



วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) สายพันธุ์ MU 220 โดยทำการเลี้ยงเส้นใยเห็ดในสภาพนิ่ง (stationary culture) บนอาหารเหลว 3 ชนิด คือ PD, YME, และ SM ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหารเหลวเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บผลการทดลองโดยหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย พบว่าเส้นใยเจริญเติบโตบนอาหาร PD ได้ดีกว่า YME และ SM อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง แสดงให้เห็นชัดเจนว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น natural media (PD และ YME) ให้การเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Synthetic media (SM) โดยในระยะ 3 สัปดาห์แรกของการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PD และ YME จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหาร YME จะลดต่ำลง อันอาจเป็นผลจากปริมาณสารอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้หมดไป ซึ่งอาหาร PD ประกอบด้วยน้ำตาลมันฝรั่ง ซึ่งเป็นแป้ง (starch) ที่ละลายอิมัลชันและน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่สูงถึง 2% ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน (C-source) ที่ดี (Ingold, 1967) และนอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นอื่นๆที่อยู่ในมันฝรั่ง สำหรับอาหาร YME ประกอบด้วย Yeast extract ซึ่งมีวิตามินที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในเห็ด (Cochrane, 1958) Malt extract และน้ำตาลกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและวิตามิน มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับ SM ให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ำสุด เพราะเป็นอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีรายงานว่า เป็นอาหารที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*Lentinus edodes*) (Song et al., 1987) แต่ในขั้นตอนนี้ไม่เหมาะกับการเลี้ยงเส้นใยเห็ด

หมื่นปี ทั้งนี้อาจขาดสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเห็ดชนิดนี้

ผลของการทดสอบหาค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเห็ดทุกชนิดพบว่ามีความ
เข้มข้นต่ำลงเมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในระหว่างที่มีการ
เจริญเส้นใยปล่อยไฮโดรเจน อีออน (H^+) ออกมาเพื่อแลกเปลี่ยนกับการดูดซึมอีออนบางตัว
หรือมีการสร้างกรดบางชนิดออกมา (Lilly and Barnett, 1951)

ในการวิจัยนี้ได้เลือกทำการผลิตเส้นใยโดยใช้อาหาร PD เพราะให้ผลผลิตสูง
และมีราคาต้นทุนต่ำกว่าอาหารชนิดอื่น ทำการเก็บผลในช่วงวันที่ 30 ซึ่งเป็นช่วงที่ให้น้ำหนัก
เส้นใยสูง หลังจากให้น้ำหนักของเส้นใยจะเพิ่มขึ้นน้อยมาก

การเพาะเห็ดหมื่นปีในวัสดุเพาะซีลื้อยไม้ยางพารา พบว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปี
มีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับเส้นใยเห็ดนางรม (หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ สุทธพรหม ตริรัตน์,
2533) คือใช้เวลาเจริญเติบโตเต็มถุงวัสดุเพาะภายใน 15 วัน เมื่อบ่มเส้นใยต่ออีก 15 วัน
แล้วจึงทำการเปิดดอก เก็บผลผลิตในระยะเวลา 60 วัน ได้ดอกเห็ดสดต่อถุงวัสดุเพาะ 600
กรัม เพียง 26.1 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 4.35% ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเห็ดแบบถุงควร
จะได้ผลผลิตเป็นน้ำหนักเห็ดสดต่อน้ำหนักวัสดุเพาะ 15-20% หรือมากกว่านี้จึงจะถือได้ว่าเป็น
การผลิตที่คุ้มทุน แต่มีข้อยกเว้นในเห็ดบางชนิดที่ให้ผลผลิตต่ำกว่านี้ซึ่งก็รวมถึงเห็ดหมื่นปีด้วย
(มานพ แก้วกล้า, 2533) จึงทำให้เห็ดชนิดนี้มีราคาแพง Triratana et al. (1991)
ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ด พบว่า สายพันธุ์ ชนิดของวัสดุ
เพาะ และวัสดุเพาะเสริม มีความเกี่ยวข้องกันกับผลผลิตของดอกเห็ด ดังนั้นหากต้องการเพิ่มผล
ผลิตเพื่อการพาณิชย์แล้วจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตดอกเห็ดต่อไปด้วย

จากการสกัดแยกสารต่อต้านมะเร็งจากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ดหมื่นปี โดยนำเส้นใย
หรือดอกเห็ดมาบดให้ละเอียด และสกัดด้วยน้ำร้อนติดตามด้วยการ dialysis แล้วตกตะกอน
ด้วยเอธานอล และทำให้แห้งด้วยอะซิโตนแล้ว พบว่าเส้นใยให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่า
ดอกเห็ดเล็กน้อย คือ 3.1% และ 2.9% ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Miyazaki and Nishijima
(1981) ซึ่งได้สกัดแยกสารจากดอกเห็ดในวิธีที่คล้ายกันได้ประมาณ 3.4% เมื่อทำการ

วิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธี anthrone test พบว่าสารสกัดขยายจาก เส้นใยเห็ดมีปริมาณของสารคาร์โบไฮเดรตที่สูงกว่าดอกเห็ด 78% สำหรับเส้นใยและ 66.7% สำหรับดอกเห็ด สาเหตุอาจเนื่องจากเส้นใยส่วนที่สัมผัสกับอาหารเหลว PD มีประสิทธิภาพ ในการใช้กลูโคสหรือแป้งซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสูงกว่าดอกเห็ด ยิ่งไปกว่านั้นอาจมีการ สะสมคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าด้วย การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Lowry's method ในการทดลองนี้ ระดับโปรตีนที่วัดได้ในเส้นใยมีค่าต่ำกว่าค่าที่สกัดแยกได้จากดอกเห็ด คือมีค่า เพียง 6.6% ในขณะที่ดอกเห็ดมีค่าสูงถึง 18.4% Miyazaki and Nishijima (1981) สกัดแยกสารจากดอกเห็ดหมื่นปี พบว่ามีค่าโพลีแซ็กคาไรด์ สูงประมาณ 64.5% และโปรตีน ประมาณ 21.3%

ในการวิจัยเมื่อนำสารสกัดขยายจากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ดหมื่นปีมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose ชะด้วยน้ำกลั่นและ 0.1 M NaHCO₃ ได้สารประกอบ 2 กลุ่ม เมื่อนำสารกลุ่มที่ไล่ด้วยน้ำไปผ่าน Sephadex G-75 จะได้สารโพลีแซ็กคาไรด์จาก ดอกเห็ดประมาณ 10.6% จากเส้นใย 12% และเมื่อนำสารกลุ่มที่ชะด้วย 0.1 M NaHCO₃ จากคอลัมน์ DEAE-cellulose มาทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีข้างต้นจะได้ สารโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดประมาณ 37% จากเส้นใย 35% จากผลการทดลองนี้จะ เห็นได้ว่าสารโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดแยกได้ทั้งในดอกเห็ดและเส้นใยในกลุ่มหลังจะให้ปริมาณ สารที่มากกว่ากลุ่มแรกเกือบ 3 เท่า

Mizuno et al. (1985) ทดลองให้สารโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดแยกได้จาก ดอกเห็ดหมื่นปีแก่หนูด้วยวิธีการฉีดและป้อน พบว่าการให้สารโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการฉีด แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma-180 ได้สูงกว่าวิธีการป้อน โดย การฉีดใช้ปริมาณสารเพียง 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ให้ผลการยับยั้งสูงถึง 100% ในขณะที่ การป้อนใช้ปริมาณสารสูงถึง 200 มก./กก. น้ำหนักตัว แต่ให้ผลการยับยั้งเพียง 43% ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากสารโพลีแซ็กคาไรด์อาจเปลี่ยนแปลงสภาพไป เนื่องจากผลของเอนไซม์ ในระบบทางเดินอาหาร หรือถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนได้น้อย เนื่องจากเป็นสารที่มีขนาด

มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าการบ่อน้ำในปริมาณต่ำ (20 มก./กก.น้ำหนักตัว) อาจทำให้การเจริญของมะเร็งเพิ่มขึ้น

เนื่องจากการเจริญของเซลล์มะเร็งของคนที่เลี้ยงในหนู มีลักษณะและรูปแบบการเจริญเช่นเดียวกับที่พบในคน (Giovanello, 1974) ในการรักษาโรคมะเร็งนั้นจะให้ผลการรักษาที่ดี เมื่อทำการตรวจพบในระยะแรกๆ (ไพรัช เทพมงคล, 2524) ในการวิจัยนี้ได้ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกคนในหนูจนมีขนาดประมาณ 20-25 ลบ.มม. ซึ่งอยู่ในระยะเริ่มมีการเจริญแบบพหุคูณ (early log phase) ซึ่งเป็นระยะที่แน่ใจได้ว่าเซลล์มะเร็งที่ปลูกถ่ายให้แก่หนูสามารถเจริญในหนูได้ และยังคงเป็นระยะเริ่มแรกก่อนที่มะเร็งจะเจริญอย่างรวดเร็วซึ่งเหมาะที่จะทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านมะเร็ง

จากการทดลองฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี ที่มีผลต่อมะเร็งปากมดลูกโดยทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกให้แก่หนูไร่ชนซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน ปรากฏว่าขนาดของก้อนมะเร็งในหนูไร่ชนทุกกลุ่มมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่น มีการเจริญเติบโตของมะเร็งสูงกว่าในกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดแยกจากดอกเห็ดและเส้นใย เมื่อทำให้สารสกัดที่แยกได้ดอกเห็ดและเส้นใยให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยแยกโปรตีนออกอย่างสมบูรณ์ จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้สูงขึ้น

เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารที่สกัดแยกจากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ดหมื่นปี ในการต่อต้านมะเร็ง โดยหาความสัมพันธ์จากค่า %T/C และตัดสินตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา ($T/C < 75\%$) พบว่าหนูไร่ชนที่นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านมะเร็งทุกกลุ่มจะมีค่า %T/C ลดลงเรื่อยๆ โดยกลุ่มที่ได้ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด 0.5 กรัม/ก. น้ำหนักตัว ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี คือเห็นผลในวันที่ 42 หลังจากเริ่มให้สารออกฤทธิ์ ส่วนในกลุ่มอื่นๆจะเห็นผลในการยับยั้งมะเร็งได้ดี คือเห็นผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งภายใน 4-7 วัน

ใน 21 วันแรกของการทดลอง (ช่วงระยะเวลาที่ฉีดสารออกฤทธิ์) พบว่ากลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดให้ยับยั้งมะเร็งได้ดีกว่าจากเส้นใยเล็กน้อย ส่วนสารที่สกัดแยกได้จากดอกเห็ดและเส้นใยที่ทำให้ริสุทธีสูงขึ้นจะให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ใกล้เคียงกัน หลังจากหยุดฉีดสารออกฤทธิ์ให้แก่หนู พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งค่อนข้างคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดหมื่นปีทั้งจากดอกและเส้นใยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่เลี้ยงในหนูไร้ขนได้ ดังนั้นเซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (carcinoma cell) ก็น่าที่จะให้ผลได้เช่นเดียวกัน และผลการวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งของเห็ดหมื่นปีนี้ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาตั้งแต่ระยะที่เป็นเส้นใยและยังคงดำเนินต่อไปในขณะที่พัฒนาเป็นดอกเห็ดแล้ว

Lee et al., (1984) รายงานว่ามีผู้สามารถสกัดแยกสารโพลีแซ็กคาไรด์ได้จากพืชชั้นสูงหลายชนิด รวมทั้งเห็ด โไลเคน และ แบคทีเรีย ซึ่งให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดยกระตุ้นร่างกายให้สร้างกลไกป้องกันขึ้นมา Chihora et al., (1969) และ Hamuro et al., (1976) ได้รายงานไว้ในเห็ดหอมมีสาร lentinan ซึ่งเป็นสารประกอบพวกโพลีแซ็กคาไรด์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด sarcoma-180 ได้โดย lentinan (β -D -glucan) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน โดยเกี่ยวข้องกับ T-cell Takeshita et al., (1982) ตรวจหาปริมาณของ T-cell ในเลือดหนู พบว่าเมื่อหนูได้รับ lentinan จะมีผลทำให้ปริมาณ T-cell ในเลือดหนูสูง Mizuno et al., (1982) สกัดแยกสาร glucan จากเส้นใยเห็ด *G. applanatum* พบว่ามี 2 แบบ คือ β -D-glucan และ α -D-glucan แต่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma-180 ในหนูได้จะอยู่ในรูป β -D-glucan การศึกษาสารออกฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี Mizuno et al., (1984) พบว่า glucan ที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งจะอยู่ในรูป β -D-glucan ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น D-glucose, D-glucuronic

