Chulalongkorn University Dental Journal

Volume 23 | Issue 2 Article 2

2000-05-01

Comparison of two methods in measuring the cytotoxicity effects: Methylene blue assay and MTT assay(การศึกษาเปรียบเทียบผลของการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเมทิลีนบลูกับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที)

Kanokwan Charoonpatrapong

Kassara pattamapun

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/cudj

Part of the Dentistry Commons

Recommended Citation

Charoonpatrapong, Kanokwan and pattamapun, Kassara (2000) "Comparison of two methods in measuring the cytotoxicity effects: Methylene blue assay and MTT assay(การศึกษาเปรียบเทียบผลของการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเมทิลีนบลูกับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที)," *Chulalongkorn University Dental Journal*: Vol. 23: Iss. 2, Article 2.
DOI: 10.58837/CHULA.CUDJ.23.2.2
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/cudj/vol23/iss2/2

This Original article is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Dental Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

ว ทันต จุฬาฯ 2543; 23:83-90

การศึกษาเปรียบเทียบผลของการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเมทิลีนบลูกับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที

กนกวรรณ จรูญภัทรพงษ์, ท.บ.
เกษรา ปัทมพันธุ์, ท.บ., วท.ม.

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลการวัดความเป็นพิษด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูกับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที

วัสดุและวิธีการ วัดความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกและวัดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีดังกล่าว เปรียบเทียบผลของความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิดที่ได้จากการวัดในวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูหรือวิธีวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว เพื่อหาระดับความเป็นพิษของสารทดสอบในแต่ละความเข้มข้นที่มีต่อเซลล์ในแต่ละวิธีวิเคราะห์ จากนั้นจึงนำผลที่แสดงระดับความเป็นพิษของวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกัน

ผลการศึกษา พบว่าการวัดความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกด้วยสารเอ็มทีทีและการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู แสดงระดับความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นเดียวกันของฟลูออไรด์ (100 พีพีเอ็ม, $p<0.05$) และในทำนองเดียวกัน ผลจากการวัดความเป็นพิษทั้งสองวิธี แสดงระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ระดับความเข้มข้น $\geq$ 25 ไมโครโมลาร์ เช่นเดียวกัน ($p<0.05$)

สรุป วิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูให้ผลในการวัดความเป็นพิษไม่แตกต่างกันกับวิธีการมาตรฐานที่วัดผลด้วยสารเอ็มทีที

(ว ทันต จุฬาฯ 2543; 23: 83-90)

บทนำ

การทดสอบคุณสมบัติของยาและวัสดุทางการแพทย์จัดเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการนำยาและวัสดุนั้น ๆ ไปใช้ในทางคลินิก การทดสอบหนึ่งที่เป็นส่วนสำคัญสำหรับการพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำยาหรือวัสดุนั้น ๆ ไปใช้กับมนุษย์ คือ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของยาและวัสดุชนิดต่างๆ กับเซลล์และเนื้อเยื่อของมนุษย์ ดังนั้นการทดสอบเหล่านี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้วิธีการทดสอบที่น่าเชื่อถือได้ ในกรณีของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ จัดเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีสารทดสอบในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นจึงทำการวัดผลโดยหาปริมาณเซลล์ที่ตายหรือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าว วิธีการวัดหาปริมาณเซลล์ที่ตายจากการทดสอบ เช่น การย้อมสีเซลล์ด้วยสีทริแพนบลู (trypan blue)[1] หรือวัดหาปริมาณการตายของเซลล์โดยการติดฉลากเซลล์ด้วยสารกัมมันตภาพรังสีของโครเมียม (^{51}Cr) แล้ววัดปริมาณโครเมียมที่รั่วออกสู่อาหารเลี้ยงเซลล์[2-3] ส่วนวิธีการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่วิธีที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การวัดหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ (dehydrogenase enzyme) ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)[4-12]

อย่างไรก็ตามการใช้สารเอ็มทีทีอาจมีข้อจำกัดบางประการในด้านของค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการทดลอง ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จากการย้อมสีเซลล์ที่ยังคงมีเยื่อหุ้มเซลล์ปกติโดยการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene blue)[13-15] หรือการย้อมสีเซลล์ด้วยสีนิวทรอลเรด (Neutral red)[10-11,16-17] ซึ่งการย้อมสีเซลล์นี้จะทำในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดที่เกาะยึดติดที่ผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น เซลล์บุผิว (epithelial cells) หรือเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) ซึ่งเป็นวิธีสะดวกและมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่าการวัดด้วยสารเอ็มทีที

ปัญหาประการหนึ่งของการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ด้วยการย้อมสีเซลล์ คือ ความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (accuracy) ของผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที ซึ่งเป็นที่ยอมรับและเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน[12] ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะเปรียบเทียบผลการวัดความเป็นพิษด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีทีซึ่งเป็นวิธีที่เป็นที่นิยม เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการวัดปริมาณเซลล์ทดสอบว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวัดด้วยวิธีการทั้ง 2 แบบดังกล่าว ในการวัดความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride) ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก และการวัดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ ผลของงานวิจัยครั้งนี้ คาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มความน่าเชื่อถือของการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการย้อมสี ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดกว่า เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายของการวิจัยในอนาคตต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมเซลล์สำหรับใช้ในการทดลอง

เนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ใช้ศึกษาจะได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 จากขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างที่ถอนด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟัน เป็นฟันที่มีสภาพสมบูรณ์ปกติ ไม่มีโรคฟันผุและไม่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ จากผู้ป่วยอายุ 18-23 ปี ที่มารับการรักษา ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บฟันตัวอย่างในภาชนะปลอดเชื้อที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM) ที่มีซีรัมร้อยละ 10 (fetal calf serum:FCS), เพนิซิลลิน จี (penicillin G) 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2 มิลลิโมลาร์ จากบริษัท Gibco BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา

นำฟันตัวอย่างที่ได้มาล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate-buffer saline: PBS) ที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก โดยตัดชิ้นเนื้อส่วนที่เป็นเหงือกออกจากคอฟัน ล้างชิ้นเนื้ออีกครั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบข้างต้น จากนั้นตัดแบ่งชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1×1×1 มิลลิเมตร^3 วางเรียงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish;Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร ห่างกันประมาณ 4-5 มิลลิเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้พอท่วมชิ้นเนื้อส่วนการเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน เตรียมโดยกรอผ่าฟันตามแนวยาวด้วยหัวกรอที่สะอาดและปลอดเชื้อ

โดยควบคุมหัวกรอฟันไม่กรอลึกลงจนถึงเนื้อเยื่อโพรงฟัน จากนั้นใช้ปลายเครื่องมือโลหะที่สะอาดที่มีลักษณะแบน แยกฟันทั้งสองส่วนออกจากกัน หยิบเนื้อเยื่อโพรงฟันออกด้วยคีมจับเนื้อเยื่อที่สะอาด ตัดแบ่งชิ้นเนื้อและวางเรียงในจานเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเดียวกัน จากนั้นจึงนำจานเพาะเลี้ยงไปอบในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งได้เซลล์เต็มจานเพาะเลี้ยง

เมื่อเซลล์เต็มจานเพาะเลี้ยง นำเซลล์ที่ได้ออกจากจานเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อโดยใช้เอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ (0.25% trypsin-EDTA) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 60 มิลลิเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบพื้นฐานดังกล่าวข้างต้น เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน ในอัตราส่วน 1:3 จนกระทั่งได้เซลล์มากพอ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้เซลล์รุ่นที่ 3-8 สำหรับการทดลอง

การทดสอบหาระดับความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก จะถูกหว่านในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร/หลุม นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37°C และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบพื้นฐานข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง เพื่อล้างซีรัมออกแล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและมีโซเดียมฟลูออไรด์ในความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50 และ 100 พีพีเอ็ม และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบหาระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน จะถูกหว่านด้วยวิธีการเดียวกับการทดสอบเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกดังอธิบายข้างต้น จากนั้นหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง เพื่อล้างซีรัมออก แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในความเข้มข้น 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, และ 50 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

เมื่อเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกและเนื้อเยื่อโพรงฟันในสภาวะที่มีโซเดียมฟลูออไรด์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ตามลำดับที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ครบตามกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะถูกวัดตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Freshney[1] ดังนี้คือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด (phenol red) และเติมสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไป นำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกด้วยปิเปตสะอาดจากนั้นละลายผลึกฟอร์มาแซนด้วยสารละลายไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) เขย่าให้สีของสารละลายเข้ากัน ปิเปตสารละลายที่ได้ลงในคิวเวต แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร ผลที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาแซน ของเซลล์ที่ทราบจำนวน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ของการทดลอง

การวิเคราะห์โดยการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene blue assay)

วิธีการวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Oliver และคณะ[14] โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกและเนื้อเยื่อโพรงฟันในสภาวะที่มีโซเดียมฟลูออไรด์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ตามลำดับที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว เซลล์จะถูกคงสภาพ (fixed) ด้วยสารละลายฟอร์มัลดิไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) หลาย ๆ ครั้ง แล้วย้อมด้วยสารละลายสีเมทิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์แล้ว ละลายสีที่ย้อมติดเซลล์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และเอทิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) สัดส่วน 1 : 1 อ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

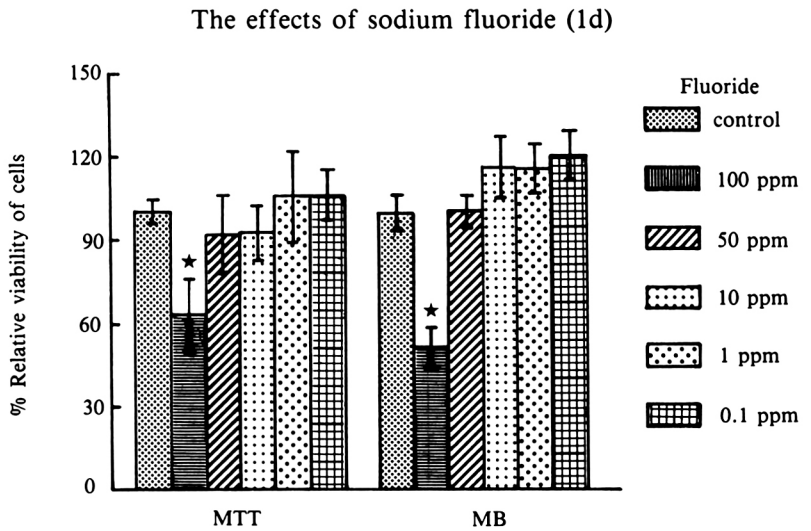
ที่ความยาวคลื่นแสง 667.5 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากกราฟมาตรฐาน

ผลการศึกษา

จากผลการทดลองพบว่า การวัดความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่นำมาจากเหงือกด้วยสารเอ็มทีทีและการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู จะแสดงระดับความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญที่ 100 พีพีเอ็ม เหมือนกัน (รูปที่ 1) ส่วนที่ระดับ 10 และ 50 พีพีเอ็ม เมื่อวัดผลด้วยสารเอ็มทีที จะพบการลดลงของจำนวนเซลล์เล็กน้อยโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนผลการวัดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่นำมาจากเนื้อเยื่อโพรงฟันก็จะแสดงระดับความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญที่ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์เหมือนกัน ทั้งโดยจากการวัดปริมาณเซลล์โดยใช้สารเอ็มทีทีและการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (รูปที่ 2) ส่วนที่ระดับ 6.25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ เมื่อวัดผลด้วยสารเอ็มทีทีและย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูจะพบการลดลงของเซลล์เล็กน้อยโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทั้งนี้ในการวัดผลจะเทียบให้ปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100 จากนั้นความแตกต่างของจำนวนเซลล์จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way Analysis of Variance โดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

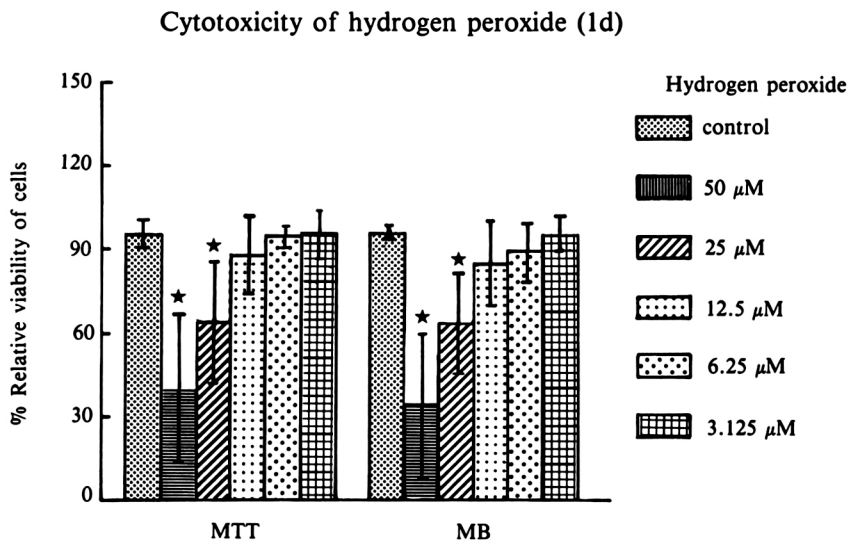


รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเป็นพิษของโซเดียมฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่นำมาจากเหงือกที่ 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอมทีทีและการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู

แกน Y แสดงปริมาณของเซลล์เป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ★ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

Fig. 1 The mean and standard deviation of sodium fluoride cytotoxicity to human gingival fibroblast at 24 hours by MTT and MB assays.

Y-axis shows the percentage of cell number compared with the control group ★ Demonstrate significant difference from the control group ($p<0.05$).



รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่นำมาจากเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอมทีที และการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู

แกน Y แสดงปริมาณของเซลล์เป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ★ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

Fig. 2 The mean and standard deviation of hydrogen peroxide cytotoxicity to human pulpal fibroblast at 24 hours by MTT and MB assays.

Y-axis shows the percentage of cell number compared with the control group ★ Demonstrate significant difference from the control group ($p<0.05$).

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบวิธีการวัดปริมาณเซลล์ 2 วิธี เพื่อทดสอบหาระดับความเป็นพิษของยาหรือวัสดุที่มีต่อเซลล์ในช่องปาก โดยเปรียบเทียบวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู กับวิธีการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีทีซึ่งเป็นวิธีที่เป็นที่นิยมใช้ในการทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การวัดโดยการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูแสดงผลระดับความเป็นพิษที่ไม่แตกต่างกันกับการวัดด้วยสารเอ็มทีที

การวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที เป็นวิธีที่เป็นที่นิยมใช้ในการทดสอบหาระดับความเป็นพิษ[12] โดยวิธีนี้จะวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากเซลล์เหล่านั้นจะสามารถใช้เอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในการเปลี่ยนเตตระโซเลียมซอลท์ (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีทีให้เป็นผลึกฟอร์มาแซนสีม่วง[1] ซึ่งเมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสมก็จะสามารถนำไปวัดหาปริมาณเซลล์ได้ นอกจากนี้สารเอ็มทีทียังมีข้อดีในกรณีที่ปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการวัดมีอยู่ในปริมาณน้อย โดยจะสามารถแสดงผลปริมาณเซลล์ได้ชัดเจน[9] อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการของการวัดผลด้วยสารเอ็มทีที โดย Vistica และคณะ[6] พบว่า specific activity ของสารเอ็มทีทีได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นของเอ็มทีทีที่ใช้ และระยะเวลาในการทำให้เกิดผลึกฟอร์มาแซน ปัญหาอีกประการหนึ่งคือสารละลายที่ได้จากผลึกฟอร์มาแซนจะมีความคงตัวในระยะเวลาอันสั้น[9] ดังนั้นถ้าวัดผลในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ได้ผลที่คลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ระยะเวลาในการทำให้เกิดผลึกฟอร์มาแซนในแต่ละการทดลองอาจแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งถ้ามีปริมาณเซลล์มากเกินไปจะไม่สามารถวัดผลได้ชัดเจน และในประการสุดท้ายการวัดผลด้วยสารเอ็มทีทีอาจมีข้อเสียในด้านค่าใช้จ่ายของสารเอ็มทีทีที่ค่อนข้างสูง

ส่วนการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูนั้น เป็นวิธีที่แนะนำขึ้นโดย Finlay และคณะ[13] ซึ่งมีวัตถุประสงค์ครั้งแรกสำหรับการวัดอัตราการเจริญของเซลล์ ซึ่งวิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์ที่ค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกัน คือการวัดอัตราการสร้างสารพันธุกรรม

(DNA)[1] ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องใช้สารรังสีต่อเข้ากับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และวัดอัตราการใช้กรดนิวคลีอิกของเซลล์ ในการสร้างสารพันธุกรรม ดังนั้น การใช้วิธีการย้อมด้วยสีที่ย้อมติดเยื่อหุ้มเซลล์และวัดความเข้มของสีที่ย้อมติด ก็สามารถสะท้อนถึงปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้เช่นกัน[14] จากเหตุผลดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำวิธีนี้ มาทดสอบใช้ในการวัดระดับความเป็นพิษ เพื่อเปรียบเทียบผลกับการวัดด้วยสารเอ็มทีที

การย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู จะเป็นการย้อมโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ เนื่องจากคุณสมบัติของสีเมทิลีนบลูที่มีประจุบวก ทำให้สามารถย้อมติดสีด่าง (basic dye) และสามารถจับกับองค์ประกอบที่มีประจุลบ ซึ่งก็คือ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ได้[14] จากนั้น เมื่อละลายสีด้วยสารละลายกรด ก็จะสามารถนำสารละลายสีได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ได้ การย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูนี้มีข้อดีหลายประการเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อย และยังสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบอิทธิพลของสารหรือยาแต่ละชนิดที่มีต่อการเจริญของเซลล์ได้[14] อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการในแง่ของปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการวัด โดยพบว่า การย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูจะให้ผลแสดงปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ข้อเสียอีกประการหนึ่งของสีเมทิลีนบลูคือ การย้อมติดโมเลกุลที่มีประจุลบ ดังนั้นสีอาจย้อมติดเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสารที่ทดสอบ แต่ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยง หรืออาจย้อมติดโปรตีนบางชนิดที่เซลล์สร้างขึ้น ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้

จากผลการทดลองพบว่า ฟลูออไรด์จะแสดงระดับความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกที่ระดับความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ผลที่ได้นี้มีความแตกต่างจากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มอื่น ๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์กระดูกและเซลล์เนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งพบว่าระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์จะอยู่ที่ 20-50 พีพีเอ็ม[18-19] สำหรับระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอยู่ที่ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีต่อเซลล์เยื่อบุผิว CNCMI-221 ที่ระดับ 50 ไมโครลาร์[20] อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างจากรายงานของผู้วิจัยกลุ่มอื่น ที่ศึกษาความเป็นพิษของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใย Balb/c 3T3 โดยมีรายงานว่าระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสได้ร้อยละ 50 (50% inhibition) จะอยู่ที่ระดับ 580 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอยู่ที่ 300 ไมโครโมลาร์ เมื่อสัมผัสกับเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง[21-22] ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ น่าจะขึ้นกับเงื่อนไขและสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ เช่น ชนิดของเซลล์ที่ทดสอบ สารที่ใช้ในการทดสอบ และวิธีที่ใช้ในการวัดเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่[10] โดยในประการแรก ชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกันอาจมีความทนทานต่อสารที่ระดับที่แตกต่างกัน เช่นในกรณีผลของฟลูออไรด์ซึ่งเซลล์จากเหงือกอาจจะมีความทนทานต่อระดับของฟลูออไรด์ที่สูงกว่า ในประการที่สอง ระดับของความเป็นพิษจะขึ้นกับความหนาแน่นของเซลล์ที่ถ่ายลงบนจานเลี้ยงเซลล์ โดยการทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันจะใช้ความหนาแน่น 21,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ หว่านเซลล์ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตาราง-เซนติเมตร ความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีผลทำให้เซลล์มีความทนทานต่อสารทดสอบเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใน Balb/c 3T3 โดย Hanks และคณะ ที่ใช้ความหนาแน่น 40,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์มีระดับที่สูงกว่าในการทดลองนี้ นอกจากนี้ยังอาจขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบด้วย เช่นในกรณีของ Hanks และคณะจะดูระดับความเป็นพิษที่ 1 และ 6 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองนี้ ดูความเป็นพิษที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบครั้งนี้พบว่า วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู แสดงระดับของความเป็นพิษของสารที่ทดสอบ ไม่แตกต่างจากการวัดผลโดยการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีทีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

สรุป

วิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู เป็นวิธีทดสอบอีกวิธีหนึ่งซึ่งน่าจะสามารถนำมาใช้ทดสอบเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษระหว่างสารเคมีแต่ละชนิดในขั้นต้นได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายกว่า และมีค่าใช้จ่ายในการศึกษาน้อยกว่าการใช้สารเอ็มทีที

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งใน

การเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย และให้ความเอื้อเฟื้อในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์ดอกเตอร์ประสิทธิ์ ภวสันต์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิงทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีการเงิน 2541

เอกสารอ้างอิง

1. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3rd ed. New York:Wiley-Liss,Inc.,1994.
2. Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study of human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. J Endod 1990;16:129-34.
3. Spangberg L, Al-Nazhan S. The radiochromium released method for evaluation of cytotoxicity in vitro. Int Endod J 1988;21:72-8.
4. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 1995;74:1602-6.
5. Kosaka T, Fukaya K, Tsuboi S, Pu H, Ohno T, Tsuji T, et al. Comparison of various methods of assaying the cytotoxic effects of ethanol on human hepatoblastoma cells (HUH-6 Line). Acta Med Okayama 1996;50:151-6.
6. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer Res 1991;51:2515-20.
7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987; 47:936-42.
8. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986;89:271-7.
9. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
10. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. Eur J Oral Sci 1996;104:292-9.
11. Hardwick SJ, Heghi L, Clare K, Law NS, Carpenter KL, Mitchinson MJ, et al. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein, J Pathol 1996; 179:294-302.
12. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res 1988;48:589-601.
13. Finlay GJ, Baguley BC, Wilson WR. A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. Anal Biochem 1984;139:272-7.
14. Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GL. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: Application for assessment of growth factors. J Cell Sci 1989;92:513-8.
15. Jansen JA, van der Waerden JPCM, de Groot K. Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials. Biomaterials 1991;12:25-31.
16. Zuckerbraun HI, Babich H, May RJ, Sinensky MC. Triclosan: Cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. Eur J Oral Sci 1998;106:628-36.
17. Morgan CD, Mills KC, Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. An improved colorimetric assay for tumor necrosis factor using WEHI 164 cells cultured on novel microtiter plates. J Immunol Methods 1991;145:259-62.
18. Veron MH, Couble ML, Magloire H. Selective inhibition of collagen synthesis by fluoride in human pulp fibroblasts in vitro. Calcif Tissue Int 1993;53:38-44.
19. Golub L, Glimcher MJ, Goldhaber P, The effect of sodium fluoride on the rates of synthesis and degradation of bone collagen in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1968;129:973-7.
20. Jonas SK, Riley PA, Willson RL. Hydrogen peroxide cytotoxicity. Low-temperature enhancement by ascorbate or reduced lipoate. Biochem J 1989;264:651-5.
21. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. J Dent Res 1993;72:931-8.
22. Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC, Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. J Oral Rehabil 1994;21:453-62.

Comparison of two methods in measuring the cytotoxicity effects: Methylene blue assay and MTT assay

Kanokwan Charoonpatrapong, D.D.S.
Kassara pattamapun, D.D.S., M.Sc.

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective The purpose of this study was to compare methylene blue assay with MTT assay in measuring the cytotoxicity effect.

Materials and methods The cytotoxicity effect of sodium fluoride on human gingival fibroblasts and cytotoxicity effect of hydrogen peroxide on human pulpal fibroblasts were measured by methylene blue and MTT assays. The results were analysed by using One-way Analysis of Variance

Results Both methylene blue and MTT assays revealed the same significant cytotoxicity effect of sodium fluoride on human gingival fibroblasts at 100 ppm ($p<0.05$). Also, both methods showed the same cytotoxicity effect of hydrogen peroxide on human pulpal fibroblasts at $\geq$ 25 μM ($p<0.05$)

Conclusion Base on these conditions, both methylene blue and MTT assay demonstrated the same level of cytotoxicity. These results suggest that methylene blue assay might be able to use in cytotoxicity test.

(CU Dent J 2000; 23:83-90)

Key words : fibroblasts; methylene blue assay; MTT assay