การกระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์โดยเลคตินจากสะตอ

Activation of Lymphocyte Proliferation by *Parkia speciosa* Seed Lectin.

เพ็ญสุข จรัลชวนะเพท

Pensuk Jaranchavanapet

ว
เลขหมู่ QK898.L42 W72 2539 ฉ.2
Key 96954
19 ธ.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

ชื่อวิทยานิพนธ์	การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์โดยเลคตินจากสะตอ
ผู้เขียน	นางสาว เพ็ญสุข จรัลชวนะเพท
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

.....กรรมการ
(แพทย์หญิง ดร. สุวิณา รัตนชัยวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สำเนาถูกต้อง ธรรกกระวีสุนทร
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วันที่ 1 ก.ค. 2547

.....

(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์โดยเลคตินจากสะตอ
ผู้เขียน	นางสาว เพ็ญสุข จรัสชวนะเพท
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2538

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเลคตินจากสะตอในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากสะตอสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารได้ การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1) การสกัดเลคตินจากสะตอ แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีอัฟฟินิตี้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี่ และ 2) นำเลคตินบริสุทธิ์ที่สกัดได้ มาทดสอบการออกฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์เปรียบเทียบกับเลคตินมาตราฐาน (Phytohemagglutinin = PHA; Concanavalin A = Con A และ Pokeweed mitogen = PWM) โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO_2 5 % เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation index = PI) ด้วยกรรมวิธี ^3H - thymidine incorporation ผลการศึกษา พบว่า สารเลคตินบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนู (Wistar rat) เกาะกลุ่มได้ 320 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เลคตินบริสุทธิ์จากสะตอที่ความเข้มข้น 10 - 80 µg/ml สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร โดยมีค่า PI > 3 ได้ = 57.1 (8/14 ราย) และ 62.5 (5/8 ราย) เปอร์เซนต์ มีค่า PI สูงสุดตั้งแต่ 3.0 - 8.8 เฉลี่ย = 4.6 และ 3.3 - 152 เฉลี่ย = 33.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ดี เลคตินจากสะตอสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ต่ำกว่าเลคตินมาตราฐานที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบอย่างน้อย 10 เท่า และไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเพศหรืออายุกับระดับการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งในคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร

Thesis Title Activation of Lymphocyte Proliferation by *Parkia speciosa* Seed Lectin.

Author Miss Pensuk Jaranchavanapet

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1995

Abstract

The study comprised of i) the extraction and purification of lectin from *Parkia speciosa* seeds by the ammonium sulfate precipitation followed by the affinity column chromatography and ii) the testing for mitogenic activity of lectin from *Parkia speciosa* seeds on isolated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from normal blood donors and patients with esophageal carcinoma using a 3 days' PBMC culture at 37°C, 5 % CO_2 incubation with ^3H - thymidine incorporation assay. The stimulating activity was expressed as proliferation index (PI), the ratio of ^3H - thymidine incorporation activity of PBMC in the absence and presence of lectin. The mitogenic activity was determined in parallel with the known T - cell mitogens such as phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) and pokeweed mitogen (PWM). The purified lectin had 320 unit of agglutinating activity (Red blood cell of Wistar rat) per milligram of purified glycoprotein. PBMC from normal blood donors and patients with esophageal cancer (57.1 % and 62.5 %) gave positive response (PI > 3.0) to lectin (10 - 80 µg/ml) with maximal PI response between 3.0 - 8.0, mean = 4.6 and 3.3 - 152, mean 33.5, respectively. However, the stimulating activity of lectin from *Parkia speciosa* seeds is at least 10 times lower than the standard T - cell

mitogen used in this study. In addition, there was no correlation between sex or age and the level of proliferative response of PBMC from normal blood donors and patients with esophageal cancer.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำชี้แนะแนวทางต่าง ๆ ในการค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้อันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จตามจุดประสงค์ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำที่ปรึกษาที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยเหลือให้งานดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง ดร. สุวิณา รัตนชัยวงศ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง มาลิดา พรพัฒน์กุล หัวหน้าหน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อภิณพ จันทร์วิทัน ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่นำมาศึกษา และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องคาร์บอนไดออกไซด์ อินคิวเบเตอร์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำสิ่งที่ดีมีประโยชน์ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คลังเลือดและเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และผู้ช่วยวิจัยของภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำแบบคำร้องต่าง ๆ ตลอดจนช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ถูกต้องตามระเบียบ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

และขอขอบพระคุณกำลังใจจาก คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย อันเป็นที่รักทุก ๆ คน ที่ได้ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในทุก ๆ เรื่องด้วยดีตลอดเวลา จนผู้วิจัยสำเร็จการศึกษา พร้อมทั้งกำลังใจจากพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อนสนิททุกคน

เพ็ญสุข จรัลชวนะเพท

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(4)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	34
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	35
อุปกรณ์	37
วิธีการ	37
3. ผลการทดลอง	52
4. วิจารณ์	72
5. สรุป	75
เอกสารอ้างอิง	76
ประวัติผู้เขียน	97

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณค่าอาหารในสะตอ 100 กรัม....6
2. แหล่งที่พบเลคตินต่างๆ....9
3. ตัวอย่างเลคตินที่มีความจำเพาะเจาะจงกับหมู่เลือด....15
4. ตัวอย่างเลคตินและความสามารถของเลคตินในการกระตุ้น
   เซลล์ลิมโฟไซต์....17
5. โรคและความบกพร่องของการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์
   เมื่อถูกเลคตินกระตุ้น....26
6. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ 3 ราย
   ด้วยสารสกัดเลคตินจากสะตอ....54
7. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ 11 ราย
   ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM....55
8. สรุปค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ
   ด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ จำนวน 11 ราย เป็นชาย 10 ราย เป็นหญิง 4 ราย
   อายุเฉลี่ย 30 ปี....56
9. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร 8 ราย
   ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM....58
10. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร
    ด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ ผู้ป่วยรายที่ 1 - 5 เป็นผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา
    และผู้ป่วยรายที่ 6 - 8 เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง,
    เคมีบำบัด และผ่าตัด ตามลำดับ....59
11. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย
    ด้วย PHA ความเข้มข้น 0.156 - 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....62

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

12. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย
ด้วย Con A ความเข้มข้น 0.625 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....63
13. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย
ด้วย PWM ความเข้มข้น 0.078 - 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....64
14. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย
ด้วยเลคตินจากสะตอความเข้มข้น 1.25 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....65
15. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 28 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 64 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM.....66
16. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 20 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 64 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM.....67
17. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของหญิงปกติ อายุ 32 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารชายหญิง อายุ 73 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM.....68
18. การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 34 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 62 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM.....69
19. ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ
เปรียบเทียบกับของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร
ด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ.....71

รายการรูป

รูปที่ หน้า

1. เซลล์ลิมโฟไซต์ถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจนที่ผิวเซลล์.....20
2. วงจรของ B lymphocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน.....21
3. การสกัดเลคตินจากเมล็ดสะตอ.....40
4. การแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยใช้ Ficoll - Hypaque.....43
5. การแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยใช้ Polymorprep.....44
6. แผ่นแก้วมาตราฐานสำหรับนับเม็ดเลือด.....46
7. ตารางนับเซลล์ลิมโฟไซต์บนแผ่นแก้วสำหรับนับเซลล์ลิมโฟไซต์.....46
8. การเก็บเซลล์ลิมโฟไซต์บนกระดาษกรองใยแก้ว โดยใช้ Nunc cell harvester.....50
9. อุปกรณ์สำหรับเก็บเซลล์ลิมโฟไซต์บนกระดาษกรองใยแก้ว.....51

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ACD	=	acid - citrate - dextrose
AIDS	=	acquired immunodeficiency syndrome
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BCDF	=	B cell differentiation factor
B cell	=	B lymphocyte
BCGF	=	B cell growth factor
$^{\circ}$C	=	degree celcius
CD4	=	Leu3a which defines helper/inducer T cells
CD8	=	Leu2a which defines suppressor/cytotoxic T cells
CFL	=	chemotactic factor for lymphocyte
CFM	=	chemotatic factor for mononuclear phagocyte
μCi	=	microcuries
CMIR	=	cell mediated immune response
CO_2	=	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
Con A	=	concanavalin A
cyclic AMP	=	adenosine 3′, 5′ - cyclic monophosphate
cyclic GMP	=	guanosine 5′ - cyclic monophosphate
DPM	=	disintegration per minute

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

dimethyl - POPOP	=	1 - 4 bis (4′ - methyl - 5′- phenyloxazolyl) benzene
DNA	=	deoxyribonucleic acid
g	=	gravitational force
G_1	=	ระยะพักที่ 1
G_0 phase	=	ระยะพัก
µg	=	microgram
^3H - thymidine	=	tritiated thymidine
HCl	=	hydrochloric acid
HEPES	=	N - 2 - hydroxyethylpiperazine - N′ - 2 - ethanesulphonic acid
IFN	=	interferon
Ig	=	immunoglobulin
IL	=	interleukin
K^+	=	potassium ion
Lel	=	Lens culinaris lectins
LMF	=	lymphocyte mitogen factor
M	=	molar
MHC	=	major histocompatibility complex
MIF	=	macrophage migration inhibitory factor
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

MPL	=	Maclura pomifera lectin
Na^+	=	sodium ion
ND	=	not done
O.D.	=	optical density
P	=	P value
pH	=	- log hydrogen ion concentration
PHA	=	phytoheamagglutinin
PI	=	proliferation index
PIL	=	pulmonary infiltrating lymphocyte
PPO	=	2,5 - diphenyloxazole
PWM	=	pokeweed mitogen
RPMI 1640	=	cell culture media
SD	=	standard deviation
SJA	=	Sophora japonica agglutinin
T4	=	helper/inducer T lymphocyte
T8	=	suppressor/cytotoxic T lymphocyte
T cell	=	T lymphocyte
Tris	=	tris (hydroxymethyl) aminometane
WGA	=	wheat germ agglutinin
%	=	percent

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สะตอเป็นพืชตระกูลถั่ว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Parkia speciosa มีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น กะตอ, ปะตา (ปัตตานี), ปาไต (สตูล) อยู่ในตระกูล *Lequminacae* ตระกูลย่อย *Mimosaceae* ในสกุล *Parkia* ชอบขึ้นในป่าดงดิบ หรือภูเขาในภาคใต้ของประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2523)

ปัจจุบันการรับประทานสะตอได้แพร่หลายไปอย่างกว้างขวางจนครอบคลุมไปถึงภาคกลางของประเทศ สะตอนับได้ว่าเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากการวิเคราะห์ของกองโภชนาการ กรมอนามัย (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530) และจัดเป็นพืชผักที่ไม่มีพิษไม่มีภัย ใช้เป็นยาระบายอ่อน ๆ อาจป้องกันและรักษาโรคเบาหวานได้ (Suvachittanont และ Pothirakit, 1988) และเมื่อต้มหรือทำให้สุกจะมีไธโอโพรลีน (Thioproline) (Suvachittanont และคณะ, 1996) ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร เพราะสามารถจับกับไนไตรท์ไม่ให้กลายเป็นสารก่อมะเร็งได้ (Kurashima และคณะ, 1991) นอกจากนี้ไธโอโพรลีนยังสามารถชะลอความแก่ (Miquel และ Economos, 1979) และยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในหนูทดลองจากสารก่อมะเร็งและสามารถรักษาโรคมะเร็งบริเวณศีรษะและคอ (Brugarolas และ Gosavez, 1980)

ในสะตอ ยังมีเลคตินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มกัน หรือทำให้สารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ (Barondes, 1988) เลคตินส่วนมากพบในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว เช่น ในถั่วแปบ (Indian bean) (Guran และคณะ, 1983), ในถั่วลันเตา (Garden pea) (Entlicher และคณะ, 1970) และในสะตอ (Parkia speciosa seed) (Suvachittanont and Puetpaiboon, 1992) เป็นต้น เลคตินจากพืช

ชนิดต่าง ๆ จะมีสมบัติต่างกันออกไป เช่น เลคตินจากคอนคานาวาลิน เอ (Con A), จากเมล็ดจำปาดะ (Champada, Artocarpus integer), จากเมล็ดขนุน (Jacalin) และ Urtica dioica agglutinin I (UDA) มีสมบัติในการกระตุ้นที ลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) ของคนและหนูให้เกิดการแบ่งตัว (Barral และคณะ, 1992; Hashim และคณะ, 1992; Le Moal และคณะ, 1992; Favero และคณะ, 1993) ส่วนโพควีดไมโตเจน (PWM) สามารถกระตุ้น บี ลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) ของคนให้เกิดการแบ่งตัว (Lis และ Sharon, 1977) ในขณะที่เลคตินจากมะเขือเทศไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนได้ (Kilpatrick และคณะ, 1986) เป็นต้น

โดยทั่ว ๆ ไปเลคตินทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์เกาะกลุ่มกันได้ การเกาะกลุ่มเกิดขึ้นโดยเลคตินจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์และทำหน้าที่เสมือนสะพานเชื่อมเซลล์มากกว่า 1 เซลล์ ให้เกาะกลุ่มกัน โดยเลคตินแต่ละชนิดจะจับกับเซลล์ชนิดต่าง ๆได้แตกต่างกัน เช่น เลคตินจากสะตอทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มกันได้ แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่ม (อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์, 2532) ส่วน PWM ทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม (Yasuhiro และ Toshio, 1992) นอกจากนี้เลคตินบางชนิดยังสามารถนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มเลือดของคนได้ด้วย เช่น เลคตินจาก Phaseolus lunatus (Lima bean) จำเพาะกับเลือดหมู่ A (Brown และ Hunt, 1978) เป็นต้น

นอกจากเลคตินจะทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกันแล้ว เลคตินหลายชนิดยังสามารถกระตุ้นลิมโฟไซต์ให้แบ่งตัวและเพิ่มขนาดได้ เช่น เลคตินจากสะตอสามารถกระตุ้นไธโมไซต์ (Thymocyte) ของหนูทำให้มีการสังเคราะห์ดี เอ็น เอ มากขึ้น (อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์, 2532) ไธโมไซต์เป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้มาจากต่อมไธมัส มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์อาจมีผลส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันได้ จึงน่าสนใจว่า เลคตินจากสะตอจะสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ในคนได้หรือไม่ โดยศึกษาจากการนำ ^{3}H - ไธมิดีน เข้าไปใช้ในการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ ของเซลล์ลิมโฟไซต์ ผลเบื้องต้น พบว่า เลคตินจาก

สะตอมีแนวโน้มที่จะกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนทั้งที่แยกได้จากเลือดของคนปกติ และเลือดผู้ป่วยโรคมะเร็ง (อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์, 2532)

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาสมบัติของเลคตินจากสะตอ ในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดคนปกติและเลือดผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร และถ้าเลคตินจากสะตอกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน ก็อาจจะเป็นประโยชน์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ได้

การตรวจเอกสาร

1.1 สะตอ

1.1.1 ลักษณะของสะตอ สะตอเป็นพืชตระกูลถั่ว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Parkia speciosa มีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น กะตอ, ปะตา (ปัตตานี), ปาไต (สตูล) เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Leguminoceae* ตระกูลย่อย *Mimosaceae* สกุล *Parkia* (เต็ม สมิตินันท์, 2523)

สะตอเป็นพันธุ์ไม้ที่ชอบขึ้นในป่าดงดิบ หรือภูเขาในภาคใต้ของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ ลำต้นค่อนข้างตรง มีความสูงประมาณ 15 - 35 เมตร มีเปลือกหนาค่อนข้างเรียบ สีน้ำตาล ปนเทา เนื้อไม้มีสี เปลือกใช่ แกนสีแดง กิ่งของสะตอจะแผ่ออกทุกทิศทาง กระจายเป็นวงกว้าง รัศมีของพุ่มใบประมาณ 10 - 15 เมตร เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบเป็นใบประกอบ ก้านหนึ่ง ๆ มีใบย่อยหลายใบ

ลักษณะดอก เป็นดอกช่อ ออกตรงปลายกิ่งบริเวณนอกของทรงพุ่ม ช่อดอกเป็นปุ่มสีเหลืองอ่อน มีดอกย่อย ๆ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ก้านดอกสีเขียวสด ยาว 1/2 - 1 1/2 ฟุต

ฝักสะตอหนึ่งฝักคือผลหนึ่งผลที่มีหลายเมล็ด เจริญเติบโตจากกลางปุ่มดอก ฝักยาวสีเขียวเกลี้ยง ดอกหนึ่งจะมี 3 - 24 ฝัก แต่ละฝักยาว 1 - 2 ฟุต กว้าง 1 - 1 1/2 นิ้ว ตรงริมฝักหนาประมาณ 1/6 นิ้ว เมล็ดจะเรียงอยู่ในฝัก ฝักหนึ่งจะมี 6 - 23 เมล็ด ฝักที่แก่เปลือกฝักจะเปราะง่าย เมื่อสุกเปลือกนอกจะเป็นสีน้ำตาลไหม้เกือบดำ เนื้อเยื่อภายในจะเป็นสีส้ม มีเมือก และรสหวานเล็กน้อย

1.1.2 พันธุ์ของสะตอ พันธุ์ของสะตอ แบ่งได้ 3 ชนิด คือ

1.1.2.1 สะตอข้าว หรือสะตอขาว ลักษณะเมล็ดเล็กและถี่ กลิ่นของเมล็ดฉุน และอมหวาน ออกดอกให้ผลเร็ว เช่นให้ผลในระยะเวลา 4 - 5 ปี หลังปลูก เป็นสะตอที่นิยมนำมารับประทาน

1.1.2.2 สะตอดาน เป็นสะตอที่มีฝักใหญ่ เมล็ดโตกว่าชนิดแรก ทรงต้นใหญ่สูง กิ่งก้านสาขามาก ให้ผลในระยะเวลา 6 - 7 ปี

1.1.2.3 **สะตอแต หรือสะตอป่า** ลักษณะฝักค่อนข้างแข็ง ชอบขึ้นในป่าลึก ๆ รสไม่ค่อยอร่อย

สะตอจัดเป็นพืชผักที่มีคุณค่าทางอาหาร ไม่มีพิษไม่มีภัย เป็นพืชที่ให้โปรตีนสูง ไขมันต่ำ จากการวิเคราะห์ของกองโภชนาการ กรมอนามัย (2524) พบว่า ในเมล็ดสะตอจะมีสารอาหารประเภทโปรตีนอยู่ 8 % โดยน้ำหนัก ดังตารางที่ 1

1.1.3 **ประโยชน์ของสะตอ**

1.1.3.1 **เป็นรายได้ของเกษตรกร** เพราะสะตอจัดเป็น พืชเศรษฐกิจที่สำคัญของเกษตรกรทางภาคใต้ของประเทศไทยชนิดหนึ่ง

1.1.3.2 **ในด้านการอนุรักษ์ดิน** สะตอเป็นพันธุ์ไม้ป่าขนาดใหญ่ มีรากแก้วหยั่งลึกสามารถยึดเหนี่ยวไม่ให้ดินพัง และทำให้ดินมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ (นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2528)

1.1.3.3 **มีส่วนเป็นยาสมุนไพร** คือช่วยระบาย และสามารถป้องกันการเกิดโรคเบาหวานได้ และเมื่อต้มหรือทำให้สุกจะมีไธโอโพรลีน (Suvachittanont และคณะ, 1996) ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร และสามารถจับกับไนไตรท์ ไม่ให้กลายเป็นสารก่อมะเร็ง (Kurashima และคณะ, 1991) ไธโอโพลีนสามารถชลอความแก่ (Miquel และ Economos, 1979) และยังสามารถรักษาโรคมะเร็งบริเวณศีรษะและคอ (Brugarolas และ Gosavez, 1980)

1.1.3.4 **นำมาประกอบอาหาร** ได้หลายอย่าง เช่น ผัด ต้ม แกง หรืออาจรับประทานดิบ ๆ

ตารางที่ 1 คุณค่าอาหารในสะตอ 100 กรัม (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2524)

สารอาหาร	ปริมาณ	
โปรตีน	8.0	กรัม
ไขมัน	8.1	กรัม
คาร์โบไฮเดรต	11.4	กรัม
แคลเซียม	76.0	มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	83.0	มิลลิกรัม
เหล็ก	0.7	มิลลิกรัม
วิตามิน เอ	734.0	หน่วยสากล
วิตามิน บี 1	0.11	มิลลิกรัม
วิตามิน บี 2	0.01	มิลลิกรัม
วิตามิน ซี	6.0	มิลลิกรัม
ไนอาซีน	1.0	มิลลิกรัม

นอกจากนี้ อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) พบว่า ในสะตอมีเลคติน ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 70 % ของความอิ่มตัว และผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100 แล้วชะเลคตินออกด้วย 0.1 M กลูโคส และได้ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเลคตินดังกล่าว พบว่า เลคตินจากเมล็ดสะตอมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,700 - 47,300 ดัลตัน และเป็นไกลโคโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ 1.5 % สำหรับโปรตีนในเลคตินจากสะตอ ประกอบด้วย ไกลซีน, กรดแอสปาร์ติค, ไอโซลูซีน และซีรีน อยู่มาก แต่มีซีสเตอีน และเมธีโอนีนอยู่น้อยมาก ส่วนโควาเลนท์แคตไอออนบางตัวที่พบในเลคติน ได้แก่ Mg^{++}, Fe^{++}, Cu^{++} และ Zn^{++} แต่ไม่พบ Ca^{++} และ Mn^{++} และได้ทดสอบหาน้ำตาลที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเลคตินจากสะตอ โดยดูความสามารถของน้ำตาลในการจับกับเลคตินจากสะตอ แล้วมีผลยับยั้งการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง พบว่า เมทธิล - แอลฟา - ดี - แมนโนไพราโนไซด์ เป็นน้ำตาลที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเลคตินจากสะตอมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ดี - แมนโนส, ดี - กลูโคส, มอลโตส, เอ็น - อะซีติล กลูโคซามีน, เมทธิล - แอลฟา - ดี - กลูโคไพราโนไซด์ และ ดี - ฟรุคโตส นอกจากนี้ อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) ยังศึกษา บทบาทของเลคตินจากสะตอในทางชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาบทบาททางชีวภาพของเลคตินนี้ได้เป็นสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้เกิดความสนใจและการทำวิจัยในครั้งนี้

1.1.4 บทบาททางชีวภาพของเลคตินจากสะตอ

1.1.4.1 ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม โดย อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) พบว่า เลคตินที่ได้จากการนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 70 % ของความอิ่มตัว ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100 และชะด้วย 0.1 M กลูโคส จะมีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด โดยเพิ่มขึ้น 71 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดขั้นต้น อย่างไรก็ตาม เลคตินจากสะตอไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่มได้ แม้ว่าจะทำการกระตุ้นเม็ดเลือดแดงของคนโดยการย่อยด้วยทริปซิน (Trypsin) แล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิและเวลาในการอุ่นเลคตินดังกล่าว มีผลต่อความ

สามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม กล่าวคือ ความสามารถของเลคตินจากสะตอในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มลดเหลือเพียง 12.5 % ของความสามารถเดิม เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำมาทดสอบ และถ้าอุ่นเลคตินที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป เลคตินจากสะตอจะไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่มได้เลย ส่วนการอุ่นเลคตินจากสะตอทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานตั้งแต่ 30 นาที ถึง 5 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อสมบัติดังกล่าวของเลคตินชนิดนี้

1.1.4.2 **ความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์** เลคตินจากสะตอที่ความเข้มข้น 5 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นไธโมไซต์ของหนู ทำให้มีการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ ได้มากกว่าการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ ในไธโมไซต์ปกติ (อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์, 2532)

จากบทบาททางชีวภาพของเลคตินจากสะตอที่กล่าวข้างต้น จึงน่าที่จะศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ และของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารให้ได้ผลชัดเจนยิ่งขึ้น

1.2 เลคติน

1.2.1 **แหล่งที่พบ** เลคตินพบครั้งแรกในสารสกัดจากพืช โดย Nowell (1960) ในปัจจุบันนอกจากเลคตินจากพืชแล้ว ยังพบเลคตินในสัตว์ชั้นสูง, ชั้นต่ำ ตลอดจนแบคทีเรีย, ราเมือก (Slime mold) และฟองน้ำ (Sponge) (Liener, 1976) ดังตารางที่ 2 ซึ่งรวบรวมเลคตินจากแหล่งต่าง ๆ ไว้พอสังเขป

ตารางที่ 2 แหล่งที่พบเลคตินต่าง ๆ

พืชตระกูลถั่ว (Legumes)	แหล่งอ้างอิง
Phaseolus lunatus (ถั่วราชมาด; lima bean)	Bessler และคณะ (1976)
Lotus tetragonolobus (ถั่วพลู; winged bean)	Lis และ Sharon (1977)
Dolichos biflorus (horse gram)	Lis และ Sharon (1977)
Pisum sativum (ถั่วลันเตา; garden pea)	Lis และ Sharon (1977)
Vicia cracca	Lis และ Sharon (1977)
Vicia faba (ถั่วยาง; broad bean)	Lis และ Sharon (1977)
Vicia gramineae	Lis และ Sharon (1977)
Phaseolus vulgaris (ถั่วแดงหลวง; red kedney bean)	Barrett (1978)
Canavalia ensiformis (ถั่วพร้า; jack bean)	Barrett (1978)
Lathyrus sativus	Kolberg และ Sletten (1982)
Cicer arietinum (chick pea)	Kolberg และคณะ (1983)
Dolichos lablab (ถั่วแปบ; Indian bean)	Guran และคณะ (1983)
Vigna unguiculata (ถั่วดำ; cow pea)	Roberson และ Strength (1983)
Arachis hypogaea (ถั่วลิสง; peanut)	Rudiger (1984)
Lens culinaris (lentil)	Freier และ Rudiger (1990)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืชอื่นๆ	แหล่งอ้างอิง
Phytolacca americana (pokeweed)	Barrett (1978)
Euonymus europaeus	,Petryniak และคณะ (1981)
Croton tiglium (croton oil plant)	Banerjee และ Sen (1981)
Butea monosperma	Ghosh และคณะ (1981)
Viscum album (ไม้จำพวกกาฝาก; mistletoe)	Franz และคณะ (1981)
Secale cereale (rye germ)	Kub และคณะ (1982)
Euphorbia heterophylla	Nsimba-Lubaki และคณะ (1983)
Pesea americana (ลูกเนย; avocado)	Yaakobovich และ Numan(1983)
Lycopersicon esculentum (มะเขือเทศ; tomato)	Kilpatrick และคณะ (1983)
Triticum vulgare (ข้าวสาลี; wheat)	Rudiger (1984)
Artocarpus integrifolia (ขนุน; jackfruit)	Rogue และคณะ (1985)
Urtica dioica (Stinging Nettle Rhizome)	Galelli และ Truffa (1993)

สัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrates)	แหล่งอ้างอิง
ตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Gal - binding lectin)	Barondes (1984)
อัณฑะ, ม้าม, ตับ และ ไต ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Man - 6 - P - binding lectin)	Barondes (1984)
เนื้อเยื่อหลายชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก (lactose - binding lectin)	Barondes (1984)
ตับของสัตว์ปีก (GalNAc - binding lectin)	Barondes (1984)
ปอดของหนู,กล้ามเนื้อและตับของไก่ (Heparin - binding lectin)	Barondes (1984)
ไขกระดูกกระต่าย (Erythroid developmental agglutinin)	Barondes (1984)
Bothrops atrox (พิษงู; venom)	Barondes (1984)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates)	แหล่งอ้างอิง
Anthocidaris crassispina (หอยเม่นทะเล;sea urchin)	Sasaki และ Aketa (1981)
Limax flavus	Miller และคณะ (1982)
Pieris brassicae (แมลงป่อง; scorpion)	Mauchamp (1982)
Saxidomus purpuratus (สัตว์น้ำจำพวกมีเปลือกคล้าย หอย, กุ้ง และปู; shellfish)	Tatsumi และ Itoh (1982)
Biomphalaria glabrata (ทาก; snail)	Bretting และคณะ (1983)
Birgus latro (coconut crab)	Vasta และ Cohen (1984)
Allomyrina dichotoma (แมลงปีกแข็ง; beetle)	Umetsu และคณะ (1984)
Macrobrachium resenbergii (กุ้งนาง; prawn)	Vasta และคณะ (1984)
Crassostea virginica (หอยนางรม; oyster)	Vasta และคณะ (1984)

แบคทีเรีย	แหล่งอ้างอิง
Pseudomonas aeroginisa	Lis และ Sharon (1977)
Escherichia coli	Firon และคณะ (1983)
Klebsiella pneumoniae	Firon และคณะ (1983)
Salmonella typhi	Firon และคณะ (1983)
Streptococcus sanguis	Nugata (1983)

ราเมือก	แหล่งอ้างอิง
Dictyosteleum discoidium	Lis และ Sharon (1977)
Dictyosteleum purpureum	Lis และ Sharon (1977)

1.2.2 การกระจายของเลคตินในพืช เลคตินในพืชต่างชนิดกันจะอยู่ในเนื้อเยื่อต่างกัน และยังมีปริมาณมากน้อยต่างกันอีกด้วย เช่น ในพืชตระกูลถั่วจะพบเลคตินได้ทั้งในเมล็ด, ใบ, ราก และลำต้น ตัวอย่างเช่น Liener และคณะ (1987) พบว่า มีเลคตินอยู่ประมาณ 2 - 10 % ของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ด โดยอยู่ในไซโทพลาซึม (Cytoplasm) ของใบเลี้ยง (Cotyledon) Rudiger (1984) และ Etzler (1985) พบว่า ปริมาณเลคติน จะสูงสุดในเมล็ดที่เจริญเต็มที่ เมื่อเมล็ดงอกแล้วปริมาณเลคตินในใบเลี้ยงจะลดลง พืชในตระกูลโซลานาซี (*Solanaceae*) เช่น มันสำปะหลัง จะมีเลคตินในหัว (tubers) ส่วน Phytolacca americana จะพบเลคตินในส่วนใบและลำต้น (Pusztai และคณะ, 1983) เป็นต้น

นอกจากนี้ Hapner และ Robbins (1979) กับ Gade และคณะ (1981) พบว่า เลคตินจากเนื้อเยื่อต่างกัน เช่น เลคตินในเมล็ด, ในลำต้น, ในใบ หรือในราก อาจมีความแตกต่างกันได้ โดยจะมีความจำเพาะเจาะจงที่จะจับกับน้ำตาลต่างชนิดกัน

จากการที่พบว่าเลคตินกระจายอยู่ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (ดังตารางที่ 2) จึงได้มีการศึกษาบทบาทของเลคตินทั้งในระบบสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) แม้ว่าบทบาทและหน้าที่ของเลคตินในสิ่งมีชีวิตยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ก็ได้มีการเสนอข้อสมมุติฐานหลายประการเกี่ยวกับบทบาทของเลคตินที่ทราบกันดี ดังต่อไปนี้

1.3 บทบาทของเลคติน

1.3.1 บทบาทในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.3.1.1 บทบาทในพืช ตัวอย่างเช่น

1.3.1.1.1 บทบาทในการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ของพืชตระกูลถั่วและแบคทีเรีย (Legume - Rhizobium symbiosis) เชื่อว่าในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ของรากพืชตระกูลถั่ว เลคตินที่อยู่รอบ ๆ ด้านนอกผิวราก สามารถจับแบคทีเรียในดินได้ โดยการที่น้ำตาลบนเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเข้าจับกับแหล่งจับของน้ำตาลชนิดนั้น ๆ (sugar - binding site) ที่อยู่บน

โมเลกุลของเลคติน เลคตินจึงเปรียบเสมือนสะพานเชื่อมให้ผิวรากกับแบคทีเรียเกาะกันได้ (Rudiger, 1984) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงว่า เลคตินในพืชตระกูลถั่วต้องมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพึ่งพาอาศัยกันและกันของพืชตระกูลถั่วและแบคทีเรียในกระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ ปริมาณเลคตินในพืชตระกูลถั่วจะลดลงเมื่อมีแอมโมเนียมไอออน และไนเตรทซึ่งยับยั้งการเกิดปมรากของพืชตระกูลถั่วอยู่ด้วย (Dazzo และ Brill, 1978)

1.3.1.1.2 บทบาทในการป้องกันโรคพืช ที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น เชื้อรา, แบคทีเรีย และไวรัส โดย Jones (1964) พบว่า เลคตินจากเมล็ดถั่วที่ชื่อ Tufted vetch ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในดินไม่ให้เมล็ดพืชถูกทำลายในระหว่างการงอก

1.3.1.1.3 บทบาทเกี่ยวกับการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช โดยเลคตินมีบทบาทเช่นเดียวกับโปรตีนสะสม (Storage protein) (Liener และคณะ, 1987)

1.3.1.1.4 บทบาทในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในเอมบริโอ (Embryo) ของพืช โดย Howard และคณะ (1977) พบว่า เลคตินจากเมล็ดถั่วเหลืองสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของแคลลัส (Callus) ของถั่วเหลือง ทำให้แคลลัสมีน้ำหนัก, จำนวนเซลล์ และปริมาณ ดี เอ็น เอ เพิ่มขึ้นได้

1.3.1.2 บทบาทของเลคตินในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง

1.3.1.2.1 เลคตินที่ฝังอยู่ในเซลล์ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารประกอบไกลโคโปรตีนระหว่างเซลล์ และอาจช่วยในการย่อยสลายสารประกอบไกลโคโปรตีนได้ด้วย (Barondes, 1984)

1.3.1.2.2 เลคตินในซีรัม มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ (Complement system) ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียได้ (Ikeda และคณะ, 1987)

1.3.2 บทบาทของเลคตินในหลอดทดลอง (*in vitro*) ตัวอย่างเช่น

1.3.2.1 ความสามารถที่จะจับกับน้ำตาลและเซลล์ต่าง ๆ เลคตินสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตทั้งน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง การจับกันระหว่างเลคตินกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตนั้น จับโดยพันธะนอนโควาเลนท์ (Non covalent bond) ไม่ต้องอาศัยหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (Free hydroxyl group) บนโมเลกุลของน้ำตาล จากสมบัตินี้ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการจับกันของเซลล์กับเลคตินในแง่มุมต่าง ๆ เช่น จำนวนและการกระจายของแหล่งจับเลคตินบนผิวเซลล์, ความแข็งแรงของการจับกันของเลคตินกับเซลล์และปัจจัยที่มีผลต่อการจับกันของเลคตินและเซลล์ เป็นต้น (Lis และ Sharon, 1977)

1.3.2.2 การทำให้เซลล์เกาะกลุ่มกัน (Cell agglutination) เช่น เลคตินบางชนิดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน และมีความจำเพาะเจาะจงกับหมู่เลือด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเลคตินที่มีความจำเพาะเจาะจงกับหมู่เลือด (Brown และ Hunt, 1978)

เลคติน	หมู่เลือด
Crotolaria aegyptica	
Dolichos biflorus (horse gram)	
Phaseolus lunatus (lima bean)	A
Vicia cracca	
Helix pomatia (garden snail)	
Sophora japonica	
Calpurina aurea	AB
Coronilla varia	
Bandeiraea simplicfolia	
Marasmius oreades	B
Polyporus fomentarius	
Anguilla anguilla (ปลาไหล)	
Cystisus sessilifolius	
Lotus tetragonolobus	O
Ulex ruropeus	

1.3.2.3 ความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte activation) เลคตินหลายชนิดสามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ให้เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มขนาดได้ ซึ่งมักถือว่ามีสมบัติการเป็นไมโตเจน (Mitogen)

การเกิดการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์โดยเลคติน จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าสามารถเกิดการกระตุ้นได้ทั้งกับที ลิมโฟไซต์และ บี ลิมโฟไซต์ เป็นเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งมีขั้นตอนที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ลิมโฟไซต์ถูกกระตุ้นด้วยเลคติน มีรายละเอียดดังหัวข้อ 1.4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเลคติน และความสามารถของเลคตินในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์

เลคติน	ชนิดเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น		อ้างอิง
	ที (T)	บี (B)	
Concanavalin A	+		Barrett (1978)
Phytoheamagglutinin	+		Barrett (1978)
Pokeweed mitogen	+	+	Barrett (1978)
Lipopolysaccharide		+	Yamaguchi และคณะ (1981)
Peanut agglutinin	+		Lis และ Sharon (1977)
Lima bean		+	Bessler และคณะ (1976)
Jacalin	+		Faveor และคณะ (1993)
Eikenella corrodens 1073		+	Nakae และคณะ (1994)
Leucoagglutinin	+		Prujansky และคณะ (1978)
เมล็ดจำปาดะ		+	Hashim และคณะ (1992)
Lentil lectin		+	Freier และ Rudiger (1990)
Piziza vesiculosa		+	Ohno และคณะ (1985)
Wheat germ agglutinin	+	+	Mier (1982)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

เลคติน	ชนิดเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น		อ้างอิง
	ที (T)	บี (B)	
Homarus americanus	+		Chapel และ Haeney (1984)
Dictyostelium purpureus	+		Lis และ Sharon (1986)
Listeria Cell Wall Fraction		+	Cohen และคณะ (1975)
Ling Zhi - 8	+		Hakk และคณะ (1993)
Bolestine	+		Licastro และคณะ (1993)
Udotea petiolata	+		Uhlenbruck และคณะ (1992)
Urtica dioica agglutinin	+		Le Moal และคณะ (1992)
Latex Euphorbia marginata	+		Stirpe และคณะ (1993)
Vicia villosa	+		Abrignani และ Cammisuli (1988)
Robinia pseudoacacia	+	+	Lis และ Sharon (1977)
Ulex europeus	+		Lis และ Sharon (1977)

1.4 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคติน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ตั้งแต่ การกระตุ้น (Activation), การแบ่งตัว (Proliferation) จนกระทั่งเกิดการหลั่งสาร ลิมโฟไคน์ (Lymphokine) หรือหลั่งแอนติบอดี (Antibody)

1.4.1 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์โดยไมโตเจน เกิดโดยไมโตเจนจะจับกับ ตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายในเซลล์ ดังรูป ที่ 1 เช่น

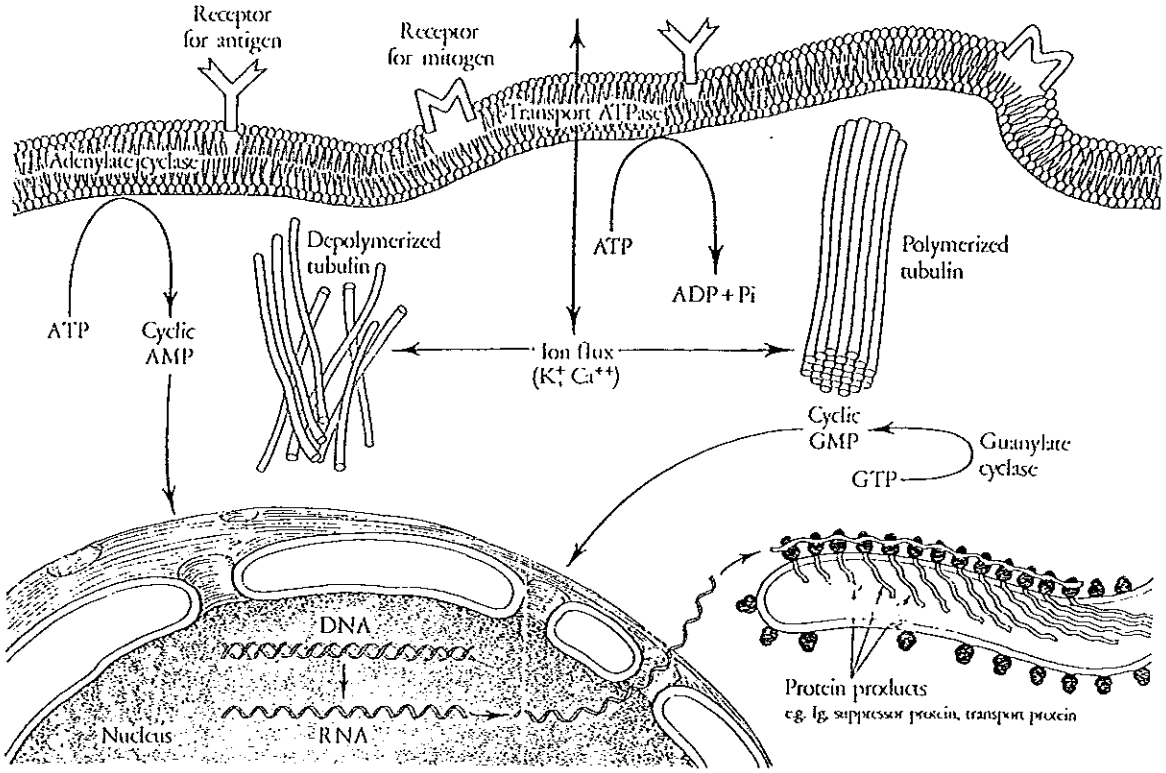
1.4.1.1 มีการผ่านเข้าออกของ Ca^{++} และ K^{+} (Wolff และ Akerman, 1982; Kaibuchi และคณะ, 1985; Trunch และคณะ, 1985; Grier และ Mastrol, 1985; Buckley และคณะ, 1986; Wedner และ Bass, 1986; Wolff, 1987; Modiano และคณะ, 1988) และนำสารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น เช่น นิวคลีโอไซด์, กรดอะมิโน (Amino acid) หรือน้ำตาลต่าง ๆ (Bellanti, 1979)

1.4.1.2 ATP เปลี่ยนเป็น cyclic AMP , มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบกลับไป กลับมาของ Tubulin จากรูป Polymerized tubulin เป็น Depolymerized tubulin (Barrett, 1978)

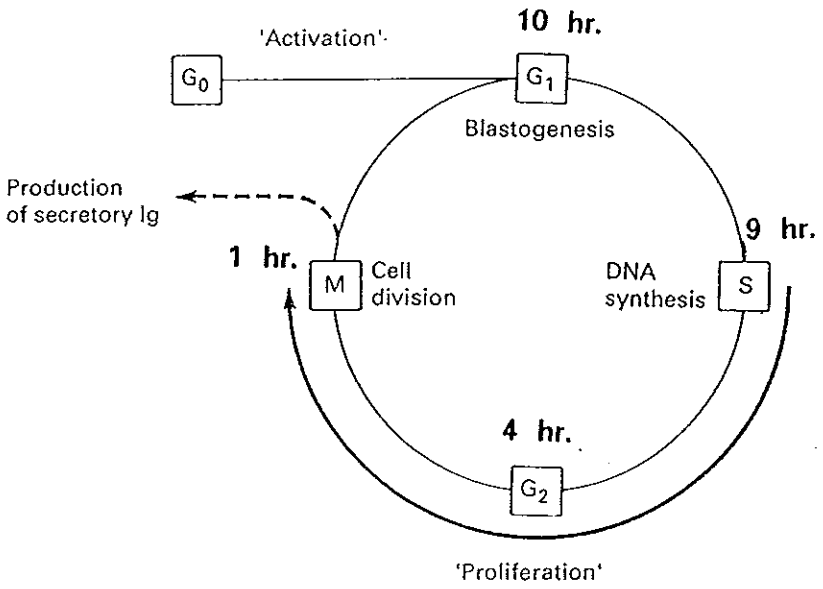
1.4.1.3 GTP เป็น cyclic GMP จากนั้น cyclic AMP และ cyclic GMP จะ ทำหน้าที่เป็นเสมือน Second messenger (Barrett, 1978) ซึ่งอาจมีบทบาทออกฤทธิ์ ผ่านการทำงานของเอนไซม์โปรตีนไคเนส (Protein kinase) ทำให้มีการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ และ อาร์ เอ็น เอ เพิ่มขึ้น

1.4.2 การแบ่งตัว (Proliferation) หลังจากไมโตเจนกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังรูปที่ 1 แล้ว เซลล์ลิมโฟไซต์ก็จะแบ่งตัวตรงช่วงการ สังเคราะห์ ดี เอ็น เอ (DNA synthesis) หรือ การจำลอง (Replication) (S phase) และ การแบ่งตัวแบบไมโตซิส (M phase) หรือ การเจริญเติบโต (G phase) (Barrett, 1988) ดังรูปที่ 2

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



รูปที่ 1 เซลล์ลิมโฟไซต์ถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจนที่ผิวเซลล์ (Bellanti, 1979)



รูปที่ 2 วงจรของ บี ลิมโฟไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน (Barrett, 1988)

1.4.3 การหลั่งสารลิมโฟไคน์ เมื่อมีการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ต่อการเหนี่ยวนำโดยไมโตเจนแล้ว เซลล์ลิมโฟไซต์จะมีการเติบโต, แบ่งตัว และมีการหลั่งสารลิมโฟไคน์ (Lymphokine) (Amento และคณะ, 1982; Mier และ Gallo, 1982; Ulmer และคณะ, 1982; Bubenik และคณะ, 1988; Lai และคณะ, 1991) ลิมโฟไคน์เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (Soluble protein) ซึ่งลิมโฟไซต์จะหลั่งออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน (Antigen) ที่จำเพาะหรือไมโตเจน (ไม่จำเพาะ) เป็นระยะเวลาสั้น ๆ และด้วยปริมาณไมโตเจนเพียงพิโคโมล (picomole) เท่านั้น

ตัวอย่างลิมโฟไคน์ที่หลั่งจาก ที ลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน ได้แก่ Chemotactic factor สำหรับ โมโนไซต์ (Monocyte), Macrophage migration inhibitory factor, Blastogenic factor, Lymphotoxin และ อินเตอร์เฟอรอน (Interferon) เป็นต้น (Austyn และ Wood, 1993) ลิมโฟไคน์เหล่านี้อาจออกฤทธิ์ได้ต่าง ๆ กัน เช่น

Chemotactic factor มีฤทธิ์ในการดึงดูดเซลล์บางชนิดให้เข้ามาหา เช่น Chemotactic factor สำหรับโมโนนิวเคลียร์ฟาโกไซต์ (Chemotactic factor for mononuclear phagocyte) (CFM) ดึงดูดโมโนไซต์หรือมาโครฟาจ (Macrophage) ให้เข้ามาสู่บริเวณที่มีการหลั่งสารนี้ โดยจะดึงดูดโมโนไซต์ในกระแสเลือดให้เคลื่อนมายังบริเวณที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แล้วแทรกผ่านเซลล์เอนโดธีเลีย (Endothelial cells) ที่บุผนังเส้นเลือดออกมาตรงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยกำจัดแอนติเจน (Feldmann, 1992)

Migration inhibitory factor มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ตามปกติของเซลล์ เช่น Macrophage migration inhibitory factor (MIF) ยับยั้งไม่ให้มาโครฟาจเดินทางออกจากบริเวณที่มีการหลั่งสารนี้ เมื่อโมโนไซต์ถูกดึงออกมาจากกระแสเลือด เข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ โดย Chemotactic factor โมโนไซต์จะเปลี่ยนเป็นมาโครฟาจ และ MIF จะยับยั้งไม่ให้มาโครฟาจเดินทางออกไปจากบริเวณที่เกิดเหตุนั้น (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2530)

Lymphocyte mitogen factor (LMF) หรือ Blastogenic factor ทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ทั่ว ๆ ไปแบ่งตัว กล่าวคือ ในเนื้อเยื่อของร่างกายบริเวณที่มีการตอบ

สนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์นั้น CFL (Chemotactic factor for lymphocyte) ทำหน้าที่ดึงเซลล์ลิมโฟไซต์ทั่ว ๆ ไป ทั้งที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อแอนติเจนให้เข้ามาบริเวณดังกล่าว แล้ว LMF จะทำหน้าที่ต่อโดยการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์เหล่านั้นให้แบ่งตัวเพิ่มปริมาณขึ้น (Pike, 1992)

Interferon (IFN) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านไวรัสโดยตรง โดยไปทำปฏิกิริยากับตัวรับบนผิวเซลล์ของร่างกายที่ติดเชื้อไวรัส ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้และไม่สามารถสร้างโปรตีนของไวรัสด้วย ไวรัสจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ อินเตอร์เฟอรอนยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยไปทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์มะเร็งเสียไป เซลล์มะเร็งจึงไม่เจริญเติบโต และแบ่งตัว นอกจากนั้นอินเตอร์เฟอรอน ยังทำให้แอนติเจนบนเซลล์มะเร็ง เช่น แอนติเจนจำเพาะของเซลล์มะเร็ง และโมเลกุล Class I MHC เป็นต้น ปรากฏชัดขึ้น เซลล์มะเร็งจึงถูกทำลายได้ดี (Londei, 1992)

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของเลคติน

เลคตินอาจไม่เป็นไมโตเจนได้ ถ้าทำการทดลองในสภาวะที่ไม่เหมะสมหรือถูกกระทบโดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น

1.5.1 การเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่ง Novogrodsky และ Katchalski (1973) พบว่า การเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของหนู (Rat) และคน โดยใช้ ไกลโคซิเดส (Glycosidase) มีผลทำให้ Peanut agglutinin กระตุ้นเซลล์ดังกล่าวได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการกระทำดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย Con A

1.5.2 การขาดสารบางอย่างที่จำเป็นต่อการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคติน เช่น Serine เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติด้วยเลคติน เพราะว่าเซลล์จะไม่สามารถเกิด Phosphorylation ถ้าขาด Serine (Rowe และคณะ, 1985) Kaibuchi และคณะ (1985) ยังพบว่า โปรตีนไคเนส และ Ca^{++} จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเลคติน นอกจากนี้

Kenes และคณะ (1982) พบว่า การกระตุ้นเอนไซม์ ATPase มีบทบาทต่อการแบ่งตัวของ เซลล์ลิมโฟไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ไฟโตฮีมแอกกลูตินิน (PHA)

1.5.3 สารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้น เช่น เปอร์เซนต์ของ ฟีตัลคาล์ฟ ซีรัม (Fetal calf serum) ซึ่ง Sabato และคณะ, 1987 พบว่า การใช้ ฟีตัลคาล์ฟ ซีรัมในปริมาณที่มากเกินไป (20%) ทำให้การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย Con A ลดลง และพบว่า 10 % ฟีตัล คาล์ฟ ซีรัมเป็นปริมาณที่เหมาะสม

1.5.4 ชนิดและความเข้มข้นของเลคตินที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยไมโตเจนที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไป ทำให้การตอบสนองของการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยกว่าที่ควรจะเป็น จึงควรจะทำการทดลองโดยใช้เลคตินแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลคตินส่วนใหญ่จะมีลักษณะของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์คล้ายรูประฆังคว่ำ (Bell Shape) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเลคตินจากน้อยไปมาก (Dose response curve) (Sabato และคณะ, 1987)

1.5.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ ด้วยเลคตินจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์และเลคตินต่างชนิดกันอาจใช้เวลาในการกระตุ้นต่างกัน Douglas และคณะ (1969) พบว่า การแบ่งตัวเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA และ Con A จะมีค่าสูงสุด เมื่อเลี้ยงไปได้ 3 - 5 วัน แต่ถ้าการกระตุ้นเซลล์ด้วย PWM ต้องใช้เวลา 5 - 7 วัน ถึงจะมีการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ได้สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ไม่ว่าจะเป็นของหนูและคนส่วนใหญ่มักจะใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นเซลล์ 3 วัน

1.6 การนำสมบัติการเป็นไมโตเจนของเลคตินไปใช้ประโยชน์

การนำเลคตินไปประยุกต์ใช้ เลคตินที่ถูกนำไปใช้ศึกษาบ่อย ได้แก่ PHA, Con A และ PWM ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการตรวจสอบต่าง ๆ เช่น

1.6.1 ใช้ตรวจสอบภาวะบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน โดยนำเลคติน เช่น PHA, Con A และ PWM ไปกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วย และติดตามความสามารถของผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อไมโตเจนในการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation)

หรือติดตามหน้าที่เฉพาะอย่างของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Specific immune function) เช่น การหลั่งสารลิมโฟไคน์ หรือ การเหนี่ยวนำ Effector cell ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับของคนปกติ ตัวอย่างโรคที่พบความบกพร่องในการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเลคติน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 โรคและความบกพร่องของการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อถูกเลคตินกระตุ้น (ดัดแปลงจาก Ammann, 1984)

โรค	ปรากฏการณ์ที่ตรวจพบ
โรคติดเชื้อ	
- Acute viral infection	↓ T cell, ↓ T_4 : T_8 ratio, ↓ PHA (บางราย)
- AIDS	↓ Lymphocyte, ↓ T_4, ↓ T_4 : T_8 ratio
- Leprosy (โรคเรื้อน)	↓ T cell, ↓ PHA
- Measles (โรคหัด)	↓ PHA
- Rubella (เป็นตั้งแต่กำเนิด) (หัดเยอรมัน)	↓ T cell, ↓ PHA
โรคมะเร็ง	
- Acute leukemia	↓ PHA
- Hodgkin's disease	↓ PHA
- Nonlymphoid malignancy	↓ PHA, ↓ T cell
โรคออโตอิมมูน (Autoimmune disease)	
- Chronic active hepatitis	↓ T cell, ↓ Lymphocyte cytotoxicity การตอบสนองต่อไมโตเจน ↓, ↑ อิมมูโนโกลบูลิน (Ig)
- Rheumatiod arthritis	↓ PHA, ↑ Ig
- Systemic lupus erythematosus	↓ T cell, ↓ PHA, ↓ suppressor T cell

↓ หมายถึง ลดลง
↑ หมายถึง เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 5 (ต่อ)

โรค	ปรากฏการณ์ที่ตรวจพบ
ภาวะการสูญเสียโปรตีน	
- Nephrotic syndrome	↓ IgG, ↓การตอบสนองด้านแอนติบอดีต่อแอนติเจนต่าง ๆ
- Protein - losing enteropathy	↓ T cell, ↓ PHA, ↓ Ig
โรคและภาวะอื่น ๆ	
- Aging	↓ การตอบสนองต่อไมโตเจน, ↓ T cell, ↑ B cell, ↑ IgG และมีความบกพร่องของ Suppressor T cell
- Alcoholic cirrhosis	↓ PHA
- Anesthesia	↓ การตอบสนองต่อไมโตเจน, ↓ T cell, ↓ B cell
- Diabetes	↓ PHA
- Down's syndrome	↓ PHA, ↓ T cell
- Malnutrition	↓ T cell
- Sarcoidosis	↓ PHA, ↓ Ig
- Uremia	↓ PHA

↓ หมายถึง ลดลง
↑ หมายถึง เพิ่มขึ้น

การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคติน ยังใช้ในการตรวจวัดผลการรักษาโดยวิธี Immuno suppressive และ Immunotherapeutic manipulation และใช้วินิจฉัยโรคทางยีน ที่เกิดจากความเสียหายของโครโมโซม โดยดูจากการแบ่งตัวของเซลล์ หรือหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะเช่น การหลั่งสารลิมโฟไคน์ หรือการเหนี่ยวนำของ Effector cell (Oppenheim และคณะ, 1975)

1.6.2 ใช้ในการแยกประเภทเซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes subpopulation) Poretz และคณะ (1986) นำ Wistaria floribunda agglutinin (WFA), Sophora japonica agglutinin (SJA) และ Maclura pomifera lectin (MPL) ไปใช้ประโยชน์ ตัวอย่างเช่น ในการแยกประเภทเซลล์ลิมโฟไซต์ของหนู (Mouse) และพบว่า ไธโมไซต์ (ที ลิมโฟไซต์) ที่ติดฉลาก (label) ด้วย WFA ไม่สามารถเกิดการเกาะกลุ่ม (Agglutination) ได้ ส่วน บี ลิมโฟไซต์ เกิดการเกาะกลุ่มตามปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างเรื้อรัง (Chronic lymphocytic leukemia) ไม่สามารถจับกับเลคตินจากถั่วลิสงได้ ในขณะที่เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งของต่อมน้ำเหลืองชนิด Burkitt (Burkitt's lymphoma) จับกับเลคตินจากถั่วลิสงได้ดี แสดงว่า เลคตินจากถั่วลิสงช่วยบ่งบอกและแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ได้ (Resner และ Biniaminor, 1979)

1.6.3 ใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงบนผิวเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ เช่น ทำให้ทราบหน้าที่และโครงสร้างของเยื่อเซลล์ และการสังเคราะห์ไกลโคโปรตีน หรือ ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่มีน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตบนเยื่อเซลล์ที่เปลี่ยนไปจากเดิม ทำได้โดยเติมเลคตินที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น Con A, WGA หรือเลคตินจากถั่วลิสง ลงไปในขณะที่เลี้ยงเซลล์ เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ดื้อต่อเลคตินดังกล่าว (lectin - resistant variants) แล้วเลี้ยงต่อไปเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และศึกษาสมบัติของเยื่อเซลล์ การประยุกต์ใช้ในลักษณะข้างต้นนี้เกิดขึ้นหลังจาก Wringth (1973) ทำการแยกเซลล์จากรังไข่ของแฮมสเตอร์ (Chinese hamster ovary) ที่ดื้อต่อ เลคตินจากถั่วลิสง และ Con A ได้สำเร็จเป็นคนแรก

1.6.4 **ศึกษาสารลิมโฟไคน์** การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคติน ทำให้เกิดการหลั่งสารลิมโฟไคน์ออกมา ดังที่กล่าวในหัวข้อ 1.4.3 ทำให้สามารถศึกษาลักษณะและสมบัติของลิมโฟไคน์ที่เกิดขึ้นได้

1.7 โรคมะเร็งหลอดอาหาร ในการศึกษานี้จะทำการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคตินจากสะตอ โดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร ซึ่งเข้ารับการรักษา ณ. โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ดังนั้นจึงจะขอกล่าวถึงลักษณะอาการ, สาเหตุ, และการรักษาของผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร พอสังเขป

โรคมะเร็งหลอดอาหารเป็นโรคที่พบได้บ่อยในภาคใต้ของประเทศไทย จากสถิติของหน่วยมะเร็ง โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ปี พ.ศ. 2536 พบว่า โรคมะเร็งหลอดอาหารเป็นอันดับ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับมะเร็งทุกชนิดรวมทุกอวัยวะ โดยจัดเป็นอันดับ 4 ในมะเร็งที่พบในเพศชายและเป็นอันดับ 10 ในมะเร็งที่พบในเพศหญิง

อภิณพ จันทร์วิทัน (2532) พบว่า ผู้ป่วยที่มาพบแพทย์และต้องรับการรักษาในโรงพยาบาลนั้น มักจะมีอาการรุนแรงแล้ว โดยพยาธิสภาพลุกลามออกมานอกหลอดอาหารมากเกินกว่าที่จะรักษาให้หายขาด และพบว่าอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นประชากรในภาคใต้นั้นต่ำกว่าที่อื่นมาก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาระบาดวิทยาของโรค, การตรวจและการวินิจฉัยให้มีความละเอียดขึ้น ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกก่อนที่โรคจะแพร่กระจายไป

1.7.1 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลอดอาหาร

1.7.1.1 เครื่องดื่มชนิดแอลกอฮอล์และยาสูบ

จากการศึกษาของอภิณพ จันทร์วิทัน (2532) พบว่า อัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารที่ดื่มแอลกอฮอล์ทุกวันและสูบบุหรี่มากกว่าวันละ 20 มวนเท่ากับ 27.9 คน : แสนคน ส่วนอัตราการตายของผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารที่ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ ไม่สูบบุหรี่ เท่ากับ 7.6 คน : แสนคน เท่านั้น การสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์จึงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ชัดเจนมาก โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบมะเร็งหลอดอาหารกับมะเร็งที่อวัยวะอื่น Kuratsune และคณะ (1965) พบว่า สารก่อมะเร็งที่ได้จาก