acid, D-xyloes และ D-mannose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(1-3)-link-D-glucosyl
 อากมีสาขาเป็น β -(1-6)-link-D-glucosyl มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000-
 1,050,000 ส่วน α -D-glucan ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
 การวิจัยนี้สารสกัดจากเห็ดหมื่นปีทั้งในดอกและเส้นใยสามารถยับยั้งการเจริญ
 เติบโตของมะเร็งได้ น่าจะเป็นผลมาจาก β -D-glucan ที่มีอยู่ในสารที่สกัดแยกได้ ซึ่งจะ
 ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่หนูไร้ขน โดยไปช่วยกระตุ้นให้มีการสร้าง T-lymphocyte
 หรือไปมีผลต่อการช่วยทำให้ macrophage ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ดีขึ้น สารโพลีแซ็กคาไรด์
 ที่มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันสูงก็คือ (1-3) β -D glucan โดยเฉพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆมากกว่า
 10,000 ขึ้นไป (Murayama et al., 1989) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเห็ดหมื่นปีไม่ได้มีผล
 ต่อการทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงแต่จะไม่มีผลต่อการสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่จะไปกดการแสดง
 ออกหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงไม่อาจทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*)
 ได้ในการวิจัยนี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

เมื่อทำการศึกษาน้ำหนักตัวหนูไร้ขน พบว่าน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยของหนูไร้ขนที่ฉีด
 สารออกฤทธิ์ทุกกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในช่วงท้ายของการทดลองบาง
 กลุ่มน้ำหนักตัวจะลดต่ำลง สาเหตุเนื่องมาจากหนูบางตัวในกลุ่มเกิดการติดเชื้ทางเดิน
 อาหาร หรือปอดบวม ทำให้น้ำหนักตัวลดลงอย่างมาก หรือถึงกับเสียชีวิต อย่างไรก็ตาม
 ผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต
 ของหนูที่นำมาทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเห็ดหมื่นปีจากดอกเห็ดที่สกัดแยกด้วยน้ำร้อน
 และตกตะกอนด้วยเอธานอล มีความเป็นพิษต่ำ คือต้องฉีดให้แก่มouse สูงถึง 5,000 มก./กก.
 น้ำหนักตัว จึงทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) และเมื่อทำการป้อนในปริมาณที่สูงถึง 10,000
 มก./กก. น้ำหนักตัว หนูที่ทำการทดลองสามารถทนทานได้ โดยมีอาการข้างเคียง คือท้องเดิน
 เล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการระคายเคืองของทางเดินอาหารที่ได้รับสารแปลกปลอมใน
 ปริมาณที่สูง หลังจากป้อนสารสกัดเห็ดหมื่นปีแล้ว 30 วัน ทำการฆ่าหนูตรวจสอบอวัยวะภายใน

ไม่พบอาการผิดปกติ Kim et al., (1986) ให้สารสกัดจากดอกเห็ดในปริมาณ 5,000

93

มก./กก. น้ำหนักตัว โดยทำการบ่อน้ำให้หนูทุกวันเป็นเวลา 30 วัน หนูก็ยังมีชีวิตอยู่ได้ เป็นปกติ และเมื่อตรวจสอบอวัยวะภายในของหนูก็ไม่พบความผิดปกติ

หลังจากสิ้นสุดการทดลองทำการฆ่าหนู และตรวจวิเคราะห์เซลล์มะเร็งเรื้อรังทาง histopathology พบว่ายังคงเป็นแบบ Squamous cell carcinoma ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังคงมีลักษณะเหมือนเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนไข้ และตรวจไม่พบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะภายใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย