บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ (Cell culture)

- เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนมนุษย์ SW1353 (Human chondrosarcoma)
- เซลล์กระดูกอ่อนปกติปฐมภูมิของสุนัข (Primary canine chondrocyte)

3.1.2 สารเคมี

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, USA)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
- Penicillin - Streptomycin (Gibco, USA)
- Amphotericin B (Gibco, USA)
- Phosphate buffer saline (PBS) (Vivantis Technologies, Malaysia)
- Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) (Lab-scan, Ireland)
- Dichloromethane (Analytical Reagent grade; AR grade) (RCI Labscan, Thailand)
- Methanol (Analytical Reagent grade; AR grade) (J.T. Baker, Center Valley PA)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)
- Tetrazolium dye MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Bio Basic, Canada)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (RCI Labscan, Thailand)
- NaCl (Merck, Germany)
- KCl (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Na_2HPO_4 (Lab-scan, Ireland)
- KH_2PO_4 (Merck, Germany)
- Trypan blue (Gibco, USA)
- น้ำกลั่น

3.1.3 เอนไซม์

- Trypsin (Gibco, USA)

3.1.4 ชุดทดสอบ

- Muse® Caspase-3/7 Assay apoptosis detection kit (Merck Millipore, Thailand)

3.1.5 อุปกรณ์ในชุดทดสอบ

- Buffer
- Caspase-3/7 working reagent
- 7-AAD working reagent
- 7-AAD หรือ 7-aminoactinomycinD เป็นสารสัญลักษณ์ที่บ่งบอกการสูญเสียสภาพของผนังเซลล์ (cell debris) ที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบหาการตายของเซลล์

3.1.6 อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อ (sterile)

- ขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาดพื้นที่เพาะเลี้ยง 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร (Nunc, Denmark)
- จานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) (Nunc, Denmark)
- Centrifuge tube ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร
- Micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อุปกรณ์ช่วยไปเปต (pipette aid)
- Autopipette ขนาด 2, 20, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
- Multichannel pipette แบบ 8 channels ขนาด 200 ไมโครลิตร
- Tips ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- ขวด Duran ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- Syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.7 อุปกรณ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ (nonsterile)

- ถุงมือยาง
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ไฟแช็ก
- ภาชนะทิ้งสาร (waste bottle)
- พาราฟิล์ม
- กระดาษชำระ
- Haemocytometer และ cover slip สำหรับนับเซลล์

3.1.8 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ตู้เพาะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) (SLshellab, Canada)
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- ตู้ทำงานปลอดเชื้อ (Dwyer, USA)
- เครื่อง vortex (Shelton, USA รุ่น VSM-3)
- Shaker ควบคุมอุณหภูมิ (Shellab, Canada)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, UK รุ่น Mikro 200)
- เครื่องอ่านวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (spectrophotometer micro-plate reader)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)
- เครื่องชั่งสารเคมี
- เครื่องวัด pH (Toledo, Switzerland)
- กล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง (inversed microscope) (Nikon, Japan รุ่น ECLIPSE TE 300)
- หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) (Hirayama, Japan รุ่น HiclaveHV-110)
- เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Elga purelab option, UK รุ่น 03007BPM1)

3.2 สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลการใช้สารสกัดหยาบสมุนไพรจำนวน 31 ชนิด ทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกอ่อนเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ของสารสกัดแต่ละชนิดและคัดเลือกสมุนไพรที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน เพื่อนำมาทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

3.4 วิธีวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน (human chondrosarcoma) SW1353 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เคยมีรายงานการใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาของ anti-tumor agent (Makoto et al. 2008) เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน SW1353 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ร่วมกับเซลล์กระดูกอ่อนปกติซึ่งเป็นเซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิของสุนัข (primary canine chondrocyte) ทำการเก็บตัวอย่างจากข้อเข่าปกติของสุนัขภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการผ่าตัดจากสุนัขที่เข้ารับการตัดขาตามวิธีมาตรฐานทางศัลยศาสตร์ทางสัตวแพทย์ การเก็บตัวอย่างเซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิของสุนัขทำได้โดยเอาชั้นผิวหนัง กล้ามเนื้อ เส้นเอ็นและหลอดเลือดบริเวณขาออกโดยไม่เปิดถุงหุ้มข้อ นำส่วนที่เหลือไปแช่ในน้ำยาเดทตอลเจือจาง 5 % เป็นเวลา 15 นาทีและนำไปแช่ต่อในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 15 นาที เก็บกระดูกอ่อนผิวข้อด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใช้มีดตัดกระดูกอ่อนผิวข้อเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 1 - 2 ตารางมิลลิเมตร นำไปจุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % นาน 2 - 5 วินาที แล้วนำมาแช่ใน PBS 20 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะเจนต้ามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วจึงย้ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี PBS และยาปฏิชีวนะ 1 % ใช้กรรไกรผ่าตัดตัดชิ้นกระดูกให้มีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะตัดได้ แล้วย้ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 5 % CO_2 อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงดูดเอนไซม์คอลลาจีเนสทิ้ง เติม DMEM ที่มี Fetal calf serum (FCS) 10 % และยาปฏิชีวนะเจนต้ามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 5 % CO_2 อุณหภูมิ 37 ^{o}C เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 48 ชั่วโมง เซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงต่อทางห้องปฏิบัติการตามวิธีของ Nganvongpanit และคณะ (2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ทั้งสองชนิดถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ผสม 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) fetal bovine serum และ 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) antibiotic-antimycotic (มีส่วนผสมของเพนนิซิลิน 10,000 ยูนิทต่อไมโครลิตร สเตรปโตมัยซิน 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทริซิน บี 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพร

สารสกัดหยาบ (crude extract) สมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจากห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีสมุนไพรที่นำมาทดสอบทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ ก้องแกบเครือก้องแกบเครือ (*Ventilago denticulate* Willd.), ดีหมี (*Cleidion javanicum* Blume), โด่ไม่รู้ล้ม (*Elephantopus scaber* L), ติ้วเหลือง (*Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer), ตีนฮุ้งดอย (*Paris polyphylla* var. *chinensis*), เปล้าเลือด (*Stephania venosa* (Blume) Spreng.), ฝาง (*Caesalpinia sappan* L), เพกา (*Oroxylum indicum* (L.) Kurz), มะเดื่อปล้อง (*Ficus thailandica* C.C. Berg & S. Gardner), ไม้แดง (*Xylia xylocarpa* Taub.), รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.), รางจืดแดง (*Thunbergia coccinea* Wall.), ละหุ่งแดง (*Ricinus communis* L.), สีฟันคนทา (*Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.), เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps militaris*) และอ้อยขม (*Saccharum officinarum* Linn) โดยสมุนไพรทั้ง 16 ชนิดถูกสกัดด้วยวิธีการสกัดทั้ง 2 แบบ คือ สกัดโดยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และเมทานอล (methanol) ยกเว้นสารสกัดหยาบเมทานอลของเห็ดถั่งเช่าที่ไม่มีตัวอย่างสารสกัดหยาบจึงไม่สามารถนำมาทดสอบได้ ทำให้สารสกัดหยาบทั้งหมดมี 31 ชนิด นำสารสกัดหยาบที่ได้มาละลายในตัวทำละลาย DMSO (20 มิลลิกรัมของสารสกัดหยาบต่อ 1 มิลลิลิตรของ DMSO) เพื่อเป็น stock solution (Salvat *et al.* 2001)

การเตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพร (กนกวรรณ 2554) มีขั้นตอนดังนี้คือ บดตัวอย่างพืชแห้งให้ละเอียดด้วยเครื่องบดหยาบ (Blender) นำมาชั่ง 50 กรัม สกัดด้วยเมทานอล (AR grade) 2 ลิตร ประมาณ 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เมื่อครบเวลาดังกล่าวแล้วจึงกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วนำสารสกัดเมทานอลที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบเมทานอล (methanol crude extract) ชั่งปริมาณสารสกัดที่ได้ จดบันทึก หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอลอีกสองครั้งแล้วนำสารสกัดมารวมกัน นำกากที่ผ่านการสกัดด้วยเมทานอลแล้วมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรอง และระเหยแห้งด้วย Rotary Evaporator ได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (dichloromethane crude extract) ชั่งปริมาณสารสกัดที่ได้และจดบันทึก หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนอีกสองครั้งแล้วนำสารสกัดมารวมกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การคัดเลือกสารสกัดหยาบด้วยวิธี MTT assay

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้งหมด 31 ชนิด เพื่อหาค่าความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนด้วยวิธี MTT assay โดยอ่านผลหลังการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดสอบในเซลล์กระดูกอ่อนแบบชั้นเดียว (monolayer chondrocyte) จะทำภายในระยะเวลา 19 ถึง 36 ชั่วโมง (Favaretto *et al.* 1989; Castell and Gomez-Lechon 1996; Alegre-Aguaron et al. 2014) คัดเลือกสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยวิธี MTT assay คือการวัดปริมาณเซลล์มีชีวิตด้วยการดู metabolic activity ของเซลล์ โดยหลักการ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยน tetrazolium dye MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ให้เป็น formazan ซึ่งมีสีม่วงฟ้าได้โดยเอนไซม์ mitocholdrial reductase ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิต หลังจากนั้นสีจะถูกวัดค่าความดูดกลืนแสง (absorption) ที่ 570 นาโนเมตร โดยที่ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น หลังจากการทดสอบเซลล์ด้วย MTT assay สามารถทราบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหรือค่าความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (cytotoxicity) ได้

การทดลองจะแบ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 15 ชนิด ทั้งที่สกัดแบบ methanol และ dichloromethane ออกเป็น 10 ความเข้มข้น คือ 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดลองทั้งในเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกอ่อนปฐมภูมิที่เลี้ยงใน 96 well plate ใช้ 5% DMSO เป็น positive control ที่แสดงการตายของเซลล์ (Toru *et al.* 2002) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็น negative control และใช้ 0.25% DMSO ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทำละลายสารสกัดหยาบเพื่อลดปัจจัยเรื่องการตายจากฤทธิ์ของตัวทำละลาย DMSO (นำผลไปใช้ในการคำนวณทางสถิติ) โดยจะทำการทดลองให้เซลล์ได้รับการสกัดและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต (Cell viability) ด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดตามขั้นตอน คือ ชั่งสาร MTT 5 มิลลิกรัม ผสมกับ DMEM 10 มิลลิลิตรให้ละลายจนไม่เหลือตะกอนของสาร MTT โดยคำนวณปริมาณให้ได้สารที่ผสมแล้ว 100 ไมโครลิตรต่อ 1หลุมของ 96-well plate จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าใน 96-well plate ทิ้ง แล้วจึงเติม PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตรเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด ใช้ไมโครปิเปตดูด PBS ที่ใช้ล้างเซลล์ทิ้ง เติมสารผสม MTT + DMEM 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของ 96-well plate แล้วจึงนำไปบ่มในตู้ CO_2 incubator ในสภาวะ 37 ^{o}C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงใช้ไมโครปิเปตดูดสารใน 96-well plate ทิ้ง ใช้ไมโครปิเปตดูดสาร DMSO เติมลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ 96-well plate เข้าเครื่อง shaker เขย่าด้วยความเร็ว 60 ครั้งต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 570 nm ด้วย ELISA microplate reader นำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณค่า IC_{50} และนำค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำนวณหาค่าความจำเพาะของสาร Selectivity index (SI) โดยจะพิจารณาเลือกสารสกัดหยาบที่มีค่า SI สูงกว่า เพื่อคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การคำนวณ Selectivity index (SI) หรือดัชนีการคัดเลือก

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติ}}{IC_{50} \text{ ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน}}$$

การคำนวณในที่นี้ ค่า SI คือ IC_{50} ของเซลล์กระดูกอ่อนปกติหารด้วย IC_{50} ของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดนั้น ๆ

3.4.4 ทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยใช้หลักการของ flow cytometry

ในการทดสอบครั้งนี้ ชุดทดสอบ Muse® Caspase-3/7 kit (Millipore, USA) ถูกนำมาใช้ตรวจสอบการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยผลการทดสอบสามารถวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต (cell viability) อัตราการตายของเซลล์โดยรวม (rate of death cells) อัตราการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (rate of apoptosis cells) และอัตราการตายของเซลล์แบบเนโครซิส (rate of necrosis cells) โดยจะรายงานผลการทดสอบเป็นค่าร้อยละ (percentage) และกราฟแสดงอัตราส่วนเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ตรวจนับได้ทั้งหมด (Grazia *et al.* 2014)

สารสกัดหยาบที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นแล้วจะถูกนำมาทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิส คือ ความเข้มข้นที่ IC_{50} ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดตามผลการทดสอบด้วยวิธี MTT assay

ขั้นตอนการวัดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ด้วยชุดทดสอบ Muse® Caspase-3/7 เริ่มจากการเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบใช้เซลล์ในปริมาณ 200,000-500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติม 1X Assay Buffer BA ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่างลงไปในหลอดที่มีเซลล์ แล้วดูดเป่าเซลล์เบาๆ ให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในการเตรียม working reagent ของ Caspase-3/7 และ 7AAD (ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 ตัวอย่าง) ทำได้โดยผสม Caspase-3/7 stock solution ปริมาณ 5 ไมโครลิตร เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน Caspase-3/7 working reagent 1 ส่วนต่อ PBS 7 ส่วน ในส่วนของ 7AAD reagent ใช้ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 1X Assay Buffer BA ในอัตราส่วน 2 ต่อ 148 (ให้ปริมาณรวมเป็น 150 ไมโครลิตร) จากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ใน 1X Assay Buffer BA ปริมาณ50 ไมโครลิตร เติมด้วย Caspase-3/7 working solution ปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ในระหว่างที่รอบ่มสาร เปิดชุดทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Muse® Caspase-3/7 เพื่ออุ่นเครื่อง เมื่อครบ 30 นาทีแล้วจึงเติม 150 ไมโครลิตรของ 7AAD working solution ลงไป แล้วจึงนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Muse® Caspase-3/7

3.4.5 การทดสอบทางสถิติ

คำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 14.0 (SPSS, Chicago IL) โดยแต่ละกลุ่มการทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative และ positive control ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) แบบ Three-way ANOVA (หรือเรียกได้อีกแบบว่า factorial ANOVA) ร่วมกับ Tukey's post hoc test เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่าง 3 ปัจจัย คือ เซลล์ที่ต่างชนิดกัน สารละลายที่แตกต่าง และสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิด และใช้วิธี independent t test ในการเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์มีชีวิต ร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส และร้อยละของเซลล์ที่มีการตายแบบเนโครซิสระหว่างเซลล์กระดูกอ่อนปกติและเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน คำนวณที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p value <0.05) จึงถือว่ามีความสัมพันธ์กันแบบมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved