บทคัดย่อ

วิธีการทดสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันได้ถูกดัดแปลงเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โครงการวิจัยนี้ได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบ mitogenesis assay และ mixed lymphocyte reaction (MLR) โดยวัดการตอบสนองด้วยการใช้สีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี [^{3}H]-thymidine ตามวิธีมาตรฐาน ในวิธีทดสอบ mitogenesis ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 บ่มร่วมกับ media ที่มี หรือไม่มี mitogen ใน 96 microtiter plate ที่อุณหภูมิ 37^{o}C 5% CO_2 สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมใช้ปริมาณเซลล์ 8x10^5 เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองของ B lymphochyte โดยกระตุ้นด้วย 1-100 μg/ml lipopolysaccharide และวัดการตอบสนองที่ 24-48 ชม. ภายหลังการกระตุ้น การทดสอบการตอบสนองของ T เซลล์ใช้ 2.5-10 μg/ml concanavalin A mitogen และวัดการตอบสนองที่ 48-72 ชม. ส่วนการทดสอบการตอบสนองของทั้ง T และ B เซลล์ ใช้ 1-100 μg/ml pokeweed mitogen และวัดการตอบสนองที่ 24 ชม. ในวิธีทดสอบ MLR ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 เป็นเซลล์ responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย DBA/2 ที่ผ่านการบ่มร่วมกับ 50 μg/ml mitomycin C เป็นระยะเวลา 45 นาทีเป็นเซลล์ stimulator สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมคือปริมาณเซลล์ของ responder 4-8x10^5 เซลล์/หลุม อัตราส่วนของเซลล์ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ 5 การใช้ MTT colorimetric assay อาจเหมาะสมในการใช้คัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันใน mitogenesis assay แต่สำหรับการทดสอบของ MLR ที่ต้องการวัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ความเชื่อมั่นของการแปลผลจะน้อยกว่าในวิธีมาตรฐาน

Abstract

Two basic immunotoxicological tests were modified for screening medicinal plants with immunomodulating activity The present project used the tetrazolium dye -3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for the measurement of lymphoproliferative response in mitogenesis assay and mixed lymphocyte reaction (MLR) as an alternative to the standard method using the radioactive [^{3}H]-thymidine. In the mitogenesis assay, splenocytes from female C57Bl/6 mice were cultured in the presence or absence of mitogen in a 96-well plate, incubated at 37^{o}C and 5% CO_2. The optimized cell number of the culture was 8x10^{5} cells/well. For the optimum B cell mitogenic response, 1-100 μg/ml lipopolysaccharide was used, and the peak response was 24-48 h post stimulation. For the T-cell mitogenic response, the optimum concentration of concanavalin A was 2.5-10 μg/ml, and the response was evaluated at 48-72 hr. For the optimum mitogenic response of both T and B cells, 1-100 μg/ml poke weed mitogen was used and the response was evaluated at 24 hr.. In MLR, splenocytes from female C57Bl/6 mice was used as responder cells and the 50 μg/ml mitomycin C-treated splenocytes from DBA/2 mice were used as stimulator cells. The optimum concentration of responder cells in the culture was 4-8x10^{5} cells/well, the ratio of responders to stimulators was 1 to 4, and the peak response occurred at day 4 or 5. Overall, MTT colorimetric method could be used for determining lymphoproliferative response in the mitogenesis assay, and applied for selecting medicinal plants with immunomodulating activity. However, using the MTT method for measurement of the response in one-way mixed lymphocyte reaction in MLR could be difficult to interprete and might be less relevant compared to the traditional method.