ทาร์ (Tar) ของบุหรี่ร่วมกับการให้แอลกอฮอล์ จะทำให้สัตว์ทดลองเกิดมะเร็งได้ แต่ถ้าให้น้ำมันมะกอกแทน พบว่า ไม่เกิดมะเร็งหลอดอาหารแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับ Lyon และคณะ (1976) ที่พบว่า ผู้ที่เคร่งในศาสนาไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มแอลกอฮอล์อย่างชาวมอร์มอน (Mormon) ไม่ค่อยเป็นมะเร็งหลอดอาหาร

1.7.1.2 อุปนิสัยการบริโภค

Yang และคณะ (1980) พบว่า การบริโภคอาหารร้อน ๆ หรือเครื่องดื่มร้อน บริโภคอาหารที่มีไนโทรซามีน (Nitrosamine) มากไป หรือบริโภคอาหารที่มีพวกสารอาหารพวกทองแดง และ/หรือ ดีบุกมากหรือน้อยไป ก็เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณเยื่อบุผนังหลอดอาหารได้ และจากรายงานของ Butterworth และ Hutchinson (1983) ยังพบว่า อาหารหลักที่บริโภคเป็นประจำทำให้มีปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแตกต่างกันไปโดยในประเทศที่บริโภคข้าวโพดและข้าวสาลีเป็นอาหารหลักจะมีอุบัติการมะเร็งหลอดอาหารสูง ในประเทศที่บริโภคข้าวเจ้าเป็นอาหารหลักจะเป็นประเทศที่มีอุบัติของมะเร็งหลอดอาหารปานกลาง และในประเทศที่บริโภคข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง ถั่ว เป็นอาหารหลักจะมีอุบัติการมะเร็งหลอดอาหารต่ำเป็นต้น

1.7.1.3 ลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละบุคคล

ลักษณะเฉพาะตัวของผู้ป่วยอาจมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งหลอดอาหารได้ เช่น ผู้ที่มีการอักเสบเรื้อรังในช่องปาก มักจะเป็นมะเร็งหลอดอาหารในระยะต่อมา จากรายงานของ Haper (1970) เชื่อว่า โรคทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับอาการของโรคมะเร็งหลอดอาหาร ได้แก่ โรค Tylosis ซึ่งมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม แบบ Autosomal dominant

1.7.2 สมมุติฐานของโรคมะเร็งหลอดอาหารในภาคใต้ของประเทศไทย

1.7.2.1 เกี่ยวกับอาหาร พบว่า อาหารหลักทางภาคใต้ของประเทศไทย เช่น สะตอ, ลูกเนียง และน้ำบูดู อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุหลอดอาหาร โดยทำให้เซลล์ผนังเยื่อบุจากปกติ มีการอักเสบ, เกิด Dysplasia และกลายเป็นมะเร็งในระยะเริ่มแรก ตามลำดับ (อภิณพ จันทร์วิทัน, 2532)

1.7.2.2 **เกี่ยวกับน้ำ** พบว่า ปริมาณของไนไตรท์ในแหล่งน้ำดื่มในภาคใต้ของประเทศไทยค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับภาคอื่น ๆ (ณรงค์ ณ. เชียงใหม่, 2526) ซึ่งไนไตรท์ถือเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง (Kurashima และคณะ, 1991)

1.7.2.3 **เกี่ยวกับสภาพแวดล้อม** เนื่องจากภาคใต้อยู่ในเขตร้อน มีฝนตกชุก เป็นระยะเวลานานกว่าภาคอื่น ๆ ช่วงฤดูฝนจะมีเชื้อราขึ้นตามแหล่งที่อยู่อาศัย ซึ่งอาจปนเปื้อนกับภาชนะ ทำให้ผู้ป่วยได้รับเชื้อราเข้าไปได้โดยตรง อาจจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุหลอดอาหาร (อภิณพ จันทร์วิทัน, 2532)

1.7.3 ลักษณะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร

อภิณพ จันทร์วิทัน (2532) พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารจะมีปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งหมด และ ที ลิมโฟไซต์จะลดลง แต่ปริมาณของ บี ลิมโฟไซต์ จะไม่เปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยดังกล่าวเมื่อเทียบกับของคนปกติ

1.7.4 วิธีการรักษา

ส่วนใหญ่ใช้วิธีการรักษาแบบผสมผสาน โดยใช้รังสีรักษา, สารเคมีบำบัด และการผ่าตัด ซึ่ง Chanvitan และคณะ (1987; 1988) พบว่า วิธีการรักษาแบบผสมผสานดังกล่าวจะช่วยลดโอกาสที่จะกลับเป็นใหม่ได้อีก แต่จะเพิ่มอัตราการอยู่รอดหรือไม่นั้น ต้องใช้เวลาในการติดตามผู้ป่วยเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

1.8 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็ง

ความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนให้เกิดการแบ่งตัวได้สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคมะเร็ง การทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (Cell mediated immune response; CMIR) เพื่อวินิจฉัยและพยากรณ์ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคมะเร็งต่าง ๆ นั้น มีผู้ทำการศึกษาไว้แล้ว โดยส่วนมากจะ ใช้ PHA ช่วงความเข้มข้น 5 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็ง และพบว่า ผลการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งจะสัมพันธ์กับระยะของโรค ตัวอย่างเช่น Sutherland และคณะ (1970) พบว่า ค่าการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ระหว่างผู้ป่วยโรค

มะเร็ง ของเต้านม, ปอด และมดลูก ที่ยังไม่ได้รับการรักษา จำนวน 70 คน ด้วย PHA มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p < 0.001$) Garrioch และคณะ (1970) ศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งในระยะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคนปกติ และพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ที่ต่อมน้ำเหลืองและม้าม (Non - lymphoid tumors) มีค่าการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย PHA ต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ Ducos และคณะ (1970) พบว่า การตอบสนองต่อการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งที่ปอด จำนวน 27 คน ลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ส่วน Tin และ Hirochi (1972) ศึกษาการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดลม (Bronchogenic carcinoma) จำนวน 44 คน ด้วย PHA ก็พบค่าการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้มีค่าแตกต่างกันมาก แต่เมื่อคิดเป็นค่าการกระตุ้นเฉลี่ยแล้ว พบว่า มีค่าการกระตุ้นต่ำกว่าของคนปกติ ($p < 0.001$)

ส่วนในโรคมะเร็งของระบบทางเดินอาหาร มีผู้ศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ ด้วย PHA ช่วงความเข้มข้น 1 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Con A 2, 5 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่น Zembala และคณะ (1977) พบว่า การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย PHA มีค่าลดลง เมื่อโรคมะเร็งต่าง ๆ เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร, ลำไส้ (colon) และ ช่องทวาร (rectum) ทวีความรุนแรงขึ้น

อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งบางชนิดไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ หรือสัมพันธ์กับอาการของโรคน้อยมาก เช่น ในการศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งของทางเดินอาหาร จำนวน 408 คน ด้วย PHA, Con A และ PWM ช่วงความเข้มข้น 1 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Moertel และคณะ, 1979) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทางภูมิคุ้มกันและปัจจัยอื่น ๆ มาช่วยสนับสนุนในการบ่งชี้สภาวะของโรคมะเร็ง เช่น ในระยะหลังมีผู้ศึกษาถึงการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยใช้จำนวนเซลล์ ในรูปของ % ที ลิมโฟไซต์, % บี ลิมโฟไซต์ มาช่วยในการบ่งชี้ อย่างไรก็ตามการดูค่าการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยควบคู่ไปกับจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์จะให้ข้อมูลที่ดีขึ้น เช่น Orita และคณะ (1976) ศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer) จำนวน 360 คน พบว่า

การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งดังกล่าวด้วย PHA ลดลงเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น แต่ไม่ใช่เพราะ % ที ลิมโฟไซต์ ลดลง เนื่องจาก % ที ลิมโฟไซต์ แปรผกผันกับ ระยะของมะเร็ง แต่ % ที ลิมโฟไซต์ มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับระยะสุดท้าย (Terminal stage) ของโรคกับการกลับมาเป็นใหม่ของโรค Evans และคณะ (1977) ก็พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer) จำนวน 100 คน มีจำนวน ที ลิมโฟไซต์, จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ และเม็ดเลือดขาว (White blood cell) ลดลงตามความรุนแรงของโรคที่ทวีขึ้น และ Dellon และคณะ (1976) ยังพบว่า ระดับของ ที ลิมโฟไซต์ ลดลงเมื่อมีการลุกลามของมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งหลอดลม จำนวน 112 คน นอกจากนี้ Entlicher และคณะ (1970); Chretien และคณะ (1973) พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินหายใจ มีการตอบสนองของการกระตุ้นลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วย PHA และ Con A และยังพบว่า จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งหมด, จำนวน ที และ บี ลิมโฟไซต์ลดลง หลังจากรักษาด้วยยา [Cheema และ Hersh (1971); Watkins (1973); Twomey และคณะ (1974)]

ถ้าสามารถใช้เลคติน ตรวจสอบการเกิดโรคมะเร็งในระยะเริ่มแรกได้จะทำให้แพทย์สามารถให้การรักษาได้อย่างทันท่วงทีก่อนที่จะมีการพัฒนาของโรคไปมากจน ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงขึ้นและอัตราการรอดน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ข้อมูลด้าน อื่น ๆ มาประกอบการวินิจฉัยโรคด้วย เช่น อาการที่เกิดขึ้น, พฤติกรรมของผู้ป่วย หรือแม้แต่ลักษณะทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เช่น การหลั่งสารลิมโฟไคน์ต่าง ๆ, ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ ทั้ง ที และ บี ลิมโฟไซต์ ย่อมจะช่วยให้การวินิจฉัยถูกต้องยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

ศึกษาความสามารถของเลคตินที่แยกได้จากสะตอในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 สะตอ และสารเคมี

2.1.1.1 สะตอที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นสะตอพันธุ์ข้าวซึ่งซื้อมาจากตลาดสดของเทศบาลนครหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2.1.1.2 สารเคมี ส่วนใหญ่เป็น Analytical grade จากบริษัทต่างๆ ดังนี้

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Sodium dihydrogen orthophosphate	BDH
Sodium chloride	Carlo Erba
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	Fluka
D - glucose anhydrous	
Heparin	Leo
Toluene	May & Baker
Acetone	
Ammonium sulfate	Merck

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Polymorprep	Pharmacia
PPO	Sigma
Di - methyl POPOP	
HEPES	
Ficoll - Hypaque	
Eagle - HEPES	
Sephadex G - 100	
RPMI 1640	
^{3}H - thymidine 1.0 mCi / ml (specific activity 15.7 Ci / mmol)	Amersham

2.1.2 อุปกรณ์

UV-160A (UV - visible recording spectrophotometer) ของ Shimadzu, magnetic stirer ของ Sybron, Microtiter plate ของ Nunc, Blender ของ National, Centriflo membrane cone ของ Amicon, Hand tally counter ของ Fuji Nishi, Cell .counter ของ Boeco, Cell harvester ของ Nunc, Glass microfibre filters ของ Whatman, CO_2 incubator ของ Revco Ultima, Centrifuge รุ่น TJ - 6 ของ Beckman, Refrigerated centrifuge รุ่น J2 - 21 ของ Beckman, Liquid scintillation counter รุ่น LS 50000 TD ของ Beckman, Freeze - drier ของ FTS System, Automatic fraction collector รุ่น 2110 ของ Bio - rad, micro tube pump รุ่น MP - 3 ของ EYELA

2.1.3 สัตว์ทดลองและกลุ่มประชากรศึกษา

2.1.3.1 หนูที่ใช้ตลอดการทดลอง เป็นหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rat) เพศผู้ อายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 200 กรัม

2.1.3.2 เลือดคนปกติ จากผู้ที่มาบริจาคที่คลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 18 คน เป็นเพศชาย 14 คน และเพศหญิง 4 คน อายุเฉลี่ย 29.5 ปี

2.1.3.3 เลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. นพ. อภิณพ จันทร์วิทัน ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 12 คน เป็นชาย 7 คน และเพศหญิง 5 คน อายุเฉลี่ย 69.9 ปี

2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

2.2.1 การสกัดเลคตินจากเมล็ดสะตอ การสกัดเลคตินออกจากเมล็ดสะตออาศัยวิธีการของ Suvachittanont และ Peutpaiboon (1992) โดยมีการปรับปรุงเล็กน้อย กล่าวคือ เพิ่มขั้นตอนการสกัดไขมันออกจากสารละลายสกัดโปรตีนของสะตอโดยใช้อะซีโตน (Acetone) ดังแสดงในรูปที่ 3

2.2.1.1 การสกัดโปรตีนออกจากเมล็ดสะตอ

นำเมล็ดสะตอพันธุ์ข้าวที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แช่ในน้ำกลั่นอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จึงบดให้ละเอียดใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate buffered saline) pH 7.2 โดยใช้สะตอ 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร คนเบาๆ ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วกรองเอาตะกอนหยาบทิ้ง สารละลายที่กรองได้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 x g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บสารละลายชั้นบน (Supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนที่มีไขมันปนอยู่ด้วย ไว้ทำการแยกเลคตินต่อไป ดังรูปที่ 3 ส่วนตะกอนทิ้งไป

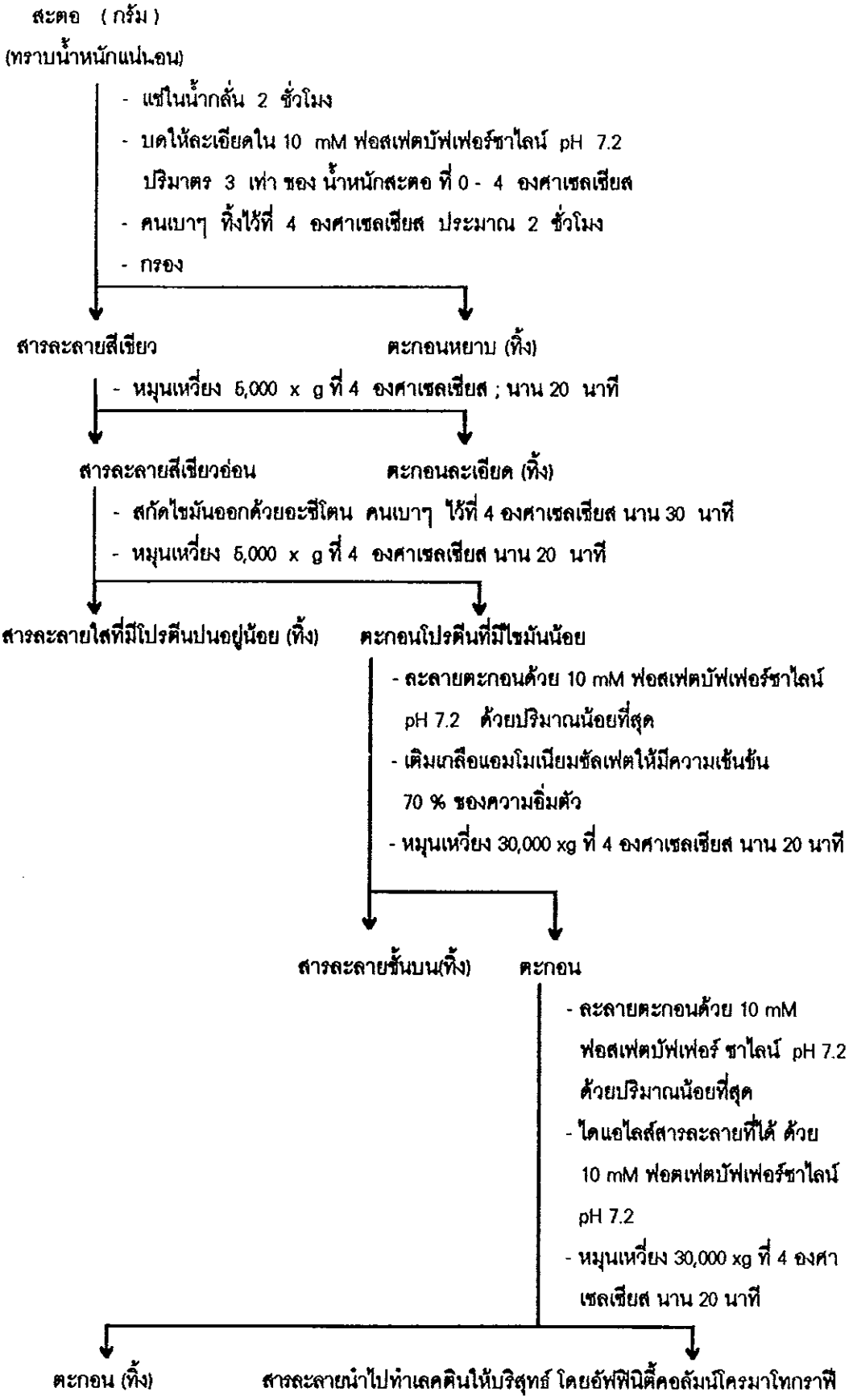
2.2.1.2 การสกัดไขมันออกจากสารละลายสกัดโปรตีน-ของสะตอ

เมล็ดสะตอ มีไขมันเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง (8.1 %, ตามรายงานของกองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530) จึงสกัดไขมันออกจากสารละลายโปรตีนที่ได้ในข้อ 2.2.1.1 โดยใช้อะซีโตนที่เย็นจัดในอัตราส่วน 1.5 : 1 โดยปริมาตร คนเบา ๆ ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยง ที่ 5,000 x g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกชั้นไขมันที่อยู่ในสารละลายตอนบนทิ้งไป เทสารละลายที่เหลือทิ้ง เอาตะกอนโปรตีนที่มีไขมันปนอยู่น้อยไปใช้แยกเลคตินต่อไป (รูปที่ 3)

2.2.1.3 การตกตะกอนโปรตีนจากสะตอด้วยเกลือแอมโม-เนียมซัลเฟต

จากรายงานของอารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) พบว่า โปรตีนจากสะตอส่วนใหญ่จะตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20 - 70 % ของความอิ่มตัว และที่แอมโมเนียมซัลเฟต 20 % มีโปรตีนตกตะกอนน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % โดยการเติมผลึกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างช้าๆ และคนอย่างสม่ำเสมอ จนได้ความเข้มข้น 70 % ของความอิ่มตัว ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 30,000 x g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเอาไขมันที่ลอยอยู่และสารละลายใสทิ้งไป ละลายตะกอนด้วย 10 mM ฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.2 ด้วยปริมาตรน้อยที่สุดที่ตะกอนจะละลายได้หมด และ

ไดแอไลส์ในบัฟเฟอร์นี้ปริมาตร 100 เท่า ของสารละลายโปรตีน ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อย ๆ เพื่อกำจัดเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยง ที่ 30,000 x g 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนที่อาจมีอยู่หลังจากไดแอไลส์แล้วทิ้งไป เก็บสารละลายโปรตีนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยกเลคตินให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 3 ขั้นตอนต่าง ๆ ของการสกัดเลคตินจากเมล็ดสะตอ

2.2.1.4 การทำเลคตินจากสะตอให้บริสุทธิ์ โดยอัฟฟินิตี้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 70 % ของความอิ่มตัว ซึ่งผ่านการไดแอไลส์แล้วและทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอน มาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G - 100 (ขนาด 55 x 1.2 เซ็นติเมตร) ซึ่งปรับให้สมดุลด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.2 ไว้ก่อนแล้ว ชะ (elute) คอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมในอัตราเร็ว 22.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารที่ถูกชะออกมาเป็นส่วนๆ ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องเก็บสารแยกส่วนอัตโนมัติ (Automatic fraction collector) วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ของโปรตีนที่ถูกชะออกมาที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ชะจนค่าการดูดกลืนแสงเข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย 0.1 M กลูโคส (ตามวิธีของ Yadav และ Ganasawaran, 1976) ด้วยความเร็วเท่าเดิม เพื่อให้โปรตีนที่จับกับ Sephadex G - 100 ตามหลักของอัฟฟินิตี้โครมาโทกราฟี (Affinity chromatography) ถูกชะออกมา นำสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M กลูโคสในแต่ละหลอดทดลอง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ชะจนค่าการดูดกลืนแสงเข้าใกล้ศูนย์ นำโปรตีนในหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนสูงมารวมกัน ซึ่งจากรายงานของอารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) พบว่า โปรตีนที่ถูกชะด้วยกลูโคสที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีสมบัติเป็นเลคติน ต่อจากนั้นนำมาไดแอไลส์เอากลูโคสออกใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.2 และทำให้เลคตินเข้มข้นขึ้นโดยหมุนเหวี่ยงผ่าน Centriflo membrane cone ชนิด CF 25 ของบริษัท Amicon จำกัด ซึ่งปล่อยให้สารขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 25,000 ดาลตัน ผ่านออกมาได้ ด้วยความเร็วไม่เกิน 500 x g เป็นเวลา 10 - 30 นาที ทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ตามวิธีในข้อ 2.3.2 แล้วทำให้แห้งโดยใช้ Freeze - drier เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2.2 การทดสอบความสามารถของเลคตินจากสะตอในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

2.2.2.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดงจากหนู (Wistar rat)

นำเลือดหนูที่เจาะโดยมีเฮพาริน (Heparin) **กันเลือดแข็ง มาหมุน** เหวี่ยงที่ 600 x g นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนพลาสมา (Plasma) ทิ้งไป ล้างเม็ดเลือดแดงด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.2 3 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เป็น 2 % ด้วย บัฟเฟอร์ดังกล่าว (Hierholzer และ Suggs, 1969)

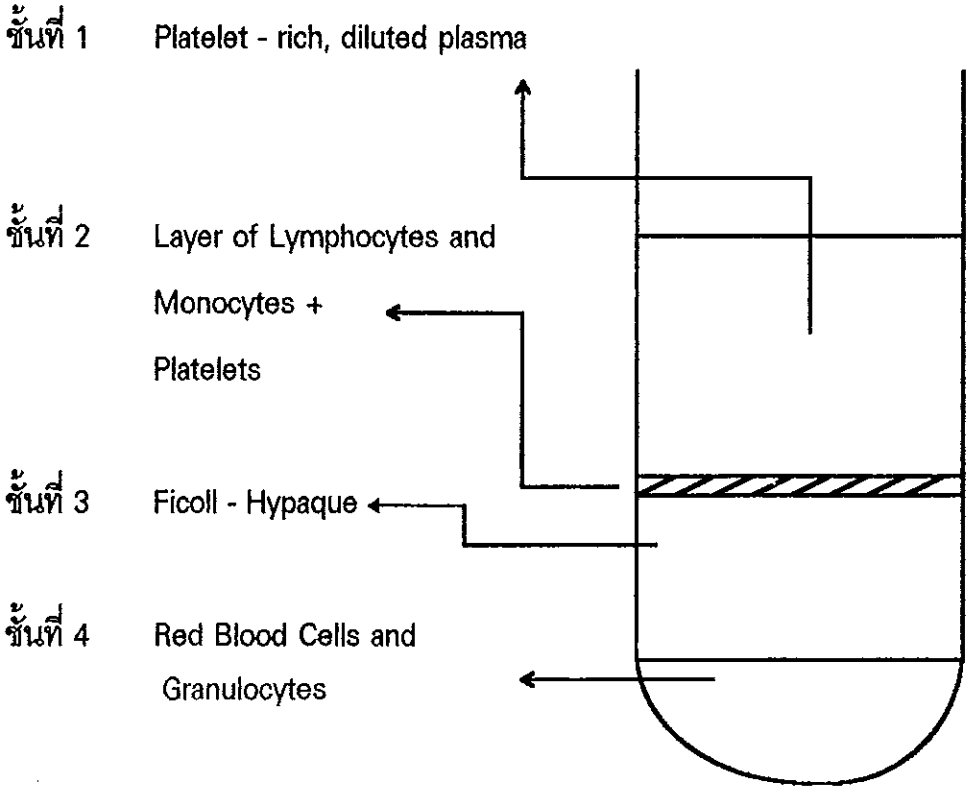
2.2.2.2 การทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม

การทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Lamp และคณะ (1983) โดย ปิเปตสารละลาย 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ ลงในไมโครไตเตอร์เพลทที่มีหลุมเป็นรูปตัวยู (U - shaped well microtitter plate) หลุมละ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายโปรตีนที่ต้องการทดสอบลงในหลุมแรกของแถวปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำให้เจือจางทีละ 2 เท่าตามลำดับ (Serial two - fold dilution) ใส่สารละลายเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 2 % ลงไปในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 4 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง บันทึกผลโดยถือว่าหลุมที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ มีค่าเป็น 1 โดยค่าความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มคิดเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ (Titer) เช่น ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ คือ สารละลายที่เจือจางลง 1/8 เท่า หรือไตเตอร์คือ 1 : 8 ค่าความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มคือ 8 หน่วยต่อ 50 ไมโครลิตร นอกจากนี้อาจดูความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มในรูปความสามารถจำเพาะ (Specific activity) เป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนได้ หากทราบความเข้มข้นของเลคตินที่ใช้ทดสอบ เช่น ความเข้มข้นของเลคตินที่ใช้ทดสอบคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าความสามารถของเลคติน ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มคือ 8 หน่วยต่อ 50 ไมโครลิตร ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่มจะเท่ากับ 160 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Kilpatrick และ Yeoman, 1978)

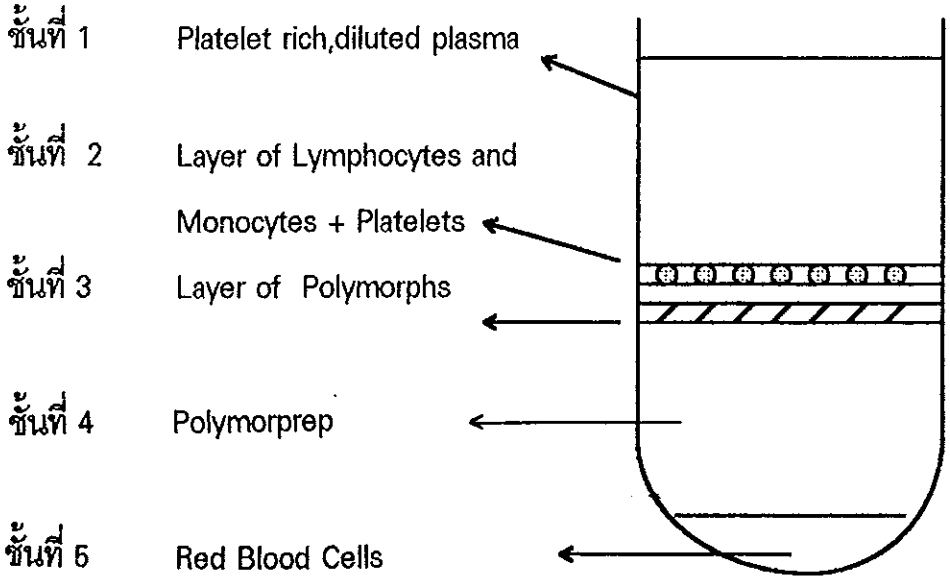
2.2.3 การศึกษาผลของเลคตินจากสะตอต่อการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ ในเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนโดยใช้ ^{3}H - ไธมิดีน เป็นสารตามรอย (Tracer)

2.2.3.1 การเตรียมลิมโฟไซต์จากเลือดคน

ในการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดคนที่ใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 2 ช่วง โดยใช้ ACD (Acid - citrate dextrose) เป็นสารกันเลือดแข็ง และมี Ficoll - Hypaque เป็นตัวกลางแยกชั้นของเซลล์ลิมโฟไซต์ ตามวิธีของ Kaver (1992) ทำการหมุนเหวี่ยงที่ 450 xg นาน 30 นาที แล้วจะเกิดการแยกชั้น ดังรูปที่ 4 และใช้เฮพารินเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และ Polymorprep เป็นตัวกลางแยกชั้นของเซลล์ลิมโฟไซต์ ตามวิธีของ Novogrodsky และคณะ (1975) หลังจากทำการหมุนเหวี่ยงที่ 450 xg นาน 30 นาที แล้ว จะเกิดการแยกชั้น ดังรูปที่ 5



รูปที่ 4 ผลของการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยใช้ Ficoll - Hypaque



รูปที่ 5 ผลของการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยใช้ Polymorprep

ทำการแยกชั้นโมโนนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ (Mononuclear leucocyte) ในชั้นที่ 2 ของรูปที่ 4 และ 5 ออกมาใส่หลอดฝาเกลียว ล้างเซลล์ที่เตรียมได้ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 450 xg นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ก่อนทำการแขวนลอย (Resuspend) เซลล์ด้วยสารละลาย RPMI 1640 pH 7.2 ที่มี Feal calf serum (FCS) อยู่ 10 % และมี Penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kaver, 1992)

2.2.3.2 การคำนวณจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์

นำเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้ จากข้อ 2.2.3.1 มาแขวนลอยด้วย RPMI 1640 ด้วยปริมาตรตามต้องการ (ในการทดลองนี้ใช้ 2 - 3 มิลลิลิตร) โดยใช้หลอดดูด (Pasture pipet) ขึ้นลงเบา ๆ เพื่อทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์กระจายตัวสม่ำเสมอ หลังจากนั้น ดูดตัวอย่างเซลล์เพียงเล็กน้อย หยดลงบนแผ่นแก้วมาตรฐานสำหรับนับเซลล์ (Cell counting chamber, ดูรูปที่ 6) โดยใช้ปลายปิเปตแตะที่ขอบของกระจกปิดมาตราฐาน (Thick cover slide) เซลล์ลิมโฟไซต์ที่แขวนลอยอยู่จะไหลเข้าไปเต็มพอดีกับแผ่นแก้วมาตรฐาน

นับจำนวนลิมโฟไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ ตรงกลางกากบาท ซึ่งประกอบด้วยสี่เหลี่ยมกลาง จำนวน 25 ช่อง โดยสุ่มนับเพียง 5 ช่อง ในแนวเส้นทะแยงมุม (ดูรูปที่ 7) แล้วรวมจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้ในพื้นที่ทั้ง 5 ช่องนั้น

วิธีคำนวณ

เนื่องจากสี่เหลี่ยมใหญ่ตรงกลางกากบาท มีปริมาตร

= 1 x 1x 0.1 = 0.1 ล.บ.ม.ม.

สมมุติว่า นับจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ใน 5 ช่องสี่เหลี่ยมกลาง ได้ A เซลล์

จำนวนเซลล์ทั้งหมดในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ = A/5 x 25 = 5A

1 ล.บ.ซ.ม. (มิลลิลิตร) = 1,000 ล.บ.ม.ม.

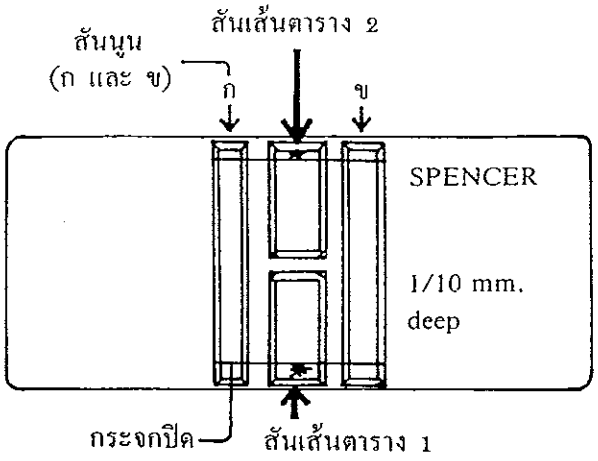
เพราะฉะนั้น จำนวนเซลล์ที่แยกได้ = 5A/0.1 x 1,000

= $5A \times 10^4$ ต่อ มิลลิลิตรของเซลล์ที่แขวนลอย

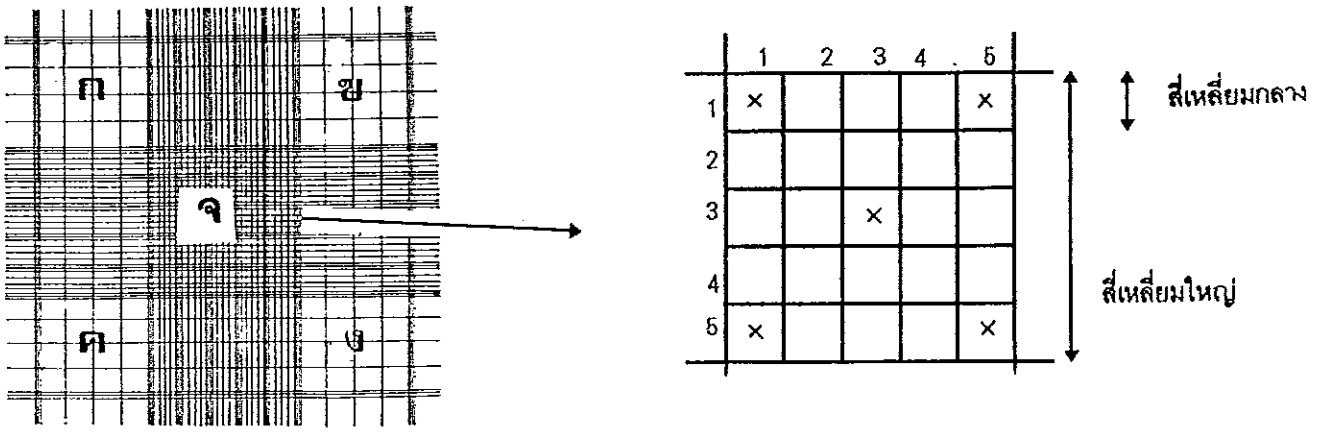
จำนวนเซลล์ที่แยกได้ทั้งหมด = $5A \times 10^4$ x จำนวนมิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอยที่มีอยู่

และเมื่อนำมาหารด้วยจำนวนมิลลิลิตรของเลือดที่ใช้ ก็จะทราบจำนวนเซลล์ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดแต่ละมิลลิลิตร

หลังจากนั้นทำการปรับเซลล์ลิมโฟไซต์ให้ได้จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของ 10 % FCS - RPMI ตามที่ต้องการใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นของสารสกัดเลคตินต่อไป



รูปที่ 6 แผ่นแก้วมาตราฐาน (Chamber) สำหรับนับเม็ดเลือด มีกระจกซึ่งมีขนาดและน้ำหนักจำเพาะวางคานอยู่บนสัน ก และ ข ทำให้ความลึกจากพื้นตารางที่ 1 และ 2 ถึงแผ่นกระจกปิด เท่ากับ 1/10 มิลลิเมตร



รูปที่ 7 ตารางนับเซลล์ลิมโฟไซต์บนแผ่นแก้วสำหรับนับเซลล์ลิมโฟไซต์ นับเซลล์ลิมโฟไซต์ในตาราง จ.

2.2.3.3 การเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

ก. การเตรียมสารละลายเลคตินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เตรียมสารละลายเลคตินที่ต้องการทดสอบ ใน RPMI 1640 ที่มี ฟีตัล คาล์ฟ ซีรัม อยู่ 10 % และมี Penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อใช้สารละลายเลคตินปริมาตร หลุมละ 25 ไมโครลิตรแล้ว จะได้สารละลายเลคตินที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ เลคตินจากสะตอ 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, PHA 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, Con A 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ PWM 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. การเตรียมเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้ ให้มีจำนวนเซลล์ที่แขวนลอย = 4×10^5 และ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองในส่วน 3.3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงต่อหลุม = 4×10^4 และ 1×10^5 เซลล์ใน 100 ไมโครลิตรของเซลล์ที่แขวนลอย

ค. การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารละลายเลคติน

จ่ายสารละลายเพาะเลี้ยง (10 % FCS - RPMI) ทั้งที่มีและไม่มีส่วนผสมของสารละลายเลคตินในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ ลงในถาดเพาะเลี้ยง ในปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 หลุมต่อหนึ่งขนาดของความเข้มข้น (4 replicates) โดยเริ่มจากไม่มีส่วนผสมของสารเลคติน เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบพื้นฐาน (Basal cell culture) แล้วจ่ายเซลล์ลิมโฟไซต์แขวนลอยที่เตรียมไว้ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติม 10 % FCS - RPMI ลงในหลุมต่าง ๆ เพื่อให้ได้ปริมาตรรวมของการเพาะเลี้ยง = 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการเพาะเลี้ยงในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 - incubator) ที่มี 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แลวเติม ^3H - ไธมิดีนที่เจือจางด้วย RPMI 1640 ลงไปจำนวน 25 ไมโครลิตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ไมโครคูรีต่อหลุม แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 72 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

ง. การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvesting)

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvest) ในแต่ละหลุมบนกระดาษกรองใยแก้ว โดยใช้เครื่องเก็บเซลล์ (Cell harvester) ดังรูปที่ 8 และ 9 รอจนกระดาษกรองแห้งสนิท นำ disk บนแผ่นใยแก้วที่ดักเก็บเซลล์จากหลุมเพาะเลี้ยงแต่ละหลุมไปบรรจุในขวดไว-แอล (Vial) เติมลิควิด ซินทิลเลชั่น ค็อกเทล (Liquid scintillation cocktail) จำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ คือ มี PPO และ dimethyl - POPOP อยู่ 4.8 กรัม และ 0.5 กรัม ต่อ โทลูอีน (Toluene) 4 ลิตร ตามลำดับ (Gery, 1971)

จ. การตรวจนับปริมาตรสารรังสี (Scintillation couting)

นำขวดที่บรรจุแผ่นใยแก้ว และสารละลายซิลทิลลิน ไปวัดกัมมันตภาพรังสีของ ^{3}H โดยมีหน่วยเป็น DPM เปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคตินกับเมื่อไม่มีเลคติน โดยดูจากปริมาณ ^{3}H (จำนวน DPM) ที่วัดได้บนกระดาษกรอง

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของทุกผลการทดลอง จากการศึกษานี้ใช้วิธีการทดสอบด้วยค่าพื้นฐานทางสถิติ โดยค่า SD ได้จาก Descriptive statistics ของโปรแกรม Microsolf Excel 4.1 สำหรับ PI ได้มาจากการเปรียบเทียบค่า DPM เฉลี่ย (ของการทดลอง 2 - 4 ซ้ำ) ระหว่างผลการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคตินกับเมื่อไม่มีเลคติน

$$PI = \frac{\text{ค่า DPM ที่วัดได้จากเซลล์ที่กระตุ้นด้วยเลคติน}}{\text{ค่า DPM ที่วัดได้จากเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยเลคติน}}$$

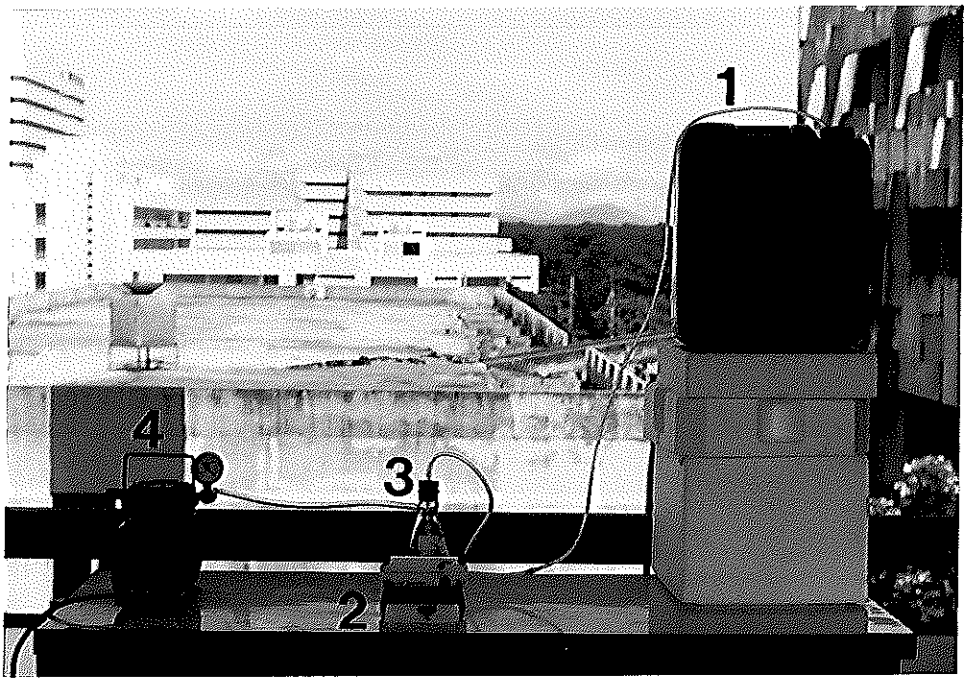
ในการศึกษานี้ ได้พิจารณาเลือกใช้ค่า PI ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3 (มีค่าการกระตุ้นเฉลี่ยของเซลล์มากกว่าค่าเปรียบเทียบ 200 เปอร์เซ็นต์) ว่าเป็นค่าที่มีการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ

การหาค่าเฉลี่ยของ DPM ที่วัดได้ อาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้

1) กรณีที่มี replicates ใดที่ให้ค่าเบี่ยงเบนไปจาก replicates อื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด (ไม่ว่าจะเป็นในทางบวกหรือทางลบ) ค่าที่แตกต่างออกไปนั้นจะไม่ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ย

2) กรณีที่ค่า DPM ของแต่ละ replicates มีค่าแตกต่างกันทุกค่า จะใช้ค่าเฉลี่ยของทุก replicates ในการคำนวณหาค่า PI

รูปที่ 8 การเก็บเซลล์ลิมโฟไซต์บนกระดาษกรองใยแก้ว โดยใช้ Nunc cell harvester



รูปที่ 9 อุปกรณ์สำหรับเก็บเซลล์ลิมโฟไซต์บนกระดาษกรอง
ประกอบด้วย 1. ถังบรรจุน้ำกลั่นที่ใช้สำหรับล้างเซลล์
บนกระดาษกรอง
2. Cell harvester
3. Flask รองรับสารละลายที่ไหลผ่าน
กระดาษกรองแล้ว
4. เครื่องปั๊มสูญญากาศ

3. ผลการทดลอง

3.1. ผลของการสกัดเลคตินจากสะตอและการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม

ในการสกัดเลคตินจากสะตอเพื่อให้ได้ปริมาณเลคตินเพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน โดยเริ่มจากสะตอ จำนวน 100 ฝัก เมื่อนำมาแกะเปลือกออก ได้เนื้อสะตอเพียง 1236 กรัม แบ่งมาสกัด 7 ครั้ง โดยเฉลี่ยครั้งละประมาณ 180 กรัม อย่างต่อเนื่อง จากเนื้อสะตอ 180 กรัม เมื่อแยกเลคตินตามขั้นตอนในรูปที่ 3 ได้เลคตินโดยเฉลี่ย 28.1 มิลลิกรัม (15.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสะตอ) เลคตินนี้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม ได้ 320 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.2 จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและของผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร

จากการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ และของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารจากเลือด เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ของการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ด้วยเลคตินต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า คนปกติมีจำนวนเซลล์เฉลี่ย = $2.9 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของเลือด ในขณะที่ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร มีจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์เฉลี่ย = $1.0 \times 10^5 \pm 0.4 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของเลือด ดังนั้นจะเห็นว่า จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติมากกว่าจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ดังกล่าว โดยเฉลี่ยถึง 2.9 เท่า

3.3. ผลการใช้เลคตินชนิดต่างๆ กระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์

3.3.1 การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์คนปกติด้วยเลคตินจากสะตอเปรียบเทียบกับเลคตินอื่น ๆ

ในขั้นต้นได้ทำการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ จากเลือดคนปกติ จำนวน 3 ราย เป็นชาย 1 ราย และหญิง 2 ราย (รายที่ 1 - 3 ในตารางที่ 8) ด้วยเลคตินจากสะตอ

ในความเข้มข้นที่ต่างกันเท่าตัว จำนวน 4 ขนาด ตั้งแต่ 10 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายละเอียดดังข้อมูลที่แสดงไว้ในตารางที่ 6 และเพื่อต้องการเปรียบเทียบการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคตินจากสะตอ กับ PHA และ Con A ซึ่งกระตุ้น ที ลิมโฟไซต์ และ PWM ที่กระตุ้น บี ลิมโฟไซต์ (Kaver, 1992) จึงได้ทำการทดลองกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติด้วยเลคตินจากสะตอเปรียบเทียบกับเลคตินเหล่านี้ จากการทดสอบกับเซลล์ลิมโฟไซต์ของเลือดคนปกติทั้งหมด 11 ราย เป็นชาย 10 ราย และหญิง 1 ราย (รายที่ 4 - 14 ในตารางที่ 8) รายละเอียดดังข้อมูลในตารางที่ 7

เมื่อพิจารณาผลการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์คนปกติเหล่านี้ ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM เป็นรายบุคคล (ตารางที่ 6 และ 7) จะเห็นได้ว่า เลคตินทุกชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์คนปกติได้แตกต่างกันทั้งในเชิงระดับ (ความแรงของการกระตุ้น) และปริมาณของความเข้มข้นของสารเลคตินที่ต้องใช้ เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติมีการตอบสนองต่อ PHA ในระดับความเข้มข้นที่ 2 และหรือ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกราย โดยมีค่า Proliferation index (PI) สูงสุดตั้งแต่ 3.9 - 123.4 (ดูตารางที่ 8) ในขณะเดียวกันผลการทดลอง พบว่า 72.7 เปอร์เซ็นต์ (8/11 ราย) และ 60 เปอร์เซ็นต์ (3/5 ราย) ของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติ ที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้น (PI > 3) ด้วย Con A และ PWM ที่ระดับความเข้มข้น 2 - 4 และ 10 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า สารสกัดเลคตินจากสะตอมีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ จากคนปกติ ได้ต่ำกว่าเลคตินทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้เปรียบเทียบในการศึกษานี้

ตารางที่ 6 ผลของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ จากคนปกติ 3 ราย ด้วยสารสกัดเลคตินจากสะตอ

เลคตินจากสะตอ (µg/ml)	DPM (Mean ± SD)*		
	รายที่ 1	**รายที่ 2**	**รายที่ 3**
0	1200 ± 224	1289 ± 328	988 ± 74
10	1936 ± 360	2355 ± 279	1447 ± 376
20	2576 ± 393	7384 ± 111	2000 ± 542
40	3877 ± 975	1320 ± 29	2058 ± 1639
80	2668 ± 313	926 ± 67	1520 ± 464

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 replication

ตารางที่ 7 การกระตุ้น

เลคตินความเข้มข้นต่าง * (µg/ml)		7	รายที่ 8	รายที่ 9	รายที่ 10	รายที่ 11
เลคตินจากสะตอ	0	: 6000	664 ± 383	664 ± 120	27052 ± 4435	4963 ± 654
	10	: 44826	3012 ± 620	4518 ± 1229	90282 ± 28006	7596 ± 2920
	20	: 2424	4103 ± 1667	5818 ± 774	64172 ± 10748	4209 ± 1439
	40	: 6344	ND	2221 ± 982	56173 ± 13429	3654 ± 1125
	80	: 4478	ND	34039 ± 753	66636 ± 32690	1160 ± 600
PHA	2	: 25948	23446 ± 1490	3093 ± 3004	175758 ± 51024	612684 ± 47878
	4	: 23616	2103 ± 207	2481 ± 1593	298310 ± 64274	434089 ± 84068
Con A	2	14302	1933 ± 1915	1083 ± 422	73044 ± 25140	120615 ± 24437
	4	9030	17910 ± 9979	2094 ± 1977	25555 ± 11673	116946 ± 32416
PWM	10	15610	2736 ± 473	835 ± 318	46356 ± 5825	ND
	20	6490	2154 ± 1122	1219 ± 343	96530 ± 41970	ND

* ND ไม่ได้ทำการทด

ค่าเฉลี่ยจาก 4 re

ตารางที่ 8 สรุปค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ จำนวน 14 ราย

เป็นชาย 10 ราย เป็นหญิง 4 ราย อายุเฉลี่ย 30 ปี

ความเข้มข้นของเลคติน		รายที่													
(ug/ml)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
เลคตินจากสะตอ	10	3.3	1.4	1.2	0.8	1.0	1.5	3.2	4.5	6.8	3.3	1.5	1.6	1.8	1.5
	20	2.6	1.2	0.5	0.9	1.3	2.0	1.1	6.2	8.8	2.4	0.8	2.1	5.7	2.0
	40	1.5	1.3	0.7	1.3	1.0	3.0	5.1	ND	3.3	2.1	0.7	3.2	1.0	2.1
	80	1.2	1.6	0.7	1.0	1.0	1.5	2.2	ND	2.2	2.5	0.2	2.2	0.7	1.5
PHA	2	5.4	1.2	1.9	41.7	107.3	10.0	6.0	35.3	4.7	6.5	123.4	ND	ND	ND
	4	2.6	3.9	1.1	26.3	82.3	8.6	3.7	3.2	3.7	11.0	86.6	ND	ND	ND
Con A	2	3.7	1.0	11.7	60.9	22.5	2.0	3.2	2.9	1.6	2.7	24.3	ND	ND	ND
	4	1.2	1.1	1.8	35.8	16.8	1.1	3.1	27.0	3.2	0.9	22.9	ND	ND	ND
PWM	10	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	3.5	4.1	1.3	1.7	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	1.9	3.2	1.8	3.6	ND	ND	ND	ND

แทน PI > 3

เซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติมีการตอบสนองต่อเลคตินจากสะตอ โดยมีค่า PI > 3 ที่ความเข้มข้นขนาดใดขนาดหนึ่ง ในระหว่าง 10 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 57.1 เปอร์เซ็นต์ (8/14 ราย) และ 37.5 เปอร์เซนต์ (3/8 ราย) ของกลุ่มที่ตอบสนองนี้มีการตอบสนองต่อเลคตินจากสะตอโดยมีระดับ PI เกิน 3 มากกว่า 1 จุด ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.2 การกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ

การกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร (Esophagus carcinoma) โดยใช้เลคติน 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ เลคตินจากสะตอที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, PHA ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, Con A ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ PWM ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองใช้เซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดผู้ป่วย จำนวน 8 คน เป็น ชาย 6 คน กับ หญิง 2 คน จากจำนวนนี้ เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยการผ่าตัด, การใช้ยา 5 - Fluorouracil และ การฉายแสง ตามลำดับ (ผู้ป่วยรายที่ 6 - 8 ในตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยเหล่านี้ ด้วย PHA, Con A และ PWM เป็นรายบุคคล (ตารางที่ 9) จะเห็นได้ว่า เลคตินทุกชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารได้แตกต่างกันทั้งในเชิงระดับ (ความแรงของการกระตุ้น) และปริมาณของความเข้มข้นของสารเลคตินที่ใช้ เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแล้ว (ผู้ป่วยรายที่ 6 - 8 ในตารางที่ 9) มีการตอบสนองต่อ PHA และ Con A ในระดับความเข้มข้น ที่ 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกราย โดยมีค่า PI สูงสุดตั้งแต่ 6.1 - 210 และ 9.6 - 98 ตามลำดับ แต่ไม่มีการสนองตอบต่อ PWM เลย ในขณะที่ เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา 5 ราย มีผลตอบสนองต่อการกระตุ้น (PI > 3) ด้วย PHA, Con A และ PWM เพียง 1 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 1 ในตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร 8 ราย ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA และ Con A

ความเข้มข้นของเลคติน (µg/ml)		DPM (Mean± SD)							
		รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3	รายที่ 4	รายที่ 5	รายที่ 6	รายที่ 7	รายที่ 8
เลคตินจากสะตอ	0	1788 ± 635	37911 ± 10118	38393 ± 15886	14829 ± 706	4303 ± 2041	2454 ± 627	4181 ± 876	1667 ± 459
	10	7687 ± 2209	27640 ± 12994	50210 ± 22583	53386 ± 9478	18589 ± 7029	3166 ± 840	636376 ± 574630	3775 ± 1395
	20	5702 ± 3355	7763 ± 3218	11211 ± 1170	20683 ± 2009	2057 ± 788	2851 ± 893	7190 ± 3820	2966 ± 1611
	40	6042 ± 3515	33424 ± 18742	21371 ± 2294	21401 ± 4212	1373 ± 96	6814 ± 1297	0693 ± 5041	5078 ± 449
	80	7648 ± 531	7175 ± 1162	8372 ± 36	25970 ± 6681	6733 ± 2784	5033 ± 477	6175 ± 1418	5460 ± 1810
PHA	2	9411 ± 3905	51746 ± 22905	53789 ± 13935	8090 ± 3448	2257 ± 1469	171007 ± 6471	25607 ± 3410	349483 ± 43158
	4	5030 ± 1950	45105 ± 1308	38763 ± 4492	3491 ± 1609	2321 ± 345	125639 ± 281612	7880 ± 3609	277524 ± 227912
Con A	2	3978 ± 942	47513 ± 19306	44765 ± 19523	18401 ± 1051	2066 ± 540	110692 ± 34035	35981 ± 12734	144134 ± 10895
	4	7275 ± 2089	11247 ± 1709	23922 ± 9549	7663 ± 2106	1360 ± 691	114922 ± 10338	40151 ± 18837	163369 ± 28836
PWM	10	4224 ± 448	36772 ± 11817	41496 ± 27551	24255 ± 6039	2260 ± 3202	2860 ± 743	4439 ± 1770	4130 ± 2111
	20	6405 ± 3947	11632 ± 1202	13683 ± 131	21119 ± 1209	6578 ± 415	3594 ± 1122	3133 ± 1304	2827 ± 1446

ตารางที่ 10 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร ด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ

ผู้ป่วยรายที่ 1 - 5 เป็นผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา และผู้ป่วยรายที่ 6 - 8 เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง, เคมีบำบัด และผ่าตัด ตามลำดับ

	ความเข้มข้นของเลคติน (ug/ml)										
	เลคตินจากสะตอ					PHA		Con A		PWM	
	0	10	20	40	80	2	4	2	4	10	20
รายที่ 1	1.0	4.3	3.2	3.4	4.3	5.3	2.8	2.2	4.1	2.4	3.6
รายที่ 2	1.0	0.7	0.2	0.9	0.2	1.4	1.2	1.3	0.3	1.0	0.3
รายที่ 3	1.0	1.3	0.3	0.6	0.2	1.2	1.1	1.2	0.6	1.1	0.4
รายที่ 4	1.0	3.6	1.4	1.5	1.8	0.6	0.2	1.3	0.5	1.7	1.4
รายที่ 5	1.0	4.3	0.5	0.3	1.5	0.5	0.5	0.5	0.3	0.5	1.5
รายที่ 6	1.0	2.3	1.8	3.1	3.3	210.0	166.0	86.0	98.0	2.5	1.7
รายที่ 7	1.0	152.0	1.7	2.6	1.5	6.1	4.3	2.6	9.6	1.1	0.7
รายที่ 8	1.0	1.3	1.2	2.8	2.0	70.0	51.0	45.0	47.0	1.1	1.5

แทน PI > 3

จากตารางที่ 10 แม้ว่า สารสกัดจากเลคตินจากสะตอ มีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารทั้งในกรณีที่ได้รับการรักษาแล้ว (2 ใน 3 ราย) และยังไม่ได้รับการรักษา (3 ใน 5 ราย) แต่ก็มีระดับการกระตุ้นต่ำกว่าเลคตินที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ได้รับการรักษาด้วยยามีการตอบสนองต่อเลคตินจากสะตอที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยค่า PI สูงถึง 152 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย PHA และ Con A

3.3.3 การหาความเข้มข้นของเลคตินที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์-ลิมโฟไซต์

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.2.2 พบว่า เลคตินทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารด้วย PI ที่ค่อนข้างต่ำกว่าในรายงานอื่น ๆ ดังนั้นจึงทำการศึกษาการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้โดยใช้ Polymorprep ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM ในช่วงความเข้มข้นที่แตกต่างจากที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2 เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ใช้ในการทดลองนี้แยกได้จากเลือดคนปกติ 3 คน เป็นชายทั้งหมด อายุเฉลี่ย 28 ปี ได้ผลดังตารางที่ 11 - 14 พบว่า เลคตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ โดยที่ความสามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ซึ่งแยกได้จากแต่ละบุคคลนั้นจะแตกต่างกันไป และค่า PI ที่ได้ ก็มิได้สูงกว่าที่เคยได้ในการทดลองหัวข้อ 3.2.2 และเมื่ออาศัยข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 11 - 14 ในการเลือกความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดสอบเลคตินแต่ละชนิด พบว่า PHA กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ และ ความสามารถในการกระตุ้นนี้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเลคตินดังกล่าว โดยที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นได้สูงสุด ถึง 27.1 เท่า สำหรับ Con A ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Con A กระตุ้นได้สูงถึง 9.4 เท่า ส่วน PWM สามารถกระตุ้นได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เลคตินจากสะตอ มีเพียงความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ที่สามารถกระตุ้นการแบ่ง

ตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติได้เล็กน้อย ส่วนความเข้มข้นของเลคตินจากสะตอที่สูงกว่านี้จะยับยั้งการแบ่งเซลล์

จากผลการทดลองที่ได้ในตารางที่ 15 - 18 ได้เลือกความเข้มข้นของเลคตินที่พบว่า กระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติได้ดีที่สุด ดังนี้ คือ PHA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; Con A 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; PWM 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เลคตินจากสะตอ ช่วง 10 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติเปรียบเทียบกับของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร โดยเก็บเลือดของคนปกติและผู้ป่วยอย่างละ 1 คน ภายในวันเดียวกันและศึกษาการกระตุ้นเปรียบเทียบกันทั้งหมด 4 ชุด เป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ 4 คน แบ่งเป็น ชาย 3 คน และหญิง 1 คน อายุเฉลี่ย 28.5 ปี ส่วนผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารที่ยังไม่ได้รับการรักษา 4 คน เป็นชาย 1 คน และหญิง 3 คน อายุเฉลี่ย 65.8 ปี ดังตารางที่ 15 - 18

ตารางที่ 11 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย ด้วย PHA ความเข้มข้น 0.156 - 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ PHA (µg/ml)	PI		
	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3
0.156	1.7	0.8	ND
0.313	2.1	1.6	ND
0.625	2.9	1.2	ND
1.25	2.6	2.5	0.7
2.5	4.2	4.6	ND
5	27.1	22.9	19.5

ND ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 12 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย ด้วย Con A ความเข้มข้น 0.625 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ Con A (µg/ml)	PI		
	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3
0.625	0.7	1.5	ND
1.25	3.4	1.6	1.3
2.5	3.9	1.3	1.2
1.25	2.6	2.5	0.7
5	5.2	2.0	1.4
10	9.4	1.8	3.4
20	15.4	3.2	ND

ND ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 13 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย ด้วย PWM ความเข้มข้น 0.078 - 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ PWM (µg/ml)	PI		
	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3
0.078	ND	ND	3.8
0.156	6.3	6.5	20.1
0.313	17.5	13.5	22.4
0.625	18.9	12.6	4.8
1.25	16.9	14.9	30.9
2.5	15.6	28.9	ND
5	16.5	19.8	ND

ND ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 14 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ จำนวน 3 ราย ด้วยเลคตินจากสะตอ ความเข้มข้น 1.25 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของเลคตินจากสะตอ (µg/ml)	PI		
	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3
1.25	0.5	3.9	ND
2.5	0.8	1.4	ND
5	0.7	0.9	ND
10	0.4	1	1.5
20	0.3	1.3	ND
40	0.2	1	ND
100	ND	ND	0.7
125	ND	ND	0.7
500	ND	ND	0.9
1000	ND	ND	0.6

ND ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 15 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 28 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 64 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM

ความเข้มข้นของเลคติน (µg/ml)		คนปกติ	ผู้ป่วย
		DPM (Mean±SD) n = 3	DPM n = 1
	0	7317 ± 545	2073
PHA	5	151206 ± 2982	15247
Con A	10	11711 ± 1365	6105
PWM	1.25	65084 ± 2550	18710
เลคตินจากสะตอ	10	6245 ± 2221	ND
	20	9917 ± 2030	ND
	40	6933 ± 3898	7596

* ND ไม่ได้ทำการทดลอง

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่แยกได้ ไม่เพียงพอสำหรับการทำการทดลองซ้ำ

ตารางที่ 16 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 20 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 64 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM

ความเข้มข้นของเลคติน (µg/ml)		คนปกติ DPM (Mean±SD) n = 3	ผู้ป่วย DPM n = 1
	0	3515 ± 504	2173
PHA	5	80319 ± 1240	15974
Con A	10	3236 ± 236	1288
PWM	1.25	36039 ± 3545	46483
เลคตินจากสะตอ	10	2006 ± 1977	1373
	20	2624 ± 577	1436
	40	2191 ± 88	1188

<u>หมายเหตุ</u> จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่แยกได้ ไม่เพียงพอสำหรับทำการทดลองซ้ำ

ตารางที่ 17 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของหญิงปกติ อายุ 32 ปี
ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารเพศชาย อายุ 73 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM

ความเข้มข้นของเลคติน (µg/ml)		คนปกติ DPM (Mean±SD) n = 3	ผู้ป่วย DPM (Mean±SD) n = 1
	0	7993 ± 923	4269
PHA	5	64727 ± 5605	9654
Con A	10	5075 ± 1446	11323
PWM	1.25	42793 ± 551	15020
เลคตินจากสะตอ	10	4348 ± 202	2536 ± 182*
	20	3385 ± 1978	2579 ± 394*
	40	6793 ± 1370	4409 ± 894*

* n = 2

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่แยกได้ ไม่เพียงพอสำหรับทำการทดลองซ้ำ

ตารางที่ 18 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของชายปกติ อายุ 34 ปี
ผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารเพศหญิง อายุ 62 ปี
ด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM

ความเข้มข้นของเลคติน (µg/ml)		คนปกติ DPM (Mean±SE) n = 3	ผู้ป่วย DPM n = 1
	0	10126 ± 250	2348
PHA	5	94963 ± 12762	1257
Con A	10	10967 ± 2479	467
PWM	1.25	79038 ± 10627	851
เลคตินจากสะตอ	10	8196 ± 2166	ND
	20	6799 ± 766	ND
	40	12681 ± 8474	3542

* ND ไม่ได้ทำการทดลอง

หมายเหตุ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยที่แยกได้ ไม่เพียงพอสำหรับทำการทดลองซ้ำ

ผลการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ ด้วย PHA, Con A, PWM และเลคตินจากสะตอเปรียบเทียบกับผู้ป่วย ดังตารางที่ 15 - 18 นั้น โดยสรุปจะเห็นว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ ต่ำ เมื่อเทียบกับคนปกติ โดยคนปกติมีค่า PI อยู่ในช่วง 0.4 - 22.9 ส่วนผู้ป่วยมีค่า PI อยู่ในช่วง 0.2 - 21.4 (ตารางที่ 19) สำหรับเลคตินจากสะตอ ค่าการกระตุ้นที่ได้ไม่ค่อยแตกต่างกับคนปกติ ยกเว้นในการทดลองที่ 4 (ตารางที่ 19)

โดยสรุปจะเห็นได้ว่า เลคตินชนิดต่าง ๆ สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติ และผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร และความเข้มข้นของเลคตินที่สามารถกระตุ้น รวมทั้งความสามารถในการตอบสนองต่อการกระตุ้นจะมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นกับแต่ละบุคคล

ตารางที่ 19 ค่า PI ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติเปรียบเทียบกับของผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร ด้วยเลคตินชนิดต่าง ๆ

ความเข้มข้นของเลคติน (ug/ml)		การทดลองที่ 1		การทดลองที่ 2		การทดลองที่ 3		การทดลองที่ 4	
		คนปกติ	ผู้ป่วย	คนปกติ	ผู้ป่วย	คนปกติ	ผู้ป่วย	คนปกติ	ผู้ป่วย
PHA	5	20.7	7.4	22.9	7.4	8.1	2.3	9.4	0.5
Con A	10	1.6	2.9	0.9	0.6	0.6	2.7	1.1	0.2
PWM	1.25	8.9	9.0	10.3	2.4	5.4	3.5	10.5	0.4
เลคตินจากสะตอ	10	0.9	ND	0.6	0.6	0.5	0.6	0.8	ND
	20	1.4	ND	0.7	0.7	0.4	0.6	0.7	ND
	40	0.9	3.7	0.6	0.5	0.8	1.0	1.3	1.5

* ND ไม่ได้ทำการทดลอง

4. วิจารณ์

4.1 จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์

การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ระหว่างคนปกติกับผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร ซึ่งที่จริงควรจะใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยและคนปกติที่มีอายุใกล้เคียงกันมาทำการเปรียบเทียบกัน อย่างไรก็ตามผลการทดลอง พบว่า จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติมีจำนวนมากกว่าของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Evans และคณะ (1977) ที่ศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer) 100 คน พบว่า จำนวน ที ลิมโฟไซต์ และ จำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งหมด มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ

4.2 การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็ง-หลอดอาหารด้วยเลคติน แยกได้เป็น 2 กรณี

4.2.1 กรณีพิจารณาเป็นรายบุคคล การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารด้วยเลคตินจากสะตอ แม้ว่าใช้ความเข้มข้นในช่วงกว้าง คือ 1.25 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อพิจารณาเป็นรายบุคคลแล้วพบว่า ความเข้มข้นของเลคตินจากสะตอที่สามารถการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ คือ ช่วงความเข้มข้น 10 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเลคตินจากสะตอที่ อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์ (2532) ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ไธโมไซต์ของหนูกับเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร

ในกรณีของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์คนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารด้วย PHA, Con A ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ PWM ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกันของเลคตินแต่ละชนิดมีค่าการกระตุ้นแตกต่างกันในแต่ละบุคคล แม้ว่าจะเป็นผู้ป่วยที่มี

เพศเดียวกัน และช่วงอายุใกล้เคียงกัน เหมือนกับกรณีของคนปกติ ดังตารางที่ 10 กรณีผู้ป่วยคนที่ 2 อายุ 71 ปี และคนผู้ป่วยคนที่ 4 อายุ 73 ปี

การที่ความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารด้วยเลคตินจากสะตอ, PHA, Con A และ PWM ที่ความเข้มข้นเดียวกันมีความแตกต่างกันเช่นนี้ อาจเนื่องจาก ความแตกต่างของแต่ละบุคคลเช่น ผิวเซลล์ลิมโฟไซต์ของแต่ละคนอาจแตกต่างกัน, บางคนอาจได้รับเลคติน จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งก่อนการทดลอง และเซลล์ลิมโฟไซต์ของแต่ละคนก่อนได้รับการกระตุ้น อาจอยู่ในช่วงวงจร (Cell cycle) ที่กำลังแบ่งตัวได้มากน้อยแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามความสามารถของเลคตินในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีค่าแตกต่างกันนี้ ไม่สัมพันธ์กับความแตกต่างของเพศและอายุ เพราะการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ ทั้งของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร จากคนที่มีเพศและอายุช่วงเดียวกัน ยังถูกกระตุ้นได้ด้วยความเข้มข้นของเลคตินที่ต่างกัน และมีค่า PI ที่แตกต่างกันด้วย

4.2.2 กรณีพิจารณาโดยรวมของคนปกติเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร จะพบว่า ค่าการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยและของคนปกติจะไม่แตกต่างกันมาก ดังตารางที่ 8, 10 และ 19 เพราะว่าค่า PI ที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วงกว้างมาก ในขณะที่ Zembala และคณะ (1977) ซึ่งศึกษาโรคมะเร็งของกระเพาะอาหาร, ลำไส้ และช่องทวาร; Orita และคณะ (1976) ซึ่งศึกษาโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร; Moertel และคณะ (1979) ซึ่งศึกษาโรคมะเร็งทางเดินอาหาร (Gastrointestinal carcinoma); Evans และคณะ, 1977 ที่ศึกษาโรคมะเร็งลำไส้; Entlicher และคณะ (1970); Dellon และคณะ (1975) และ Chretien และคณะ (1977) ซึ่งศึกษาโรคมะเร็งทางเดินหายใจ (Bronchogenic carcinoma) ทั้งหมดพบว่า การกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งต่าง ๆ ที่กล่าวมา ด้วยเลคติน ชนิด PHA, Con A และ PWM มีค่าต่ำกว่าของคนปกติ

4.3 การปรับปรุงผลงานนี้ต่อไป

งานวิจัยนี้ มีสิ่งที่อาจปรับปรุงให้ดีขึ้นได้ ดังต่อไปนี้

4.3.1 การเลือกตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารและคนปกติ ควรทำการเลือกผู้ป่วยและคนปกติที่มีอายุใกล้เคียงกัน แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถจะเลือกอายุผู้ป่วยให้ใกล้เคียงกับอายุคนปกติได้ เนื่องจาก ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารทางภาคใต้ของประเทศไทย จะเข้ามาทำการรักษาที่โรงพยาบาลก็ต่อเมื่อมีอาการอยู่ในขั้นรุนแรง ซึ่งส่วนใหญ่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป แต่คนปกติอายุ 60 ปีขึ้นไปเลยวัยที่จะบริจาคเลือดแล้ว เสนอว่าควรแก้ไข โดยการเลือกกลุ่มควบคุมของผู้ป่วยมาทำการทดลอง ซึ่งเลือกมาจากกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ใช่ผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร แต่มีอายุใกล้เคียงกับผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหาร

4.3.2 ในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคติน ควรจะมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเลคตินทุกชนิดที่นำมา ทดสอบก่อนจะทำการศึกษาการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยทำการทดลองกับเลคตินแต่ละชนิดในหลาย ๆ ความเข้มข้น ให้มีช่วงครอบคลุมได้มากพอ เพราะการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้จากแต่ละบุคคล อาจแตกต่างกัน (Sabato และคณะ, 1987) แต่การทำเช่นนี้ในกรณีของเซลล์ลิมโฟไซต์จากผู้ป่วย พบว่า จำนวนเซลล์จะไม่เพียงพอ

4.3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ เลคตินจากสะตออาจจะสามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนได้ แต่จะต้องทำการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ ด้วยระยะเวลาที่นานกว่า 3 วัน

อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าเลคตินจากสะตอมีสมบัติการเป็นไมโตเจนหรือไม่ จึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยอาจจะขยายเวลาในการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ให้นานกว่า 3 วัน เพื่อจะได้นำสมบัติของเลคตินจากสะตอไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

5. สรุป

การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารด้วยเลคตินจากสะตอเปรียบเทียบกับเลคตินอื่น ๆ พอที่จะสรุปได้ว่าเลคตินจากสะตอสามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติและผู้ป่วยได้น้อยกว่า PHA และ Con A ที่ความเข้มข้นเท่ากัน และสูงกว่า (10 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การตอบสนองที่มีค่า PI $\geq$ 3 ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า PI เฉลี่ย = 4.2 $\pm$ 1.2 แม้ว่าเกินกว่าครึ่ง (57.1 %) ของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติสามารถตอบสนองต่อเลคตินจากสะตอได้ในระดับหนึ่ง (PI > 3) แต่ความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับเลคตินชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน บ่งชี้ว่าสัดส่วนของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยเลคตินจากสะตอที่พบในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหารมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มที่มีการตอบสนองต่อเลคตินชนิดอื่น ๆ การตอบสนองนี้อาจเป็นการตอบสนองแบบจำเพาะ จึงยากที่จะสรุปว่า เลคตินจากสะตอมีคุณสมบัติเป็น T - cell mitogen เช่นเดียวกับ PHA และ Con A

เอกสารอ้างอิง

กองโภชนาการ. กรมอนามัย 2524. ตารางคุณค่าอาหาร.

ณรงค์ ณ. เชียงใหม่. 2526. " การประเมินมลภาวะชายหาดเก้าเส้ง ", สงขลานครินทร์เวชสาร 1(2) : 62 - 70.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย : ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง, กรุงเทพฯ : หจก. พันนี่พับบลิชชิ่ง.

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2528. " ลูกสะตอหรือสะตอ พืชที่กำลังมีอนาคต ", รูสมิแล ปีที่ 9 : 53 - 54.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น และ ทัศนีย์ สุโกศล. 2530. อิมมูโนวิทยา มปป., กรุงเทพฯ : มปท.

อภินพ จันทร์วิทัน. 2532. มะเร็งหลอดอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2, สงขลา : โรงพิมพ์ลิมบราเดอร์.

อารีรักษ์ พืชน์ไพบูลย์. 2532. " เลคตินจากเมล็ดสะตอ " วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Abrignani, S. and Cammisuli, S. 1988. " *Vicia Villosa* Lectin is a Mitogen for Mouse Lymphocytes ", Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 85(4) : 446 - 451.

Amento, E.P., Kurnick, J.T., Epstein, A. and Krane, S.M. 1982. " Modulation of Synovial Cell Products by a Factor from a Human Cell Line : T Lymphocyte Induction of a Mononuclear Cell Factor ", Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 5367 - 5371.

Ammann, A.J. 1984. Immunodeficiency Disease. In Basic and Clinical Immunology. (Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. and Wells, J.V., eds.) pp. 384, Califonia. Lange Medical Publications.

Austyn, J.M. and Wood, K.J. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. pp. 467 - 469. Oxford : Oxford University Press.

Banerjee, K.K. and Sen, A. 1981. " Purification and Properties of a Lectin from the Seeds of *Croton tiglium* with Hemolytic Activity Toward Rabbit Red Blood Cells ", Arch. Biochem. Biophys. 212 : 740 - 753.

Barondes, S.H. 1984. " Soluble Lectins : A New Class of Extracellular Proteins ", Science 223 : 1259 - 1264.

Barondes, S. H. 1988. " Bifunctional Properties of Lectins : Lectins Redefined ", TIBS 13 : 480 - 482.

Barral, Netto M., Santos, S.B., Barral, A., Moreira, L.T., Santos, C.F., Moreira, R.A., Oliveira, J.T. and Cavada, B.S. 1992. " Human Lymphocyte Stimulation by Legume Lectins from the Diocheae Tribe ", Immunol. Invest. 21 : 297 - 303.

Barrett, J.T. 1978. Textbook of Immunology : An Introduction to Immunochemistry and Immunobiology. 3rd. ed. Saint Louis : The C. V. Mosby Company.

Barrett, J.T. 1988. Textbook of Immunology : An Introduction to Immunochemistry and Immunobiology. 5th. ed. Saint Louis : The C. V. Mosby Company.

Bellanti, J.A. 1979. Immunology : Basic Processes. London : W. B. Saunders Company.

Bessler, W., Resch, K. and Ferber, E. 1976. " Valency - Dependent Stimulating Effects of Lima Bean Lectins on Lymphocytes of Different Species ", Biochem. Biophys. Res. Commun. 69 : 578 - 585.

Bretiling, H., Stanislawski, E., Jacobs, G. and Becker, W. 1983. " Isolation and Characterization of a Lectin from the Snail *Biomphalaria Glabrata* and a Study of its Combining Sites. Biochim. Biophys. Acta. 749 : 143 - 152.

Brown, J. C. and Hunt, R. C. 1978. " Lectin ", Int. Rev. Cytol. 52 : 277 - 349.

Brugarolas, A., Gosavez, M. 1980. " Treatment of Cancer by Inducer of Reverse Transformation ", Lancet 2 : 68 - 70.

Bubenik, J., Kieler, J., Trombolt, V., Hermann, G. and Jandlova, T. 1988. " Defect in Lectin - Induced Interleukin 2 Production by Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Invasive Urinary Bladder Carcinoma ", Immunol. - Lett. 18 : 115 - 118.

Buckley, A.R., Montgomery, D.W., Kibler, R., Putnam, C.W., Zukoski, C.F., Gout, P.W., Beer, CT. and Russel, DH. 1986. " Prolactin Stimulation of Ornithine Decarboxylase and Mitogenesis in Nb2 Node Lymphoma Cells : the Role of Protein Kinases C and Calcium Mobilization ", Immunopharmacology. 12 : 37 - 51.

Butterworth, J.r. and Hutchinson, C.E. 1983. Nutritional Factors in the Induction and Mainteinance of Malignancy. New York. Academic Press.

Chanvitan, A., Puttawibul, P. and Nimitpanpong, P. 1987. " Preoperative Chemotheraphy and Radiotherapy in Cancer of the Esophagus : a Potentially Curative Approach ", Thai J. Surg. 8 : 263 - 272.

Chanvitan, A., Puttawibul, P. and Nimitpanpong, P. 1988. Combined Therapy for Cancer of the Esophagus. : In Surgery of the Esophagus. (Montosri, M., Granelli, P., eds) pp. 189 - 197, Bolonga, Italy.

Chapel, H. and Haeney, M. 1984. Essential of Clinical Immunology. London. Blackwell Scientific Publications.

Cheema, A.R. and Hersh, E.M. 1971. " Patient Survival After Chemotherapy and its Relationship to *In Vitro* Lymphocyte Blastogenesis ", Cancer 28 : 851 - 855.

Chretien, P.B., Crowder, W.L., Gertner, H.R., Sample, W.F. and Catalona, W.J. 1977. " Correlation of Preoperative Lymphocyte Reactivity with the Clinlcal Course of Cancer Patients ", Surg. Gynecol. Abd. Obstet. 136 : 380 - 384.

Cohen, J.J., Rodriguez, G.E., Kind, P.D. and Campbell, P.A. 1975. " Listeria Cell Wall Fraction : A B Cell Mitogen ", J. Immunol. 114(3) : 1132 - 1134.

Dazzo, F. B. and Brill, W. 1978. " Regulation by Fixed Nitrogen of Host Symbiont Recognition in the Rhizobium Clover Symbiosis ", Plant. Physiol. 62 : 18 - 21.

Dellon, A.L., Potvin, Claude. and Chretien, P.B. 1975. " Thymus - Dependent Lymphocyte Levels in Bronchogenic Carcinoma : Correlations with Histology, Clinical Stage, and Clinical Course After Surgical Treatment ", Cancer 35 : 687 - 694.

Donati, D., Degiannis, D., Homer, L., Gastaldi, L., Raskova, J. and Raska, K Jr. 1991. " Immune Deficiency in Uremia : Interleukin - 2 Production and Responsiveness and IL - Receptor Expression and Release ", Nephron. 58 : 268 - 275.

Douglas, S.D., Kamin, R. M. and Fudenberg, H. H. 1969. " Human Lymphocyte Response to Phytomitogens *in vitro* : Normal, Agammaglobulinaemic and Paraproteinemic Individuals ", J. Immunol. 130 : 1185 - 1195.

Ducos, J., Migueres,J., Colombics, P., Kessous, A. and Poujoulet, N. 1970. "Lymphocyte Response to PHA in Patients with Lung Cancer ", Lancet. 1 : 1111 - 1112.

Entlicher, G., Kostir, J.V. and Kocourek, J. 1970. " Studies on Phytohemagglutinins III Isolation and Characterization of Hemagglutinins from the Pea (*Pisum Sativum L.*)", Biochim. Biophys. Acta. 221 : 272 - 281.

Etzler, M.E. 1985. " Plant Lectins : Molecular and Biological Aspects ", Ann. Rev. Plant Physiol. 36 : 209 - 234.

Evans, J.T., Goldrosen, M.H., Han, T., Minowada, J., Howell, J., Mitteleman, A., Chu, T. M. and Holyke, E. D. 1977. " Cell - Mediated Immune Status of Colon Cancer Patients ", Cancer 5 : 2716 - 2725.

Favero, J., Corbeau, P., Nicolas, M., Benkirane, M., Trave, G., Dixon, JF., Aucouturier, P., Rasheed, S., Parker, JW. and Liautard JP. 1993. " Inhibittion of Human Immunodeficiency Virus Inhibition By the Lectin Jacalin and by a Derived Peptide Showing a Sequence Similarity with gp120 ", Eur. J. Immunol. 23 : 179 - 85.

Feldmann, M. 1992. Encyclopedia of Immunology Edited by Ivan M.R. and Peter J.D. Academic Press. 1 : 438 - 440.

Firon, N., Ofek, I. and Sharon, N. 1983. " Carbohydrate Specificity of the Surface Lectins of *Eschericia coli* , *Klebsiella Pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* ", Carbohydr. Res. 120 : 235 - 240.

Franz, P. and Kindt, A. 1981. " Isolation and Properties of Three Lectins from Mistletoe (*Viscum album L.*) ", J. Biochem. 195 : 481 - 484.

Freier, T.C. and Rudiger, H.E.F. 1990. " Lectin - Binding Proteins from Lentil Seeds as Mitogens for Murine B Lymphocytes ", Phytochemistry 29 : 1459 - 1461.

Gade, W., Jack, M.A., Dahl, J.B., Schmidt, E.L. and Wold, F. 1981. " The Isolation and Charaterization of a Root Lectin From Soybean (Glycin Max.) ", J. Biochem. 237 : 483 - 489.

Galelli, A. and Truffa, B.P. 1993. " *Urtica dioica* Agglutinin, A Superantigenic Lectin from Stinging Nettle Rhizome ", J. Immunol. 151 : 1821 - 1831.

Garrioch, D.B., Good, R.A. and Gatti, R.A. 1970. " Lymphocyte Response to PHA in Patients with Non - Lymphoid Tumors ", Lancet. 1 : 618.

Gery, I. 1971. " Stimulation of B - Lymphocytes by Endotoxin ", J. Immunol. 108 : 1088 - 1091.

Ghosh, B., Dasgupta, B. and Sircar, P.K. 1981. " Bactoarga - a Binding Matrix for Purification of a Lectin from *Butea monosperma* (Lam.) ", Kantze. Indian. J. Biochem. Biophys. 18 : 166 - 169.

Grier, C.E. 3d and Mastro, A.M. 1985. " Mitogen and Co - Mitogen Stimulation of Lymphocytes Inhibited by Three Ca^{++} Antagonists ", J. Cell. Physiol. 124 : 131 - 136.

Guran, A., Ticha, M., Filka, K. and Kocourek, J. 1983. " Isolation and Properties of a Lectin from the Seeds of the Indian Bean or Lablab (*Dolichos Lablab* L.) ", J. Biochem. 209 : 653 - 657.

Haak, F.M., Kino, K., Sone, T. and Jardieu, P. 1993. " Ling Zhi - 8 : A Novel T Cell Mitogen Induces Cytokine Production and Upregulation of ICAM - 1 Expression ", Cell. Immunol. 150 : 101 - 113.

Haper, P.S. 1970. " Carcinoma of the Esophagus with Tylosis ", Q.J. Med. 34 : 317 - 333.

Hapner, K.D. and Robbins, J.E. 1979. " Isolation and Properties of a Lectin from Sain - Foin (*Onobrychis vicifolia*) ", Biochim. Biophys Acta. 580 : 186 - 197.

Hashim, O.H., Gendeh, G.S. and Jaafar, M.I. 1992. " Lectin Extracts of Champedak Seeds Demonstrate Selective Stimulation of T Lymphocyte Proliferation ", Biochem. Int. 27 : 139 - 143.

Hierholzer, J.C. and Suggs, M.T. 1969. " Standardized Viral Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition Test. I. Standardization of Erythrocyte ", Appl. Microbiol. 18 : 816 - 823.

Howard, T.K., Sage, H.J. and Horton, C.B. 1977. " Studies on the Appearance and Location of Hemagglutinins from a Common Lentil During the Life Cycle of the Plant ", Arch. Biochem. Biophys. 149 : 323 - 326.

Humphery, L.J., Humphery, M.A., Singal, O.M. and Volenec, F.J. 1981. "Immunologic Responsiveness of Patients with Cancer. Relationship to tumor Type, Stage and Prognosis ", Ann. Surg. 5 : 574 - 578.

Ikeda, K., Sannoh, T. and Kawasaki, N. 1987. " Serum Lectin with Known Structure Activates Complement Through the Classical Pathway ", J. Biol. Chem. 262 : 7451 : 7454.

Jones, D.A. 1964. " The Lectin in the Seed of *Vicia cracea* L. II. A Population Study and a Possible Function for the Lectin ", Heredity. 19 : 459 - 469.

Kaibuchi, K., Takai, Y. and Nishizuka, Y. 1985. " Protein Kinase C and Calcium ion in Mitogenic Response of Macrophage - Depleted Human Peripheral Lymphocytes ", J. Biol. Chem. 260 : 1366 - 1369.

Kaver, I., Pecht, M., Trainin, N., Greenstein, A. and Braf, Z. 1992. " T Lymphocyte Subsets and Function in Peripheral Blood of Patients with Urological Cancer ", Oncology 49 : 108 - 113.

Kenes, B.J., Moest, P.E. and Neve, P.E. 1982. " Biochemical Events Associated with Lymphocyte Activation in Aging. K^+ Transport and Sensitivity of the $Na^+ - K^+$ Pump to Digoxine ", Exp. Gerontol. 17 : 245 - 254.

Kilpatrick, D.C., Graham, C. and Urbaniak, S.J. 1983. " Inhibition of Human Lymphocyte Transformation by Tomato Lectin ", Scand. J. Immunol. 24 : 11 - 9.

Kilpatrick, D.C., Western, J. and Urbaniak, S.J. 1986. " Purification and Separation of Tomato Isolectins by Chromatofucusing ", Anal. Biochem. 134 : 205 - 209.

Kilpatrick, D.C. and Yeoman, M.M. 1978. " Purification of the Lectin from *Dutura Stramonium* ", J. Biochem. 175 : 1151 - 1153.

Kolberg, J., Michelsen, T.E. and Sletten, K. 1983. " Properties of a Lectin Purified from the Seeds of *Cicer arietium.* ", Hoppe - Seylers. Z. Physiol. Chem. 364 : 655 - 664.

Kolberg, J. and Sletten, K. 1982. " Purification and Properties of a Mitogenic Lectin From *Lathyrus sativus* seeds ", Biochim. Biophys. Acta. 704 : 26 - 30.

Kub, A.J., Entlicher, G. and Kocourek, J. 1982. " Studies on Lectin L. II Isolation and Characterization of the Lectin from Rye Germ (*Secale cereale L.*) ", Acta. Biol. Med. Ger. 41 : 780 - 791.

Kurashima, Y., Tsuda, M. and Sugimura, T. 1991. " Marked Formation of Thiazolidine - 4 - carboxylic acid an Effective Nitrite Trapping Agent *in vivo*, on Boiling of Dried Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) ", J. Agric. Food. Chem. 38 : 1945 - 1949.

Kuratsune, M., Kohehi, S. and Horie, A. 1965. " Carcinogenesis in the Esophagus. Penetration of Benzo Pyrene and Other Hydrocarbons into the Esophageal Mucosa ", Gann. 56 : 177 - 184.

Lai, K.N., Leung, J.C. and Lai, F.M. 1991. " Soluble Interleukin - 2 Receptor Release, Interleukin - 2 Production, and Interleukin - 2 Receptor Expression in Activated T Lymphocytes *in vitro* ", Pathology. 23 : 224 - 228.

Lamb, J.E., Shibata, S. and Goldstein, I.J. 1983. " Purification and Characterization of *Griffonia simplicifolia* Leaf Lectins ", Plant. Physiol. 71 : 879 - 887.

Le, Moal M., Colle, J.H., Galelli, A. and Truffa, B.P. 1992. " Mouse T - Lymphocyte activation by *Urtica dioica* Agglutinin. I Delineation of Two Lymphocytes Subsets ", Res. Immunol. 143 : 691 - 700.

Licastro, F., Morini, M.C., Kretz, O., Dirheimer, G., Creppy, E.E. and Stirpe, F. 1993. " Mitogenic Activity and Immunological Properties of Bolesatine, A Lectin Isolated from the Mushroom *Boletus satanas Lenz* ", Int. J. Biochem. 25 : 789 - 792.

Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. 1987. The Lectin. London : Academic Press, Inc.

Lis, H. and Sharon, N. 1986. " Lectins as Molecules and as Tools ", Ann. Rev. Biochem. 55 : 35 - 67.

Lis, H. and Sharon, N. 1977. The Antigens New York. Academic Press, (M. Sela, ed.) Vol. 4 : 429 - 529.

Lis, H. and Sharon, N. 1977. Lectins : Their Chemistry and Application to Immunology. In " The Antigen " Vol. 3 : Sela, M. ed., New York. Academic Press .

Londei, M. 1992. Encyclopedia of Immunology Edited by Ivan M. R. and Peter J. D. Academic Press. 1 : 443 - 445.

Lyon, J.L., Klanber, M.R., Gardner, J.W. and Smart, C.R. 1976. " Cancer Incidence in Mormons and Non - Mormons in Utah, 1966 - 1970. ", N. Engl. J. Med. 294 : 129 - 135.

Mauchamp, B. 1982. " Purification of an N - acetyl - D - glucosamine Specific Lectin from Epidermal Cell Membrane of *Pieris brassicae L.* ", J. Biochem. 64 : 1001 - 1008.

Mier, J.M. and Gallo, R.C. 1982. " The Purification and Properties of Human T Cell Growth Factor ", J. Immunol. 128 : 1122 - 1127.

Miller, R.L., Collawn, J.F. and Fish, W.W. 1982. " Purification and Macromolecular Properties of a Sialic Acid - Specific Lectin from the Slug *Limax - flavus.* ", J. Biol. Chem. 257 : 7574 - 7580.

Miquel, J., and Economos, A.C. 1979. " Favorable Effect of the Antioxidants and Magnesium Thiazolidine Carboxylate on the Vitality and Life Span of Drosophila and Mice ", Exp. Gerontol. 14 : 279 - 285.

Modiano, J.F., Kelepouris, E., Kern, J.A. and Nowell, P.C. 1988. " Requirement for Extracellular Calcium or Magnesium in Mitogen - Induced Activation of Human Peripheral Blood Lymphocytes ", J. Cell. Physiol. 135 : 451 - 458.

Moertel, C.G., Ritts, R.E., O' Connell, M.J. and Silvers, A. 1979. " Nonspecific Immune Determinants in the Patient with Unresectable Gastrointestinal Carcinoma ", Cancer 43 : 1483 - 1492.

Nakae, H., Yumoto, H., Matsuo, T. and Ebisu, S. 1994. " Mitogenic Stimulation of Murine B Lymphocytes by the N - acetyl - D - galactosamine Specific Bacterial Lectin - Like Substance from Eikenella corrodens ", FEMS. Microbiol. Lett. 116 : 349 - 353.

Novogrodsky, A. and Katchalski, E. 1973. " Mitogenic Effect of Glycosidase on Lymphocytes " Proc. Natl. Acad. Sci. 70 : 2515 - 2518.

Novogrodsky, A., Lontan, R., Ravid, A. and Sharon, N. 1975. " Mitogenic Effect of α - mannosidase on Lymphocytes ", J. Immunol. 115 : 1243 - 1248.

Nsimba - Lubaki, M., Peumans, W.F., Carlier, A.R. 1983. " Isolation and Partial Characterization of a Lectins from *Euphorbia heterophylla* seed ", J. Biochem. 25 : 141 - 145.

Nugata, K. 1983. " Purification and Characterization of the Lectins Present on the Surface of *Streptococcus sanguis* ATTC 10557 ", Osaka. Dailgaku. Shigaku. Zasshi. 28 : 129 - 147.

Ohno, Y., Aoki, N. and Yamamoto T. 1985. " Gamma Interferon Enhances Mitogenic Responses Induced by Pokeweed Mitogen ", Immunol. Lett. 10 : 87 - 90.

Oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L., eds. 1975. Mitogens in Immunobiology New York. Academic Press.

Orita, K., Miwa, H., Fukuda, H., Yumura, M., Uchida, Y., Mamnami, T., Konaga, E. and TanaKa, S. 1976. " Preoperative Cell - Mediated Immune Status of Gastric Cancer Patients ", Cancer 38 : 2343 - 2348.

Petrynilak, J., Janusz, M., Markowska, E. and Lisowska, E. 1981. " Purification of the *Euonymus europaeus* Lectin by Affinity Chromatography on the Desialized MN Blood Group Glycoprotein and Lectin NH_2 - Terminal Analysis ", Acta. Biochem. 28 : 267 - 273.

Pike, B.L. 1992. Encyclopedia of Immunology Edited by Ivan M. R. and Peter J. D. Academic Press. 1 : 440 - 442.

Poretz, R.D., Tang, M. and Vucenik, I. 1986. " The Separation of Lymphocytes Subpopulations with Lectin ", Immunol. Invest. 15 : 521 - 529.

Prujansky, A., Ravid, A. and Sharon, N. 1978. " Using the Two Lectins from Lima Bean ", Biochim. Biophys. Acta. 508 : 137 - 146.

Pusztai, A., Croy, R.R.D., Grant, G. and Stewart, J.C. 1983. Seed Lectin : Distribution Location and Biological Role In Seed Protein (Daussant, J. et. al. eds.) pp. 53 - 82. London. Academic Press

Resner, Y. and Biniaminor, M. 1979. " Interaction of Peanut Agglutinin with Normal Human Lymphocytes and with Leukemic Cells ", Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 447.

Robertson, B.J. and Strength, D.R. 1983. " Characterization of a Lectin from Cowpeas ", Prep. Biochem. 13 : 45 - 56.

Rogue, B., Barreire, M.C. and Neto, A.C. 1985. " Jacalin : an IgA Binding Lectin ", J. Immunol. 134 : 1740 - 1743.

Rowe, P.B., Sauer, D., Fahey, D., Craig, G. and Mccairn, E. 1985. " One Carbon Metabolism in Lectin Activated Human Lymphocytes ", Arch. Biochem. Biophys. 236 : 277 - 288.

Rudiger, H. 1984. " On the Physiological Role of Plant Lectin ", Bioscience 34 : 95 - 99.

Sabato, G., Hall, J.M. and Thompson, L. 1987. " T Cell Mitogens and Polyclonal B Cell Activators ", Methods In Enzymology 150 : 3 - 17.

Sasaki, H. and Aketa, K. 1981. " Purification and Distribution of a Lectin in Sea Urchin (*Arthorcidaris crassispina*) Egg Before and After Fertilization ", Exp. Cell. Res. 135 : 15 - 19.

Stirep, F., Licastro, F., Morini, M.C., Parente, A., Savino, G., Abbondanza, A., Bolognesi, A., Falasca, A.I. and Rossi, C.A. 1993. " Purification and Partial Characterization of a Mitogenic Lectin from the Latex of Euphorbia marginata ", Biochim. Biophys. Acta. 1158 : 33 - 39.

Sutherland, R.M., and Inch, W.R. and McCredic, J.A. 1970. " Phytohemagglutinin - Induced Transformation of Lymphocytes in Patients With Cancer ", In Tenth International Cancer Congress pp. 195, Houston.

Suvachittanont, W., Kurashima, Y., Esumi, Y. and Tsuda, M. 1996. " Thiazolidine - 4 - Carboxylic Acid, an Effective Nitrite Trapping Agent in Human Body, in *Parkia speciosa* Seed and Other Edible Legumes in Thailand ", Food. Chem. in press.

Suvachittanont, W. and Peutpaiboon, A. 1992. " Lectin from *Parkia speciosa* Seeds ", Phytochem 31: 4065 - 4070.

Suvachittanont, W. and Pothirakit, P. 1988. " Protein in *Parkia speciosa seeds* ", Songkla Med. J. 6 : 23 - 30.

Tatsumi, M. and Itoh, T. 1982. " Purification and Characterization of a Lectin From the Shellfish *Saxidomas purpuratus*. ", J. Biochem. 91 : 1139 - 1146.

Tin, H. and Hirochi, T. 1972. " Immunologic Impairment in Bronchogenic Carcinoma : A Study of Lymphocyte Response to Phytohemgglutinin ", Cancer 30 : 616 - 620.

Trunch, A., Albert, F.G., P. and Schmitt, V.A.M. 1985. " Early Steps of Lymphocyte Activation bypass by Synergy between Calcium Ionphores and Phorbol Ester ", Nature 313 : 318 - 320.

Twomey, P.L., Catalona, W.J. and Chretien, P.B. 1974. " Cellular Immunity Cured Cancer Patients ", Cancer 33 : 435 - 440.

Uhlenbruck, G., Hanisch, FG., Kljaji, C - Z., Poznanovic, S., Schroder, HC. and Muller, W.E. 1992. " The Lectin from the Algae Udotea petiolata : Isolation, Characterization and Sugar Binding Properties ", Behring. Inst. Mitt. 91 : 67 - 77.

Ulmer, A.J., Scholz, W. and Flad, H.D. 1982. " Stimulation of Colony Formation and Growth Factor Production of Human T Lymphocytes by Wheat germ Lectin ", J. Immunol. 47 : 551 - 556.

Umetsu, K., Kosaka, S. and Susuki, T. 1984. " Purification and Characterization of a Lectin from the Beetle *Allomyrina dichotoma.* ", J. Biochem. 95 : 239 - 245.

Vasta, G.R., Cheng, T.C. and Marchalonis, J.J. 1984. " A Lectin on the Hemocyte Membrane of the Oyster (*Crassosterea virginica*) ", Cell Immunology. 88 : 475 - 488.

Vasta, G.R. and Cohen, E. 1984. " Carbohydrate Specificity of *Birgus latro* (Coconut crab) Serum Lectins ", Dev. Comp. Immunol. 8 : 197 - 202.

Watkins, S.M. 1973. " The Effects of Surgery on Lymphocyte Transformation in Patients with Cancer ", Clin. Exp. Immunol. 14 : 69 - 76.

Wedner, H.J. and Bass, G. 1986. " Tyrosine Phosphorylation of a 66,600 Mr. Soluble Protein in Lectin - Activated Human Peripheral Blood T Lymphocytes ", J. Immunol. 136 : 4226 - 4231.

Wolff, C.H. 1987. " Kinetics of Ca^{2+} Uptake into Lectin - Induced Secondary Lymphocytes during Reactivated with Con A or IL - 2 ", Scand. J. Immunol. 26 : 7 - 10.

Wolff, C.H. and Akerman, K.E. 1982. " Concanavalin A Binding and Ca^{2+} Fluxes in Rat Spleen Cells ", Biochim. Biophys. Acta. 639 : 315 - 319.

Wringht, J.A. 1973. " Evidence for Pleiotropic Changes in Lines of Chinese to Concanavalin - A and Phytohemagglutinin - P ", J. Cell. Biol. 56 : 666 - 675.

Yaakobovich, Y. and Numan, I. 1983. " Partial Isolation and Characterization of a Hemagglutinating Factor from Avocado Seeds. ", Arch. Toxicol. Supp. 6 : 52 - 57.

Yadav, M. and Ganasawaran, V.K.C. 1976. " Phytomitogen of Tropical Legumes I. Isolation from *Parkia speciosa* and *Pitbecellobium jiringa* ", Malaysia. J. Sci. 4A : 25 - 35.

Yamaguchi, Y., Toge, T., Baba, N., Kuninobu, H., Kegoya, Y., Takayama, T. and Hattori, T. 1981. " The Analysis of Lymphocyte Surface Receptors Recognized by Wheatgerm Agglutinin for Negative Regulation of Immune Response in Cancer Patients ", Jpn. J. Surg. 20 : 51 - 55.

Yang, SG., Shu, YJ., Gin SP. 1980. " Further Studies on The Relationship Between Epithelial Dysplasia and Carcinoma of the Esophagus ", Natl. Mac. J. China. 60 : 39 - 41.

Yasuhiro, H. and Toshio, H. 1992. Encyclopedia of Immunology Edited by Ivan M. R. and Peter J. D. Academic Press. 3 : 1249 - 1250.

Zembala, M., Mytar, B., Popiela, T., Asherson, G.L. 1977. " Depressed in Vitro Peripheral Blood Lymphocyte Response to Mitogens in Cancer Patients : The Role of Suppressor Cell ", Cell. Int. J. Cancer. 19 : 605 - 613.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวเพ็ญสุข จรัลชวนะเพท

วัน เดือน ปีเกิด 23 ตุลาคม 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา	2534