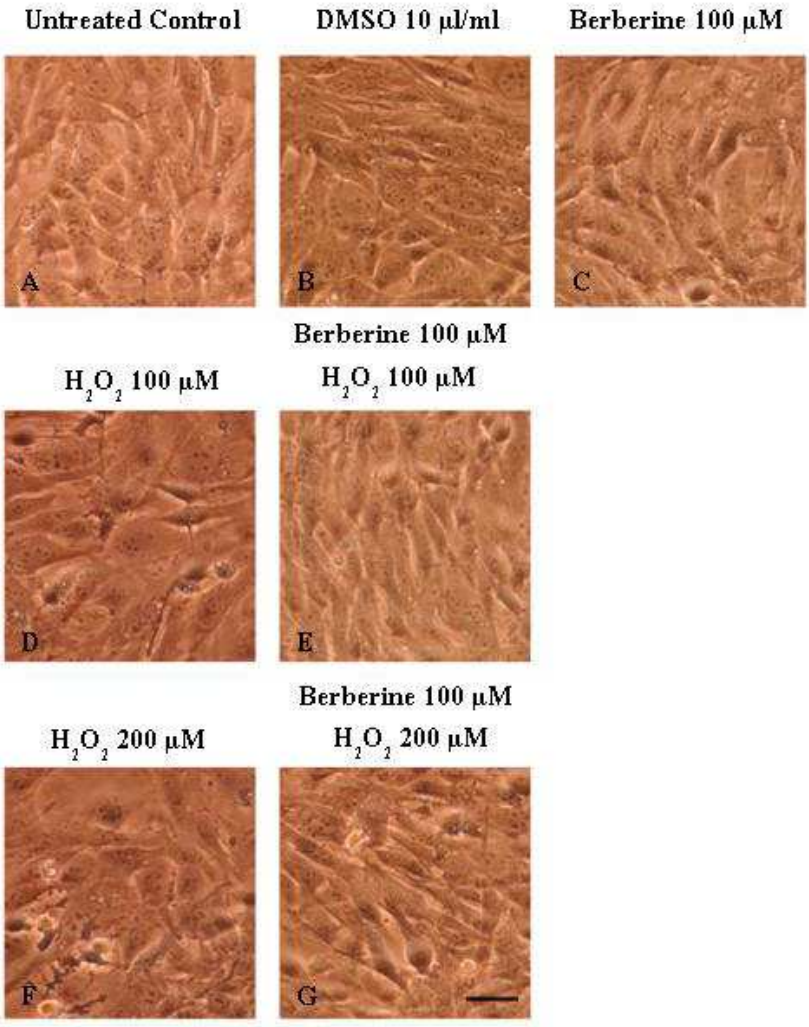


รูปที่ 4 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ culture medium ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 50 และ 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ตามปกติ หรือ culture medium ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-400 µM ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์จะถูกวัดและแสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DMSO และ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกันโดยไม่ได้รับ berberine

$^{\#}$แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ berberine ขนาด 50 µM โดยที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกัน



รูปที่ 5 ภาพ phase contrast micrograph แสดงลักษณะของเซลล์ 661W ภายหลังการได้รับ berberine 100 µM และ hydrogen peroxide ที่ขนาด 100-200 µM

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% หลังจากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงต่อในmedia หรือ DMSO (10 µl/ml) หรือ berberine ที่ความเข้มข้น100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนการได้รับ H_2O_2 ขนาด 100 และ 200 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกภาพกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มที่ได้รับ DMSO อย่างเดียว (B) กลุ่มที่ได้รับ berberine อย่างเดียว (C) กลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 100-200 µM (D,F) และกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM ก่อนการได้รับ H_2O_2 100-200 µM (E,G) ด้วย phase contrast (micron bar=20 µm)

การศึกษาผลของ berberine ต่อการป้องกันการเกิดการอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียส (nuclear chromatin condensation) ของเซลล์ 661W ก่อนได้รับ oxidative stress โดย hydrogen peroxide

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงบน cover slip ที่แช่ใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ culture medium ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 50 และ 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงอย่างใดอย่างหนึ่ง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ตามปกติ หรือ culture medium ที่ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 µM ต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้น nucleus จะถูกนำมาศึกษาเพื่อดูการอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสโดยย้อมด้วย Hoechst 33342 เปอร์เซ็นต์ของ cell ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินใน nucleusจะถูกนับเทียบเป็นร้อยละกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองพบว่าการให้ berberine ที่ขนาด 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแก่เซลล์ สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินได้หลังได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 µM เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวที่ขนาดที่เท่ากันหรือกลุ่มที่ได้รับ DMSO 10 l/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเท่ากัน (ตารางที่ 4 รูปที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 µM อย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ DMSO 10 µl/ml 2 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเท่ากันพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 6)

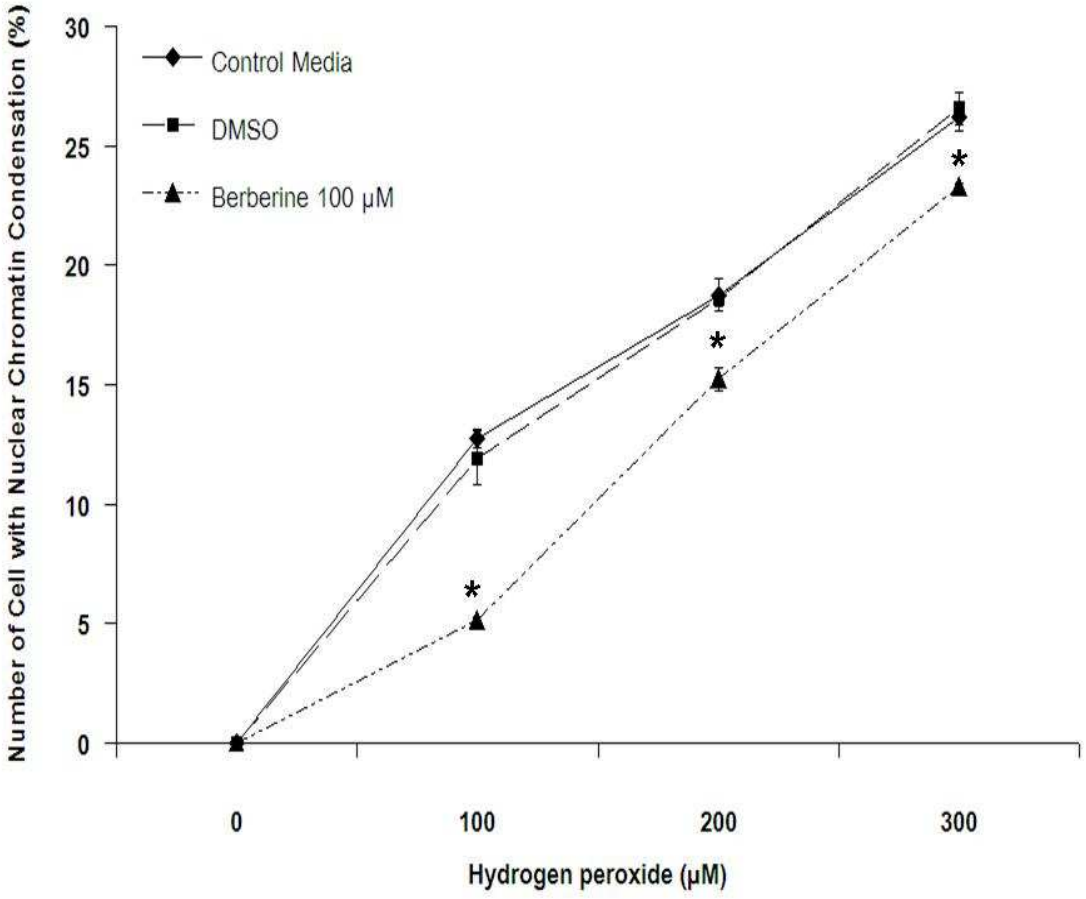
นอกจากนั้นลักษณะของเซลล์ 661W ภายหลังได้รับ berberine และ H_2O_2 ได้ถูกศึกษาโดยทำการเลี้ยงเซลล์บน cover slip ใน media เลี้ยงเซลล์จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ปกติ หรือ media ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติ หรือ culture medium ที่ผสม hydrogen peroxide ที่ขนาด 100-200 µM ต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนการย้อมโครมาตินด้วย Hoechst 33342 และถ่ายภาพ nuclear morphology ด้วย fluorescence microscopy (รูปที่ 7) จากการศึกษาพบว่าการให้ berberine 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนให้ oxidative stress ด้วย H_2O_2 ที่ขนาด 100-200 µM สามารถลดจำนวนเซลล์ที่บรรจุโครมาตินอัดแน่นได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ภายใน nucleus มีการอัดแน่นของโครมาติน (nuclear chromatin condensation) เทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน cultue medium ปกติ หรือ culture medium ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ตามปกติ หรือ culture medium ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 µM ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินใน nucleusจะถูกนับเทียบเป็นร้อยละกับกลุ่มควบคุมและแสดงผลด้วยค่า mean $\pm$ SEM

Treatment	No. of cell with Nuclear chromatin condensation (%)
Control	0.00 $\pm$ 0.00
DMSO 10 µl/ml	0.00 $\pm$ 0.00
Berberine 100 µM	0.00 $\pm$ 0.00
Hydrogen peroxide 100 µM	12.74 $\pm$ 0.40
Hydrogen peroxide 200 µM	18.76 $\pm$ 0.69
Hydrogen peroxide 300 µM	26.20 $\pm$ 0.58
DMSO 10 µl/ml + Hydrogen peroxide 100 µM	11.94 $\pm$ 1.13
DMSO 10 µl/ml + Hydrogen peroxide 200 µM	18.59 $\pm$ 0.32
DMSO 10 µl/ml + Hydrogen peroxide 300 µM	26.56 $\pm$ 0.67
Berberline 100 µM + Hydrogen peroxide 100 µM	5.12 $\pm$ 0.13*,#
Berberline 100 µM + Hydrogen peroxide 200 µM	25.00 $\pm$ 0.48*,#
Berberline 100 µM + Hydrogen peroxide 300 µM	23.28 $\pm$ 0.15*,#

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM และกลุ่มที่ได้รับ DMSO ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกัน # แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM และกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวที่ขนาดเดียวกัน

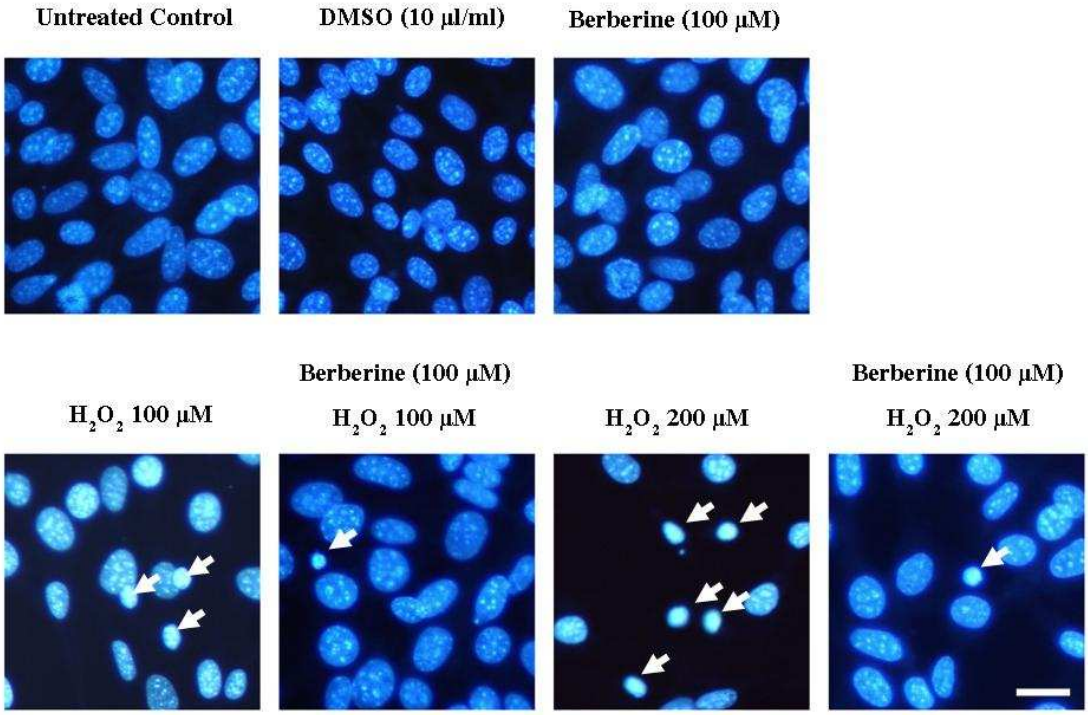


รูปที่ 6 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ภายใน nucleus มีการอัดแน่นของโครมาติน (nuclear chromatin condensation) เทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน culture medium จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน culture medium ปกติ หรือ media ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติ หรือ culture medium ผสม hydrogen peroxide ที่ขนาด 100-300 µM ต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินใน nucleusจะถูกนับเทียบเป็นร้อยละกับกลุ่มควบคุม และแสดงผลด้วยค่า mean $\pm$ SEM

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM และกลุ่มที่ได้รับ DMSO ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเดียวกัน

แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 µM และกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวที่ขนาดเดียวกัน



รูปที่ 7 แสดงภาพถ่ายของนิวเคลียสของเซลล์ 661W หลังได้รับ berberine 100 µM และ hydrogen peroxide ที่ 100-200 µM ด้วยกล้อง fluorescent microscope

เซลล์ 661W ถูกเลี้ยงใน media จนมีความหนาแน่นที่ 85% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ปกติ หรือ media ที่มี DMSO 10 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 100 µM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติ หรือ media ผสม hydrogen peroxide ที่ขนาด 100-200 µM ต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนการย้อมโครมาตินด้วย Hoechst 33342 และถ่ายภาพ nuclear morphology ด้วย fluorescence microscopy ลูกศรแสดงนิวเคลียสที่มีการอัดแน่นของโครมาติน (condensed nucleus) micron bar=20 µm

อภิปรายผลการทดลอง

โรค Retinitis Pigmentosa (RP) เป็นสาเหตุหลักที่ชักนำให้เกิดตาบอดชนิดที่ยังรักษาไม่ได้อันเกิดมาจากการถูกทำลายของเซลล์ในจอประสาทตา (1) โดยอุบัติการณ์ของการเกิด RP ของประชากรโลกรวมถึงของประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 1 ต่อ 4000 ซึ่ง RP เป็นกลุ่มของโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากการเกิด mutations ของยีนหลากหลายกลุ่มซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์รับภาพชนิดแท่ง (rod photoreceptor) และตามด้วยการค่อยๆ ตายของเซลล์รับภาพชนิดกรวย (cone photoreceptor) จาก oxidative damage อย่างน้อย 36 ยีนที่พบว่าเป็นสาเหตุของ RP และการตายของเซลล์ประสาทตาชนิดแท่ง (2) เนื่องจากเซลล์รับภาพชนิดแท่งเป็นแหล่งหลักของการใช้ออกซิเจนในจอประสาทตาดังนั้นถ้าปราศจากเซลล์แท่งจะทำให้ระดับออกซิเจนในจอประสาทตาสูงขึ้นทำให้ทำอันตรายต่อจอประสาทตาและเซลล์ประสาทตาชนิดกรวยได้ภายหลังจากอนุมูลอิสระ (9-14)

เนื่องจากเซลล์กรวยตายจากการทำลายด้วย oxidative stress ดังนั้นการนำสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จึงได้ถูกนำมาเสนอเพื่อใช้ในการชะลอหรือป้องกันการตายของเซลล์กรวยในโรค RP โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าใน RP หลายๆ ชนิดนั้นมีการตายของเซลล์รับภาพแบบ apoptosis เกิดขึ้นและเกี่ยวข้องอยู่ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกหรือเส้นทาง (pathway) ที่เกี่ยวข้องอย่างชัดเจน (15-16)

การจะนำเอาเซลล์รับภาพชนิดกรวยจำนวนมากในสัตว์มาศึกษานั้นเป็นเรื่องยากเนื่องจากจำนวนเซลล์นี้ที่อยู่ในจอประสาทตานั้นถือว่าเป็นจำนวนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับเซลล์รับภาพชนิดแท่ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้การศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ mouse cone photoreceptor-derived cells (661W) ซึ่งได้รับ hydrogen peroxide เพื่อชักนำให้เกิดการทำลายของเซลล์ด้วย oxidative stress โดยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ berberine ซึ่งได้ถูกศึกษามาแล้วว่ามีคุณสมบัติเป็น antioxidant และสามารถป้องกันการตายของเซลล์หลายชนิดจาก oxidative stress ได้ เช่น smooth muscle cells, endothelial cells and mesangial (32-33) ตามทฤษฎีนั้นในระยะแรกการตายของเซลล์แท่งอย่างเดียวไม่ควรจะนำไปสู่ปัญหาที่รุนแรงต่อผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในเมืองเนื่องจากแม้แต่ในเวลากลางคืนก็ยังมีแสงสว่างจากไฟฟ้ามากพอที่จะไปกระตุ้นเซลล์การทำงานของเซลล์ชนิดกรวย อย่างไรก็ตามเมื่อมีการตายของเซลล์กรวยเพิ่มมากขึ้นในเวลาต่อมาจะทำให้ผู้ป่วยค่อยๆ ตาบอดอย่างสมบูรณ์โดยไม่มีการแสดงของ mutated protein ในเซลล์กรวย การนำเอาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมาใช้จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการสูญเสียของเซลล์ประสาทตาชนิดกรวยซึ่งจะนำไปสู่การตาบอดได้

จากการทดสอบความเป็นพิษของ berberine ต่อเซลล์ 661W เพื่อหาขนาดที่เหมาะสมเพื่อนำมาศึกษาในการทดลองต่อมาพบว่า cell viability ของกลุ่มที่ถูกเลี้ยงใน culture medium ปกติ หรือ culture medium ที่มี DMSO 20 µl/ml หรือ berberine ที่ขนาด 25, 50, 100 และ 100 µM เป็นเวลา 2

ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงเซลล์ต่อใน media ตามปกติต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ berberine ที่ขนาด 200 μM จะมีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตรอดถึงประมาณร้อยละ 17 เทียบกับกลุ่มอื่นๆ ทั้งหมด (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า berberine ขนาด 10-50 μM สามารถยับยั้งการตายของ mesenchymal stem cell จากการตายแบบ apoptosis ซึ่งชักนำโดยการขาดออกซิเจนได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (39) นอกจากนี้ยังพบว่า berberine ที่ขนาด 10-50 μM สามารถลด oxidative stress จากการยับยั้งการสร้าง superoxide anion ใน macrophage (40) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ขนาดความเข้มข้นของ berberine ที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปคือ 50 และ 100 μM เนื่องจากในการทดสอบเบื้องต้น (pilot study) พบว่า berberine ที่ขนาดน้อยกว่า 50μM ไม่สามารถป้องกันการตายของ 661W cells ที่ถูกชักนำโดย H_2O_2 ที่ขนาด 100 μM และ berberine ที่ขนาด 200 μM สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ พบว่ายังไม่เคยมีการนำ berberine มาศึกษากับเซลล์ 661W ก่อนการศึกษาครั้งนี้

การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่เลี้ยงใน culture medium อย่างเดียวและที่ได้รับ culture medium ผสมด้วย H_2O_2 ที่ขนาดความเข้มข้น 100-1000 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของ H_2O_2 เป็นลักษณะ does-dependent manner โดยที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดหลังได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 μM มีค่าเป็นร้อยละ 80.16, 69.98, 51.40, 37.21, 33.16, 24.94, 23.23 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ โดยที่ทุกกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 800 และ 1000 μM (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2) จากการถ่ายภาพด้วย phase contrast microscope (รูปที่ 3) พบว่าเซลล์มีการถูกทำลายและตายเพิ่มขึ้นหลังได้รับ H_2O_2 100-1000 μM ในลักษณะ dose-dependent manner ซึ่งสอดคล้องกับค่า cell viability ที่ได้จากการทดลอง ในการศึกษาที่ผ่านมาโดยการวัดระดับของเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase พบว่าร้อยละของเซลล์ 661W ที่มีชีวิตรอดหลังได้รับ H_2O_2 250 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงมีค่าประมาณ 88 (41) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการศึกษาครั้งนี้ซึ่งอาจเนื่องจากเวลาที่เลี้ยงเซลล์ใน medium ที่ผสม H_2O_2 และเทคนิคที่ใช้วัดการอยู่รอดของเซลล์มีความแตกต่างกัน ส่วนการศึกษาค่าร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอดโดยใช้เทคนิค MTT assay พบว่าเซลล์ 661W ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่าประมาณร้อยละ 56 ของกลุ่มควบคุมซึ่งค่าที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากเทคนิคที่ใช้มีความแตกต่างกัน

จากการทดลองที่ได้ทำให้เลือกขนาดของ H_2O_2 ที่ 100-400 μM ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดของเซลล์ที่ 40-80% ซึ่งหากเลือกใช้ H_2O_2 ที่ขนาดสูงเกินไปอาจทำให้เป็นการยากที่จะเห็นฤทธิ์ในการป้องกันของ berberine ได้ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2-3)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการให้ berberine ที่ขนาด 50 และ 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนการได้เลี้ยงใน media ที่ผสม H_2O_2 ที่ขนาด 100-400 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถช่วยป้องกันการตายของเซลล์ได้ โดยพบว่าการได้รับ berberine ที่ขนาด 50 μM ก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100 μM สามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสามารถเพิ่มเซลล์ที่อยู่รอดจาก 80.67% เป็น 91.70% เมื่อเพิ่มขนาดของ H_2O_2 เป็น 200-400 μM พบว่าไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ได้ ส่วนกลุ่มที่ได้รับ berberine 100 μM ก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 μM พบว่าสามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยสามารถเพิ่มเซลล์ที่อยู่รอดจาก 80.67, 71.81,51.83% ในกลุ่มที่ได้รับ DMSO vehicle เป็น 97.55, 83.22, 62.43% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม berberine ที่ขนาด 100 μM ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 400 μM ได้ (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 4) โดยจากการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วย phase contrast microscope ๖ (รูปที่ 5) พบว่า 661W cells ในกลุ่มที่ได้รับ berberine ที่ขนาด 100 μM ก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μM มีการทำลายของเซลล์น้อยลงและเซลล์มีการเจริญใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการป้องกันการตายและการทำลายของ 661W โดย berberine เพื่อต้านต่อ oxidative stress โดย H_2O_2 พบว่าเกิดขึ้นได้ในขนาดของ H_2O_2 ที่ค่อนข้างต่ำคือที่ 100-300 μM เท่านั้น ซึ่งลดการตายลงได้ 16.88, 11.44, และ 10.6 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการต้านฤทธิ์ของ H_2O_2 โดย curcumin ที่ขนาด 25-100 μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมงสามารถป้องกันการตายของเซลล์จากการได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นถึง 600 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้ โดยสามารถเพิ่มเซลล์ ARPE-19 ที่มีชีวิตรอดจากร้อยละ 15 ในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 25, 35 และ 60 ตามลำดับโดยสอดคล้องกับขนาดความเข้มข้นอของ curcumin ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของการลดการตายของเซลล์ชนิดอื่นโดย berberine พบว่า berberine ที่ขนาด 10-50 μM สามารถลดการสร้าง superoxide anion ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของ oxidative stress ใน macrophages และทำให้เกิดการเกาะกันของไขมันที่ผนังหลอดเลือดโดยมี macrophage เป็นองค์ประกอบได้ (40) จากการศึกษาการป้องกันการตายของเซลล์ 661W โดย curcumin จากการชักนำโดยแสงซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมของจอประสาทตา (light-induced retinal degeneration) พบว่าการได้รับ crucumin 20 μM ก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 250-1000 μM สามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยไปปรับเพิ่ม (upregulating) เอ็นไซม์กลุ่มที่ช่วยปกป้องการตายของเซลล์เช่น เช่นHO-1 และ thioredoxin เป็นต้น (88) ในการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า berberine ที่ขนาด 75-350 mg/kg สามารถลดระดับ malondialdehyde และเพิ่ม catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidatase และ glutathione activities ซึ่งนำไปสู่การลด oxidative stress ในเนื้อเยื่อตับและซีรัมของหนูที่เป็นโรคเบาหวานได้ (42)

จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในเซลล์ 661W ที่มีการอัดแน่นของโครมาติน (nuclear chromatin condensation) โดยการย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 พบว่า

เซลล์ 661W กลุ่มที่ได้รับ berberine ที่ขนาด 100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการได้รับ H_2O_2 ที่ขนาด 100-300 μM สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินได้หลังได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวที่ขนาดที่เท่ากันหรือกลุ่มที่ได้รับ DMSO 10 μl/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ขนาดเท่ากัน (ตารางที่ 4 รูปที่ 6) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ 661W ที่ได้รับ H_2O_2 200 μM เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจะพบเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TUNEL labeling technique ซึ่งใช้สำหรับตรวจสอบเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis ประมาณร้อยละ 10 (90) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีค่าต่ำกว่าจำนวนของเซลล์ที่บรรจุนิวเคลียสที่มีการอัดแน่นของโครมาตินซึ่งถือเป็นลักษณะหนึ่งซึ่งใช้ประกอบการระบุเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งมีค่าเป็น 18.59% อย่างไรก็ตามการย้อมเซลล์ด้วย TUNEL labeling technique มักไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis แต่เป็นการเกิดโดยการสุ่มอิสระ (random) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จำนวน TUNEL labeling cells ที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาจึงมีค่าน้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่บรรจุนิวเคลียสที่มีการอัดแน่นของโครมาตินในการศึกษาครั้งนี้ในกลุ่มเซลล์ 661W ที่ได้รับ H_2O_2 ในขนาดและเวลาเท่ากัน นอกจากนี้มีบันทึกว่า H_2O_2 สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้น (upregulation) ของระดับ mRNA ของ apoptotic marker genes เช่น caspase-I และการลดลง (downregulation) ของ BIRC-4 ซึ่งเป็น negative regulator ของ apoptosis ในเซลล์ 661W photoreceptor (37)

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า berberine อาจสามารถนำมาใช้เพื่อป้องกันการตายของ cone photoreceptor จากความผิดปกติหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ที่ถูกชักนำโดย oxidative stress เช่น retinitis pigmentosa และโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของจอประสาทตาชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการตายของเซลล์ 661W จาก oxidative stress เพิ่มเติม