โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	นางสาวประกายทิพย์ สมจิตต์
เลขประจำตัวนิสิต	6032126423
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นางสาวประกายทิพย์ สมจิตต์

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Effect of product from *Phellinus igniarus* formula 5 on gene expression of cervical cancer cells

Miss Prakaithip Somjit

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	ประกายทิพย์ สมจิตต์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	ประกายทิพย์ สมจิตต์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงาน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

สารสกัดจากสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบจากการศึกษาพบว่า สารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ต้านมะเร็ง และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เป็นต้น จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และผลต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิดคือ C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปครึ่งหนึ่ง (IC50) ในเซลล์ชนิด C33A และ SiHa อยู่ที่ 589.249 ± 6.54 และ 494.550 ± 15.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่ในเซลล์ไตปกติสารสกัดสูตรที่ 5 ไม่สามารถคำนวณหาค่า IC50 ได้เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีการสกัดสาร แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ไตปกติ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 มีฤทธิ์ในการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งอาจมีผลให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกถูกระบบภูมิคุ้มกันตรวจเจอและทำลายได้เพิ่มมากขึ้น โดยอาจเกี่ยวเนื่องกับการที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดที่ลดลง

คำสำคัญ: สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5, มะเร็งปากมดลูก, ยีน *IFNGR1*

Title	Effect of product from *Phellinus igniarus* formula 5 on gene expression of cervical cancer cells
Student name	Prakaithip Somjit
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pattamawadee Yanatatsaneejit
Co-advisor	Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong
Academic year	2020

Abstract

Herbal extracts that contain acacia mushroom as an element. Studies have shown that extracts of *Phellinus igniarus*. It has anti-inflammatory, anti-cancer and immunotherapy etc. The objective of this study is to investigate the effects of product from *P. igniarus* formula 5 which contained 0.8% of *P. igniarus* on cell viability, cell proliferation and expression of *IFNGR1* gene. In two cervical cancer cell line, C33A and SiHa. And normal kidney cells line, HEK293T. The results showed that effects of extracts *P. igniarus* on 50% inhibitory concentration (IC50) is concentration that causes half the cell death in cells, C33A and SiHa is 589.249 ± 6.54 and 494.550 ± 15.89 µg/mL, respectively. But in HEK293T cells line, the extract of formula 5 couldn't be calculated for IC50 due to the limitation of extraction method, showed that effects of *P. igniarus* formula 5 had more effect on the cell viability of cervical cancer cells compared to normal kidney cells. This study showed effects of product from *P. igniarus* formula 5 had the effect on decrease cell viability of cervical cancer cells decreased on the expression of *IFNGR1* may result in more cervical cancer cells being detected and destroyed by the immune system. It may be related to decreased percentage of cell viability of cervical cancer cells.

Keywords: extract from *Phellinus igniarus* formula 5, cervical cancer, *IFNGR1* gene

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ พร้อมทั้งช่วยตรวจแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอบพระคุณ คุณนันทวรรณชยา ภาจิตประพันธ์ ผู้บริหาร Nature Herbs International Holding Company Limited ที่กรุณาสนับสนุนการทำวิจัยโครงงานฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข และอาจารย์ ดร. วิชาณี แบนคีรี ที่เมตตาให้ใช้ห้องปฏิบัติการ 208 ในการสกัดสารและกรุณาให้ใช้เครื่อง Soxhlet extractor ในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาจากอุปกรณ์ที่เกิดขึ้น

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคมนุษย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบคุณ นายธนวิชญ์ แสงคีรีพัฒน์, นางสาวพิมพ์วิภา สุวรรณกาศ และ นางสาวกาญจนา เอี่ยมสมบุญ ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคนในครอบครัวบิดา มารดา และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	12
4 ผลการทดลอง	21
5 อภิปรายผลการศึกษา	34
6 สรุปผลการศึกษา	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	43
ภาคผนวก ก	44
ภาคผนวก ข	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เห็ดกระถินพิมานจากต้นไวท์เบิร์ท พบที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศจีน	4
2.2	โครงสร้างทุติยภูมิที่แยกได้จาก *Phellinus igiarus*	5
2.3	cancer-immunity cycle มีกลไกทั้งหมด 7 ขั้นตอน	6
2.4	การตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยทำงานผ่าน IFN-γ signaling pathway	10
3.1	การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet extractor	14
4.1	สารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์	21
4.2	สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์	22
4.3	เซลล์ไตปกติชนิด HEK293T	23
4.4	เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A	24
4.5	เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa	24
4.6	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A	25
4.7	กราฟเส้นตรงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A	26
4.8	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa	27
4.9	กราฟเส้นตรงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa	28
4.10	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T	29
4.11	กราฟเส้นตรงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T	29
4.12	ผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* ในเซลล์ C33A PCR cycle 30 รอบ	31
4.13	ผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* ในเซลล์ C33A PCR cycle 28 รอบ	32
5.1	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้ง 3 ชนิด	35

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค conventional PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* 18

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิค conventional PCR ของยีน *IFNGR1* 19

3.3 สภาวะในการทำเทคนิค conventional PCR ของยีน *IFNGR1* 19

4.1 น้ำหนักของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ก่อนและหลังอบ 21

4.2 น้ำหนักของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานก่อนและหลังอบ 23

4.3 ค่าความเข้มแบนซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม gelanalyzer 19.1 33

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็ง เป็นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติอย่างควบคุมไม่ได้ อีกทั้งเซลล์มะเร็งยังมีความสามารถในการหลบหลีกการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงหรือลุกลามไปตามอวัยวะต่าง ๆภายในร่างกายผ่านทางระบบไหลเวียนเลือดและระบบน้ำเหลือง หนึ่งในมะเร็งที่ร้ายแรงต่อผู้หญิง คือมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณมดลูกหรือช่องคลอด มะเร็งปากมดลูกมักจะเกิดในหญิงอายุประมาณ 50 ปี อีกทั้งผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกจำนวนมากมักเป็นผู้หญิงที่แต่งงานตั้งแต่อายุยังน้อย ตั้งครรภ์เร็ว คลอดบุตรหลายครั้ง และผู้ที่ติดเชื้อไวรัส human papillomavirus (HPV) (Lindel et al., 2007) จากการศึกษาทางสถิติของกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พบผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทยประมาณ 4,500 คนต่อปี และผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 8,000 คนต่อปี อีกทั้งโรคมะเร็งปากมดลูกจัดเป็นอันดับ 2 ของการตายด้วยโรคมะเร็งของผู้ป่วยหญิงรองจากโรคมะเร็งเต้านม (จิรประภา นาที, 2562) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งปากมดลูกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด, การฉายรังสีรักษา, เคมีบำบัด และการรักษาด้วยการแพทย์ทางเลือกโดยการใช้สมุนไพร

เห็ดกระถินพิมาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phellinus igniarus* ลักษณะทั่วไปของเห็ดกระถินพิมานมีลักษณะคล้ายเปลือกหอย ลำต้นมีสีน้ำตาล ดอกเห็ดมีลักษณะแข็งเหมือนเนื้อไม้ และไม่มีก้าน (Pleninger and Volk, 2005) สารสกัดจากสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบนั้น จากการศึกษาบทความวิจัยพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน มีความสามารถในการต้านการอักเสบ, การต้านอนุมูลอิสระ, รักษาความผิดปกติของตับ, ต้านมะเร็ง และต้านอาการแพ้ (Zhu, Kim and Chen, 2008) และเนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับและมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น (Zhu et al., 2008)

เนื่องจากมีการกล่าวอ้างสรรพคุณของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานว่าสามารถช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคอีสุกอีใส โรคงูสวัด เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเลือกยีน interferon gamma receptor 1 (*IFNGR1*) ที่จะถูกแปลรหัสได้โปรตีน IFN-γR1 โดยโปรตีน IFN-γR1 เป็นตัวรับสัญญาณของไซโตไคน์ที่มีชื่อว่า interferon gamma (IFN-γ) ซึ่งถูกสร้างจาก T helper cell (T_h1 cell) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญในการปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน โดยเมื่อมีการรุกรานเข้ามาของไวรัสหรือแอนติเจนที่ผลิตจากเซลล์มะเร็งเข้ามาในร่างกาย macrophage หรือ dendritic cells (DCs) จะกระตุ้น T_h1 cell ให้หลั่งไซโต

ไคน์เพื่อชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ให้มากำจัดไวรัส หรือเซลล์มะเร็งที่อยู่ในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาสารสกัดสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบจากบริษัทเอกชนแห่งหนึ่ง โดยสารสกัดจากสมุนไพรมีทั้งหมด 6 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีสัดส่วนของเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบในสารสกัดที่แตกต่างกัน ในการศึกษาวิจัยโครงงานนี้ได้ศึกษาสารสกัดสูตรที่ 5 โดยมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยจะศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิดคือ C33A, SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยจะทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค MTT assay และ BrdU assay อีกทั้งจะทำการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ด้วยเทคนิค conventional PCR

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และผลต่อการแสดงออกของยีน *IFNGR1*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยเปรียบเทียบกับการเจริญของเซลล์ไตปกติ

1.3.2 ค้นพบยีนที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน เพื่อนำไปศึกษาหากลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อไป

บทที่ 2
การตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกมีอัตราการเกิดโรคเป็นอันดับสองของมะเร็งในผู้หญิง โดยทุกปีจะพบผู้ป่วยรายใหม่ 8,000 คน หรือเฉลี่ยวันละ 22 คน และเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกประมาณ 4,500 คนต่อปี (จิรประภา นาที, 2562) โดยจะพบในผู้หญิงที่มีอายุอยู่ในช่วง 30-60 ปี ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกพบว่าเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการติดเชื้อไวรัส HPV รองลงมาคือ ปัจจัยภายในร่างกาย เช่น ภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง หรือพันธุกรรม เป็นต้น (Lindel et al., 2007)

2.2 วิธีการรักษามะเร็งปากมดลูก

เนื่องจากมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่มีโอกาสรักษาให้หายขาดจากโรคได้ ในปัจจุบันการรักษามะเร็งปากมดลูกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

2.2.1 การผ่าตัด (surgery)

การผ่าตัดมะเร็งปากมดลูก คือการผ่าตัดเอาเนื้อบางส่วนที่มีการติดเชื้อมะเร็งออก แต่ผลเสียจากการรักษาโดยการผ่าตัดอาจทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะข้างเคียงทำให้มีเลือดออก เกิดการติดเชื้อจากบาดแผล หรือมีอาการปวดบริเวณแผลที่ผ่าตัด (Reedy, 2019)

2.2.2 การฉายรังสีรักษา (radiotherapy)

การฉายรังสี เป็นการรักษามะเร็งเฉพาะตำแหน่งหรือการรักษามะเร็งโดยใช้รังสีที่มีพลังงานสูง ซึ่งการรักษาโดยการฉายรังสีจะขึ้นอยู่กับระยะของโรค หากผู้ป่วยเป็นมะเร็งระยะแรกจะมีโอกาสหายเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์แต่การรักษาโดยการฉายรังสี ผู้ป่วยต้องเข้ารับการฉายแสงอย่างต่ำ 25-30 ครั้ง ทำให้ผลเสียจากการรักษาโดยการฉายรังสีจะทำให้ผู้ป่วยมีแผลลอกขนาดใหญ่ และแผลที่ได้จากการรักษามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ (Lukka et.al., 2002)

2.2.3 เคมีบำบัด (chemotherapy)

เคมีบำบัด เป็นการรักษามะเร็งโดยการใช้สารเคมีที่มีผลทำลายเซลล์มะเร็ง โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดจะไปขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญลง โดยส่วนมากจะใช้วิธีการรักษามะเร็งโดยเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะที่ 3 ซึ่งเซลล์มะเร็งได้มีการลุกลามไปยังอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายแล้ว แต่ผลเสียจากการรักษาโดยเคมีบำบัดจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการผมร่วง เบื่ออาหาร ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวในร่างกายต่ำ อาจมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ การทำงานของไตลดลง เป็นต้น (cervical cancer meta-analysis collaboration, 2018)

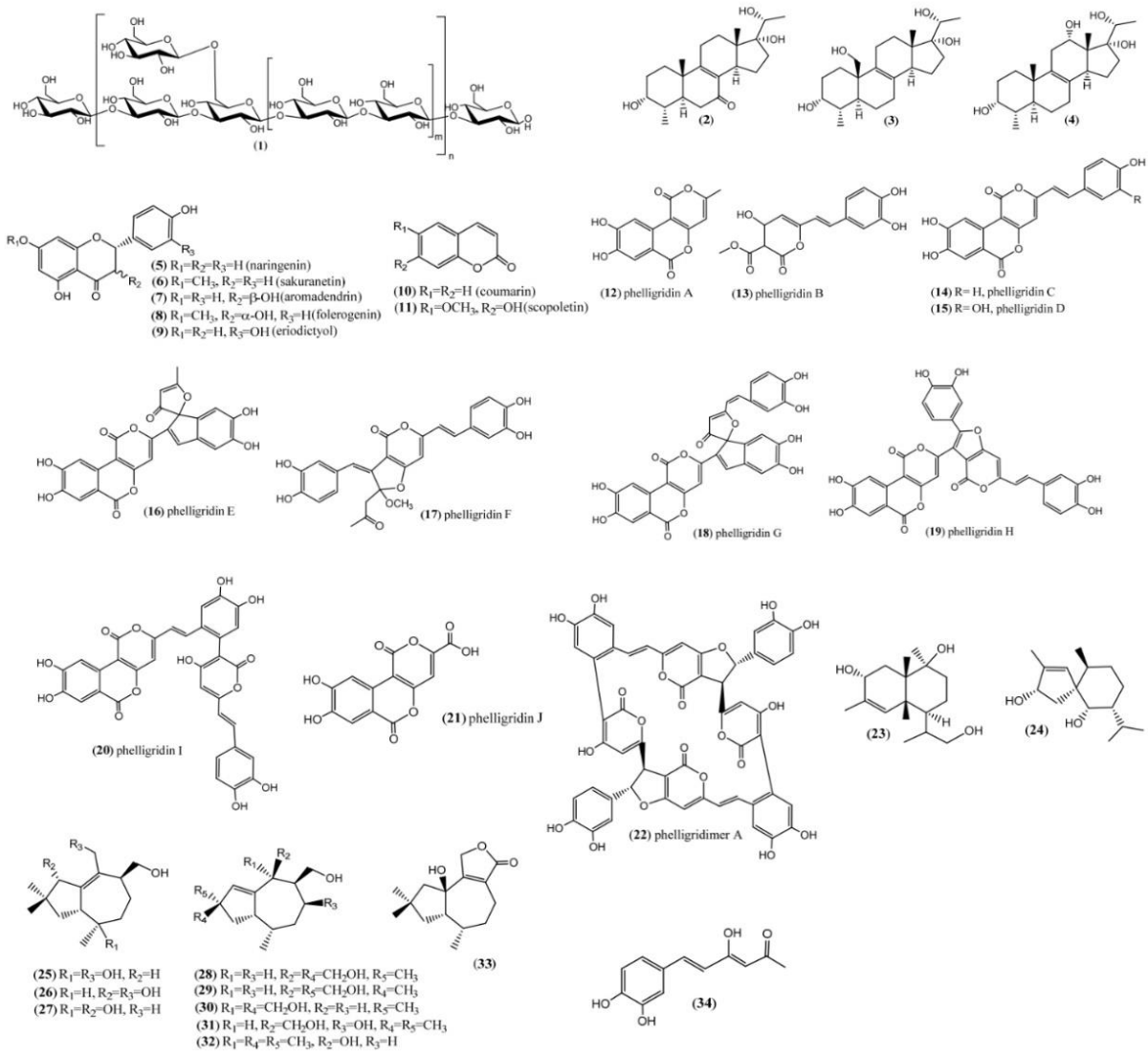
2.2.4 การรักษาอย่างตรงจุด (targeted cell therapy)

ยาสมุนไพรจีน ผลิตจากสมุนไพรและวัตถุดิบจากธรรมชาติซึ่งสมุนไพรจีนมีสรรพคุณในการบำรุงร่างกาย และฟื้นฟูอวัยวะที่บกพร่อง ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับการรักษาโรคต่าง ๆ แต่ผลเสียจากการรักษาอาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการเบื่ออาหาร และความดันโลหิตสูง (Cassileth, 2013)

2.3 เห็ดกระถินพิมาน

เห็ดกระถินพิมาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phellinus igniarus* ลักษณะทั่วไปของเห็ดกระถินพิมานดอกเห็ดจะมีลักษณะแข็งกระด้างคล้ายเนื้อไม้ มีรูปทรงคล้ายครึ่งวงกลม มักขึ้นอยู่บนต้นกระถินพิมาน (ภาพที่ 2.1) โดยสรรพคุณพื้นบ้านสามารถใช้รักษาอาการปวดหู เริม และงูสวัด จากการศึกษางานวิจัยพบว่าในสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เช่น especially β- glucan, flavonoids, coumarins, strylpyrones, steroids, macrolides และ sesquiterpenes เป็นต้น (ภาพที่ 2.2) (Zapora et al., 2016) จากการวิจัยของ Fei-Fei Wang และคณะ จาก School of Pharmacy, Anhui Medical University ประเทศจีน ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยศึกษาในหลอดทดลองซึ่งมีเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 5 ชนิด ได้แก่ HepG2 (มะเร็งตับ), AGS และ SGC-7901 (มะเร็งกระเพาะอาหาร), Hela (มะเร็งปากมดลูก) และ A549 (มะเร็งปอด) พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนในการชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งดังกล่าว และสามารถปิดการทำงานของจุดตรวจสอบที่อยู่ระหว่างรอยต่อของระยะ G_0 กับ G_1 ในวัฏจักรของเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Wang et al., 2018)

ภาพที่ 2.1 เห็ดกระถินพิมานจากต้นไวท์เบิร์ช พบที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศจีน
(ที่มา Suabjakyong, 2015)



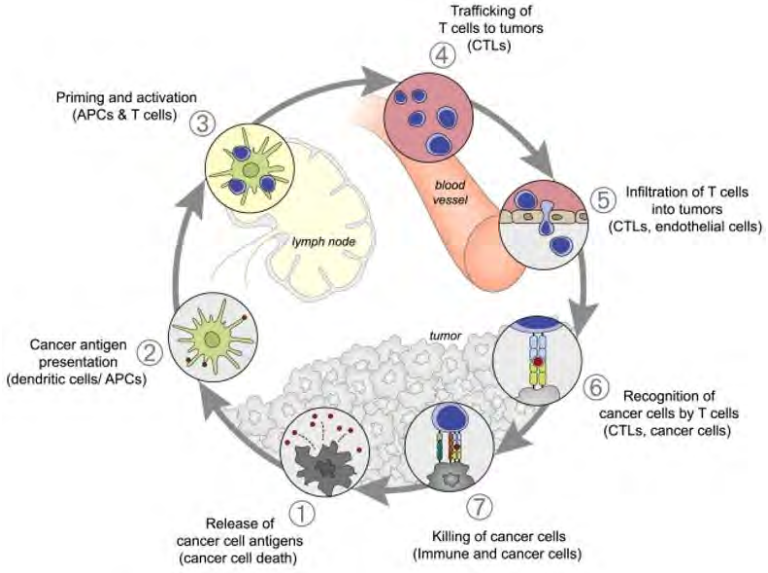
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทุติยภูมิที่แยกได้จาก *Phellinus igniarus* (1) especially β- glucan (2-4) steroids (5-9) flavonoids (10 และ 11) coumarins (12-21) styrylpyrones (22) macrolides (23-33) sesquiterpenes และ (34) hispolon (ที่มา Zapora et al., 2016)

2.4 ระบบภูมิคุ้มกันกับมะเร็ง

ระบบภูมิคุ้มกัน คือระบบที่มีกลไกการทำงานภายในร่างกาย ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันและต่อต้านอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส พยาธิ เซลล์มะเร็ง สารก่อภูมิแพ้ เป็นต้น โดยระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยระบบย่อยสองระบบได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) โดยภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดถือเป็นด่านแรกที่ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดจะมีการตอบสนองในรูปแบบเดิมกับเชื้อที่เข้ามาโดยไม่มีการจดจำต่อเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมนั้น จึงจัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อสิ่งแปลกปลอมชนิดใดชนิดหนึ่ง ตัวอย่างของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil, eosinophile, natural killer cells (NK)

และโมเลกุลที่สำคัญที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T lymphocytes คือ professional antigen presenting cells (APCs) ได้แก่ DCs และ macrophages และระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immunity) เป็นภูมิคุ้มกันที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เคยเข้ามาในเซลล์และมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในรูปแบบเดิม หรือรุนแรงและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่าเดิม จึงจัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบจำเพาะเจาะจงต่อสิ่งแปลกปลอมชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักคือ B lymphocytes และ T lymphocytes ซึ่งมีความสามารถในการสร้างการตอบสนองที่หลากหลายต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย โดยอาศัยความจำเพาะของตัวรับต่อแอนติเจน ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด และระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง จะทำงานประสานกันเมื่อพบว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาภายในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดจะเป็นด่านแรกที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม แต่หากสิ่งแปลกปลอมสามารถต่อต้านการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดได้ ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจะทำหน้าที่ต่อโดยจะพยายามกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในออกจากร่างกายด้วยกลไกต่าง ๆ ต่อไป (สาริน กิจพาณิชย์, 2562)

ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดโรคได้หลากหลายรูปแบบ เช่น โรคภูมิแพ้ตัวเอง โรคเบาหวานชนิดที่หนึ่ง รวมถึงโรคมะเร็งที่มีสาเหตุการเกิดโรคจากการมีเซลล์ปกติของร่างกายที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งทำให้เซลล์ปกติที่มีการกลายพันธุ์นั้นมีความสามารถในการหลบหลีกการทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากบริเวณรอบ ๆ เซลล์มะเร็งมีภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันทำให้เซลล์ภูมิคุ้มกันไม่สามารถเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งได้ จากการศึกษาพบว่ามีแนวคิดเกี่ยวกับกลไกที่ภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์มะเร็ง (cancer-immunity cycle) โดยผ่าน 7 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.3) (Chen and Mellman, 2013)



ภาพที่ 2.3 cancer-immunity cycle โดยมีกลไกทั้งหมด 7 ขั้นตอนดังนี้ (1) release of cancer antigen on cell surface (2) cancer antigen presentation (3) priming and activation of T cells (4) trafficking T cells to tumor (5) infiltration of T cells into tumor (6) recognition of cancer cells by T cells (7) killing of cancer cells (ที่มา Chen and Mellman, 2013)

1. การปลดปล่อยแอนติเจนบนผิวของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งจะปลดปล่อยแอนติเจนบนผิวเซลล์ จึงทำให้เกิดการกระตุ้น tumor associated macrophages (TAMs) คือ M1 macrophage ซึ่งจะมีหน้าที่ phagocytosis เซลล์มะเร็งเข้าไปภายในเซลล์ของ macrophage (Ferguson, Choi, and Green, 2011)

2. การนำเสนอแอนติเจนของเซลล์มะเร็ง

เมื่อแอนติเจนเข้ามาในเซลล์ของ macrophages หรือ DCs จะทำการย่อยแอนติเจนให้กลายเป็นโมเลกุลเพปไทด์สายสั้น ๆ และถูกนำเสนอโดยโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) ที่อยู่บนผิวเซลล์ APCs ซึ่งจะทำหน้าที่นำเสนอโมเลกุลเพปไทด์สายสั้น ๆ ของเซลล์มะเร็งต่อ T lymphocytes ต่อไป (Mellman, Coukos, and Dranoff, 2011)

3. การกระตุ้น T lymphocytes

เมื่อ macrophages หรือ DCs ย่อยแอนติเจนให้กลายเป็นโมเลกุลเพปไทด์สายสั้น ๆ แล้วจะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลือง เพื่อนำเสนอแอนติเจนต่อ naive T cell (T_h0 cell) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ T_h0 cell กลายเป็น effector T cell (plasma B cells, T_h1 cell, cytotoxic T cells (CTLs)) เพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์มะเร็งต่อไป (Franciszkiewic et al., 2012)

4. การเคลื่อนที่ของ T lymphocytes ไปยังบริเวณก้อนมะเร็ง

เมื่อ T_h0 cell ถูกกระตุ้นกลายเป็น cytotoxic T cells จะเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด เพื่อเดินทางไปยังบริเวณเซลล์มะเร็งที่มีแอนติเจนจำเพาะกับ cytotoxic T cells โดย cytotoxic T cells จะรับรู้บริเวณของเซลล์มะเร็งได้จากสาร chemokines ต่าง ๆ ที่เซลล์มะเร็งผลิตขึ้นบริเวณ tumor environment (Peng et al., 2012)

5. T lymphocytes แทรกซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดเข้าไปใกล้บริเวณเซลล์มะเร็ง

cytotoxic T cells จะจับกับโมเลกุลต่าง ๆ บนบริเวณเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดซึ่งช่วยทำให้ cytotoxic T cells เคลื่อนที่เข้าไปยังบริเวณ tumor environment ได้ (Franciszkiewic et al., 2012)

6. T lymphocytes รับรู้เซลล์มะเร็ง

เมื่อ cytotoxic T cells เข้าไปยังบริเวณ tumor environment เซลล์มะเร็งจะนำเสนอแอนติเจนผ่านโมเลกุล MHC ต่อ T cell receptor (TCR) ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ cytotoxic T cells โดยจะจับกันอย่างจำเพาะ (Mellman, Coukos, and Dranoff, 2011)

7. การฆ่าเซลล์มะเร็ง

หลังจาก TCR จับกับแอนติเจนของเซลล์มะเร็งที่นำเสนอผ่านโมเลกุล MHC ส่งผลกระตุ้น cytotoxic T cells ให้ปล่อย cytotoxic granules ออกมาเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็ง เมื่อเซลล์มะเร็งตายจะปล่อยโมเลกุล damage associated molecular patterns (DAMPs) ซึ่ง APCs สามารถรับรู้โมเลกุล DAMPs ได้จึงกลับเข้าสู่ขั้นตอนการปลดปล่อยแอนติเจนบนผิวของเซลล์มะเร็ง เกิดเป็นวัฏจักรกลไกที่ภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์มะเร็งต่อไป (Mellman, Coukos, and Dranoff, 2011)

2.5 ไซโตไคน์ (cytokines)

ไซโตไคน์ เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ ที่เป็นภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immune response) ถูกสร้างภายในเซลล์ภูมิคุ้มกันและหลั่งออกนอกเซลล์ภูมิคุ้มกัน ไซโตไคน์มีครึ่งชีวิตที่สั้น กล่าวคือเมื่อมีการหลั่งไซโตไคน์ออกมานอกเซลล์ภูมิคุ้มกัน ไซโตไคน์จะอยู่ภายในร่างกายได้ในเวลาไม่นาน โดยธรรมชาติไซโตไคน์จะทำงานโดยจับกันอย่างจำเพาะกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ของเซลล์รับสัญญาณที่จำเพาะกับชนิดของไซโตไคน์ซึ่งการทำงานของไซโตไคน์มี 2 รูปแบบ คือ ทำงานออกฤทธิ์เฉพาะตำแหน่ง ไม่เคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งอื่น และทำงานทั้งระบบคือเมื่อมีการหลั่งไซโตไคน์ ไซโตไคน์จะส่งสัญญาณไปให้เซลล์ต่าง ๆ ทำให้เซลล์รับสัญญาณสามารถทำงานหรือตอบสนองต่อไวรัสได้ทั้งระบบ อีกทั้งไซโตไคน์หนึ่งชนิดอาจถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิดและสามารถออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ได้หลายชนิดด้วยเช่นกัน (pleiotropic), ไซโตไคน์หนึ่งชนิดมีฤทธิ์มากมาย ฤทธิ์บางอย่างอาจไปซ้ำซ้อนกับฤทธิ์ของไซโตไคน์ชนิดอื่นได้ (redundant), ไซโตไคน์อาจมีฤทธิ์ต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันที่เป็นเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์นั้น (autocrine action), ไซโตไคน์อาจมีฤทธิ์ต่อเซลล์ข้างเคียง (paracrine action) หรือเมื่อไซโตไคน์ถูกหลั่งออกนอกเซลล์ภูมิคุ้มกันจะเข้าสู่กระแสเลือดไปออกฤทธิ์ต่อเซลล์รับสัญญาณที่อยู่ไกลจากเซลล์ภูมิคุ้มกันที่สร้างไซโตไคน์ (endocrine action) เนื่องจากไซโตไคน์จะทำงานได้ต้องไปจับอย่างจำเพาะกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์รับสัญญาณ ซึ่งระดับการแสดงออกของตัวรับสัญญาณจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์รับสัญญาณจะตอบสนองต่อไซโตไคน์มากหรือน้อยเพียงใด โดยไซโตไคน์จะเป็นโมเลกุลที่ไปควบคุมให้ตัวรับสัญญาณที่จำเพาะต่อไซโตไคน์นั้น ๆ ปรากฏตัวบนผิวเซลล์รับสัญญาณ (วาสนา ศิริรังษี, 2541)

การทำงานของไซโตไคน์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1 ไซโตไคน์ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสื่อสารและโมเลกุลที่ทำหน้าที่ควบคุมของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ในระบบนี้ไซโตไคน์ถูกหลั่งจาก macrophage ที่ตรวจพบและเข้าไปจับกับเชื้อที่เข้ามาในร่างกาย และยังได้รับการกระตุ้นจาก T lymphocytes จากระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังให้หลั่งไซโตไคน์ได้ด้วยเช่นกัน โดยเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดจะมีสภาวะต้านไวรัสภายในเซลล์ การถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์จึงทำให้ไปเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุล MHC class I บนผิวเซลล์ของ APCs และกระตุ้น NK cells ให้ทำงานซึ่งมีหน้าที่ในการฆ่าเซลล์ที่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส (Keenan, Burke and Van Allen, 2019)

2 ไซโตไคน์ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสื่อสารและโมเลกุลที่ทำหน้าที่ควบคุมของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง ในระบบนี้ไซโตไคน์ถูกหลั่งจาก Th1 cell, NK cells และ cytotoxic T cells โดยไซโตไคน์จะไปกระตุ้น macrophage ให้เพิ่มการแสดงออกของโมเลกุล MHC class I และ MHC class II บนผิวเซลล์ของ APCs หรืออาจกล่าวได้ว่าไซโตไคน์จะทำหน้าที่ควบคุมการเจริญ คือไปเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ หรือลดการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ได้ (Keenan, Burke and Van Allen, 2019)

3 ไซโตไคน์ทำหน้าที่กระตุ้นระบบสร้างเลือด (hematopoiesis) ในระบบนี้ไซโตไคน์ถูกหลั่งจากเซลล์จากไขกระดูกในชั้น stromal โดยไซโตไคน์จะไปกระตุ้นการแบ่งเซลล์และควบคุมกระบวนการเปลี่ยนสภาพของ naive whine blood cells (Keenan, Burke and Van Allen, 2019)

2.6 อินเตอร์เฟียรอน (interferon)

อินเตอร์เฟียรอน (Interferon หรือ IFN) ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1957 โดย Isaacs และ Lindenmann จัดเป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณชักนำให้เซลล์อื่น ๆ ข้างเคียงตอบสนองต่อไวรัสที่รุกรานเข้ามาภายในเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน อินเตอร์เฟียรอนมีโครงสร้างเป็นไกลโคโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้นหลังจากภูมิคุ้มกันตรวจพบการติดเชื้อไวรัสภายในร่างกาย หรือจากการถูกกระตุ้นด้วยสารบางชนิด อินเตอร์เฟียรอนที่ถูกขับออกนอกเซลล์หนึ่งจะสามารถชักนำให้เซลล์อื่น ๆ ข้างเคียงให้มีการสร้างโปรตีนกลุ่มที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของไวรัสที่เข้ามาภายในเซลล์นั้น ๆ ได้โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส อินเตอร์เฟียรอนจึงมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสที่เข้ามาภายในร่างกาย (Bernabei et al., 2001)

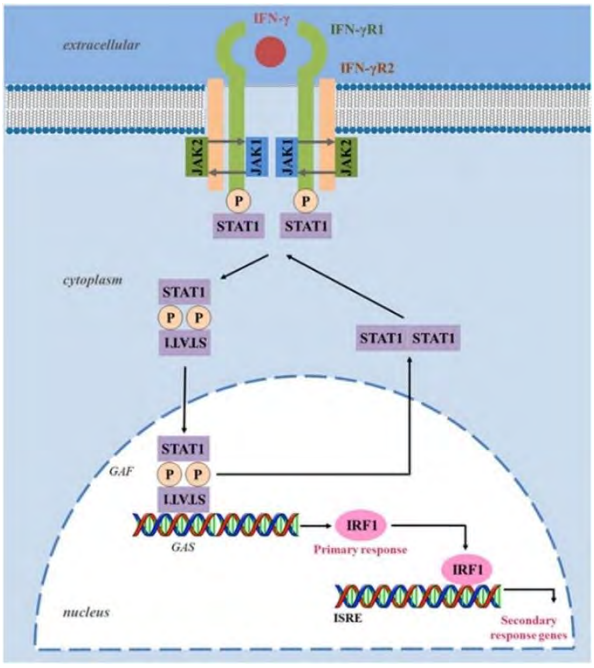
อินเตอร์เฟียรอน แบ่งประเภทตามชนิดของตัวรับ โดยอินเตอร์เฟียรอนที่พบในมนุษย์แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ interferon type I, interferon type II (IFN-γ) ซึ่งอินเตอร์เฟียรอนแต่ละประเภทมีความสำคัญในการตอบสนองต่อไวรัสและควบคุมสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันดังนี้

1 อินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 1 ในกลุ่มนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบอินเตอร์เฟียรอน 2 ชนิดที่มีการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด คือ interferon alpha (IFN-α) ถูกสร้างจาก macrophages โดยมีแอนติเจนของเซลล์ไวรัสมากระตุ้นให้ macrophages หลั่ง IFN-α ที่มีหน้าที่ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดจะมีสภาวะต้านไวรัสภายในเซลล์ การถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์จึงทำให้ไปเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุล MHC class I บนผิวเซลล์ของ APCs และกระตุ้น NK cells ให้ทำงานซึ่งมีหน้าที่ในการฆ่าเซลล์ที่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส และ interferon beta (IFN-β) ถูกสร้างจากเซลล์เส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อบุผิว โดยมีแอนติเจนของเซลล์ไวรัสมากระตุ้นให้เซลล์เส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวหลั่ง IFN-β ที่มีหน้าที่เหมือนกับ IFN-α ในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด

2 อินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 2 หรือ interferon gamma (IFN-γ) ถูกหลั่งจาก Th1 cell, NK cells และ cytotoxic T cells โดย IFN-γ จะไปกระตุ้น macrophage ให้เพิ่มการแสดงออกของโมเลกุล MHC class I และ MHC class II บนผิวเซลล์ของ APCs และ IFN-γ ยังทำหน้าที่ควบคุมการเจริญ คือไปเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆหรือลดการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆได้ (Keenan, Burke and Van Allen, 2019)

2.7 Interferon gamma receptor 1 (IFN-γR1)

ยีน *IFNGR1* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของมนุษย์ตำแหน่งบนแขนข้างยาว region ที่ 3 band ที่ 2 sub-band ที่ 3 (6q23.3) เมื่อถูกแปลรหัสได้โปรตีน IFN-γR1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่บนผิวเซลล์ของเซลล์ ที่สามารถจับกันอย่างจำเพาะกับไซโตไคน์ชนิด IFN-γ ในสภาวะปกติที่เซลล์ภายในร่างกายไม่ถูกรุกราน IFN-γR1 จะอยู่บนผิวเซลล์แบบ monomer คู่กับโปรตีนตัวรับอีกชนิดหนึ่งคือ interferon gamma receptor 2 (IFN-γR2) หากมีการเคลื่อนที่ของ IFN-γ เข้ามาที่บริเวณผิวเซลล์ตัวรับสัญญาณที่มี IFN-γR1 และ IFN-γR2 โมเลกุลของ IFN-γ จะกระตุ้นให้ IFN-γR1 และ IFN-γR2 ที่อยู่บนผิวเซลล์แบบ monomer เคลื่อนที่เข้ามาประกอบกันเป็นโครงสร้างแบบ heterodimer (IFN-γR1/2) (ภาพที่ 2.4) ทำให้สามารถเข้าไปจับกับ IFN-γ ได้อย่างจำเพาะ (Bernabei et al., 2001) ถ้า IFN-γ เข้ามาจับกับตัวรับสัญญาณ (IFN-γR1/2) ที่อยู่บนผิวเซลล์มะเร็ง IFN-γ จะชักนำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านเส้นทาง JAK / STAT ทำให้เกิดกลไกการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อ IFN-γ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและชักนำการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (Majoros et al., 2017) Wenwen Gao และคณะ จาก Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University ประเทศจีน ได้ศึกษาผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานต่อการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของ IFN-γ โดยตรวจระดับของ IFN-γ จากซีรัมในหนูที่มีเนื้องอก พบว่าระดับของ IFN-γ เพิ่มขึ้นหลังจากที่หนูที่มีเนื้องอกได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน เทียบกับหนูที่มีเนื้องอกที่ได้รับน้ำเกลือ (Gao et al., 2017) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสามารถช่วยเพิ่มการแสดงออกของ IFN-γ ให้ทำงาน รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของ IFN-γR1 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์มะเร็งให้แสดงออก IFN-γ จึงจะทำงานได้และเห็นการเพิ่มขึ้นของ IFN-γ หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน



ภาพที่ 2.4 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยทำงานผ่าน IFN-γ signaling pathway (เส้นทาง JAK / STAT) (ที่มา Castro et al., 2018)

การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ศึกษาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยใช้เทคนิค BrdU assay และการแสดงออกของยีน *IFNGR1* หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค conventional PCR

2.8 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

2.8.1 เทคนิค MTT assay

เทคนิค MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับความมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยมีหลักการคือเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียได้ซึ่งจะสามารถเปลี่ยนเป็นสาร MTT ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 540-570 นาโนเมตร โดยถ้าเป็นเซลล์ที่ตายแล้วจะเสียสภาพการสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase จึงไม่สามารถเปลี่ยนสาร MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ดังนั้นจึงสามารถวัดการมีชีวิตของเซลล์ได้ด้วยวิธี MTT assay (Sylvester, 2011)

2.8.2 เทคนิค BrdU assay

เทคนิค BrdU assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่ง 5 bromo 2 deoxyuridine (BrdU) เป็นอนุพันธ์ของ thymine จะเข้าไปแทนที่เบส thymine ในดีเอ็นเอในช่วง cell cycle ในระยะ S phase ดังนั้นจึงสามารถใช้สาร BrdU วัดระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ (Crane and Bhattacharya, 2013)

2.8.3 เทคนิค conventional PCR

เทคนิค conventional PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและสามารถนำสารละลายจากปฏิกิริยามาตรวจสอบผล PCR product ซึ่งอาจตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยย้อม PCR product ด้วยสาร ethidium bromide จากนั้นจึงตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV (Celi, Zenilman and Shuldiner, 1993)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์กลับหัว สำหรับส่องเซลล์ (Inverted microscope)

ขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 (Corning, USA)

จานเลี้ยงเซลล์ 24 well plate และ 96 well plate (Corning, USA)

ฟิลเตอร์กรองอาหารขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Corning, USA)

สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) (BOECO, Germany)

ตู้สำหรับอบแห้งอุณหภูมิ 60 องศา

ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)

ตู้เย็น 4 องศา

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศา

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศา

เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, United States)

เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclaved)

เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop 2000c) (Thermo Fisher Scientific, USA)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (Dynex, USA)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (NanoDrop 200 Spectrophotometer) (Thermo Fisher Scientific, USA)

เครื่องถ่ายภาพเจล (BluPAD Dual LED Blue / White Light Transilluminator) (BIO-HELIX, Taiwan)

เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส (Bio-Rad, USA)

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (ProFlex PCR system) (Thermo Fisher Scientific, USA)

เครื่องไมโครเวฟ

เครื่อง Soxhlet extractor

เครื่อง freeze dry

เซโรโลจิคัลปิเปตต์ (serological pipette) ขนาด 2 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร, 25 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด P20 (2-20 ไมโครลิตร), ขนาด P200 (20-200 ไมโครลิตร), ขนาด P1000 (100-1000 ไมโครลิตร)

ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip) ขนาด 10 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร, 1000 ไมโครลิตร

3.2 สารเคมีที่ใช้

3.2.1 ผงจากเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เนเจอร์ เฮิร์บ อินเตอร์เนชั่น โฮลดิ้ง จำกัด

3.2.2 ผงจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เนเจอร์ เฮิร์บ อินเตอร์เนชั่น โฮลดิ้ง จำกัด

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

0.05% Trypsin-EDTA (1X) (GIBCO, USA)

Antibiotic-Antimycotic (100X) (GIBCO, USA)

Complete DMEM (cDMEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, USA)

Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, USA)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO, USA)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay

0.4% trypan blue stain (GIBCO, USA)

Cisplatin (Sigma-Aldrich, US)

dimethyl sulfoxide (DMSO) (EMPLURA, USA)

methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, US)

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *IFNGR1*

2-Propanol (Supelco, US)

100 bp DNA Ladder (PROMEGA, USA)

cDNA Synthesis Kit (biotechrabbit, Germany)

Ethanol (EMSURE, US)

kit cDNA Synthesis Kit (biotechrabbit, Germany)

LE Agarose (GeneMate LE, USA)

Molecular Biology Grade Water (HyClone, USA)

Phenol: Chlorofrom: Isoamyl Alcohol (Sigma-Aldrich, US)

RedSafe™ (safe nucleic acid staining solution) (iNtRON, USA)

TRLzol Reagent (Life Technologies, USA)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การสกัดสารจากผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5

เตรียมผงจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก 10 กรัมอบให้แห้งที่ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor (ภาพที่ 3.1) โดยมีตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) 200 มิลลิลิตร : ผงจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 น้ำหนัก 4 กรัมต่อหนึ่งรอบ โดยสกัดทั้งหมด 2 รอบ รอบละ 3 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศา

เตรียมผงจากเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก 10 กรัมอบให้แห้งที่ตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยมีตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) 200 มิลลิลิตร : ผงจากเห็ดกระถินพิมาน น้ำหนัก 4 กรัมต่อหนึ่งรอบ โดยสกัดทั้งหมด 2 รอบ รอบละ 3 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศา

ภาพที่ 3.1 การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

3.3.2 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T

3.3.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (cDMEM)

เตรียม Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) แบบผงให้เป็นสารละลาย DMEM โดยมีน้ำบริสุทธิ์สูง (organically free pure water) เป็นตัวทำละลายและใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นตัวปรับ pH ให้สารละลาย DMEM เท่ากับ 7.2 หลังจากนั้นเติม Fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์และ antibiotic-antimycotic 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารทั้งหมดที่ต้องการเตรียม เก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศา

3.3.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.3.2.2.1 นำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และ SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลงในจานเพาะเลี้ยง Cell tissue culture dish เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตรเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete DMEM (cDMEM))

3.3.2.2.2 ใส่ cDMEM ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร

3.3.2.2.3 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน

3.3.2.2.4 รอจนเซลล์มีลักษณะเรียงตัวเป็นชั้นเดียว หนาแน่นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดในจานเพาะเลี้ยงเซลล์จึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้เข้าสู่ขั้นตอนการ Subculture เซลล์ต่อไป

3.3.2.3 การ Subculture เซลล์

3.3.2.3.1 เตรียม T25 flask สำหรับเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปิเปตดูด cDMEM ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงใน T25 flask ที่เตรียมไว้

3.3.2.3.2 นำ T25 flask เก่าที่มีเซลล์โตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดใน T25 flask นำมาดูดอาหารเก่าออก

3.3.2.3.3 ล้างภายใน T25 flask ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรปิดฝา T25 flask และกลั้ว T25 flask เล็กน้อยก่อนดูด PBS ทิ้ง

3.3.2.3.4 เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ Trypsin-EDTA (1X) (GIBCO, USA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน T25 flask กลั้วเพื่อให้ Trypsin สัมผัสกับเซลล์ให้ได้มากที่สุด

3.3.2.3.5 ทิ้งไว้ในตู้ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 นาที

3.3.2.3.6 นำเซลล์ออกจากตู้ Incubator จากนั้นเคาะเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้น T25 flask ให้หลุดออกมาให้มากที่สุดและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว สำหรับส่องเซลล์ (Inverted microscope)

3.3.2.3.7 หยุดปฏิกิริยาของ Trypsin-EDTA ด้วย cDMEM ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

3.3.2.3.8 ดูดเซลล์ทั้งหมด ประมาณ 100 ไมโครลิตรถึง 200 ไมโครลิตร ลงใน T25 flask ที่เตรียมไว้ (ในข้อ 3.3.2.3.1) วน T25 flask เพื่อให้เซลล์กระจายตัวให้ทั่ว

3.3.2.3.9 เลี้ยงไว้ที่ตู้ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

3.3.3 ทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัด ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค MTT assay (Sylvester, 2011) (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

ในการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay ใช้เวลาในการทดสอบเป็นระยะเวลา 3 วัน ดังนี้

วันที่ 1 ย้ายเซลล์จาก T25 flask ลงใน 96 well plate

ทำการนับจำนวนเซลล์จากอาหารที่มีเซลล์เจริญอยู่ใน T25 flask โดยใช้ Hemocytometer (นับ 5 ช่อง; บนซ้าย, ล่างซ้าย, กลาง, บนขวา, ล่างขวา) นับจำนวนเซลล์เพื่อต้องการกำหนดให้ในแต่ละหลุมของ 96 well plate มีเซลล์อยู่ประมาณ 6,000 เซลล์ต่อ 200 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม หลังจากการย้ายเซลล์ลงใน 96 well plate จำนวน 1 plate และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

วันที่ 2 นำสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ C33A, ความเข้มข้น 256.667 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ SiHa, ความเข้มข้น 226.917 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ HEK293T และยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ โดยเตรียมสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ความเข้มข้นต่าง ๆ สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานและ ยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin ที่ความเข้มข้นละ 20 ไมโครลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 180 ไมโครลิตร (ปริมาณต่อหนึ่งหลุม) ใส่ลงไปใน 96 well plate ที่ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วใส่สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานและยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็น positive control และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดสูตรต่าง ๆ เป็น negative control ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตรใน 96 well plate จำนวน 1 plate และทำการปิด plate และทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

*หมายเหตุ การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 แต่ละความเข้มข้นใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และความเข้มข้นของเห็ดกระถินพิมานสกัด ได้จากการคำนวณค่า 50% Inhibitory Concentration (IC50)

วันที่ 3 ทำการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไตปกติด้วยเทคนิค MTT assay ใน 96 well plate เพื่อดูการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T หลังจากเซลล์ได้รับการเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานและยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin โดยการเติม methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, US) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) (EMPLURA, USA) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (Dynex, USA) ที่ค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.3.4 ทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัดต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค BrdU assay (Crane and Bhattacharya, 2013)
(ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

ในการทดสอบด้วยเทคนิค BrdU assay ใช้เวลาในการทดสอบเป็นระยะเวลา 3 วัน ดังนี้

วันที่ 1 ย้ายเซลล์จาก T25 flask ลงใน 96 well plate

ทำการนับจำนวนเซลล์จากอาหารที่มีเซลล์เจริญอยู่ใน T25 flask โดยใช้ Hemocytometer (นับ 5 ช่อง; บนซ้าย, ล่างซ้าย, กลาง, บนขวา, ล่างขวา) นับจำนวนเซลล์เพื่อต้องการกำหนดให้ในแต่ละหลุมของ 96 well plate มีเซลล์อยู่ประมาณ 6,000 เซลล์ต่อ 200 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม หลังจากการย้ายเซลล์ลงใน 96 well plate จำนวน 1 plate และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

วันที่ 2 นำสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 589.249 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ C33A, 494.550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ SiHa, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ HEK293T สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ C33A, ความเข้มข้น 256.667 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ SiHa, ความเข้มข้น 226.917 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ HEK293T และยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ โดยเตรียมสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานและยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin ที่ความเข้มข้นละ 20 ไมโครลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 180 ไมโครลิตร (ปริมาณต่อหนึ่งหลุม) ใส่ลงไปใน 96 well plate ที่ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วใส่สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณหาค่า IC50, สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานและ ยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็น positive control และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดสูตรต่าง ๆเป็น negative control ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร ใน 96 well plate จำนวน 1 plate และทำการปิด plate และทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

*หมายเหตุ การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 แต่ละความเข้มข้นใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และความเข้มข้นของเห็ดกระถินพิมานสกัดได้จากการคำนวณค่า 50% Inhibitory Concentration (IC50)

วันที่ 3 ทำการวัดอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไตปกติด้วยเทคนิค BrdU assay ใน 96 well plate เพื่อดูอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T หลังจากเซลล์ได้รับการเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณหาค่า IC50 ในแต่ละเซลล์, สารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณหาค่า IC50 ในแต่ละเซลล์และยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin โดยเติม 10 ไมโครโมลาร์ BrdU 20 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติม Anti-BrdU-POD 100 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (Dynex, USA) ที่ค่าความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเทคนิค conventional PCR (Carneiro, T.R. et al., 2013)

3.3.5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ย้ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A เลี้ยงใน 6 well plate มีเซลล์อยู่ประมาณ 150,000 เซลล์ต่อ 2,000 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 589.249 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ภายในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศา ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากครบเวลาที่กำหนดดูดเซลล์ออกเติม TRLzol Reagent (Life

Technologies, USA) ย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Chloroform และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารชั้นบนลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปราศจาก RNase เติม Absolute isopropanol เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เทสารชั้นบนตะกอนทิ้ง เติม Ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยง เทสารชั้นบนตะกอนทิ้ง รอให้ Ethanol ระเหยจนหมด ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ type I วัดค่าความเข้มข้นของอาร์เอนเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโนที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่ตู้ควบคุมความเย็น -80 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การสกัด complementary DNA (cDNA)

ใช้ชุด kit cDNA Synthesis Kit (biotechrabbit, Germany) ปริมาตร 8 ไมโครลิตรรวมกับอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 12 ไมโครลิตร (ปริมาณของอาร์เอ็นเอขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ) นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเก็บ cDNA ที่สกัดได้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.5.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ด้วยเทคนิค conventional PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *IFNGR1* ตรวจสอบในเซลล์ C33A โดยนำ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นดีเอ็นเอสายต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค conventional PCR โดยสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.2 และสภาวะที่ใช้ในการทำ conventional PCR โดยมีจำนวน PCR cycle 28 และ 30 รอบดังตารางที่ 3.3 เพื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยนางสาวประกายทิพย์ สมจิตต์ มีขนาดเท่ากับ 307 คู่เบส (ตารางที่ 3.1) และใช้ glycenraldehydes-3-phophate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene มีขนาดเท่ากับ 163 คู่เบส (ตารางที่ 3.1) ด้วยเทคนิค conventional PCR

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค conventional PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1*

ยีน	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')**
Forward *IFNGR1* primer	AATTGGACCACCTAAACTGG
Reverse *IFNGR1* primer	AGTTGTAACACCCCACACAT
Forward *GAPDH* primer	TGGAAGGACTCATGACCACAG
Reverse *GAPDH* primer	TTCAGCTCAGGGATGACCTT

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิค conventional PCR ของยีน *IFNGR1*

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1 Distilled water	-	7.0
2 10x Taq buffer + $(NH_4)_2SO_4$	1X	1.0
3 1 mM $MgCl_2$	0.4 mM	0.4
4 10 mM dNTP	2.0 mM	0.2
5 250 U HotStarTaq polymerase DNA	1X	0.1
6 25 nM Forward primer	3.75 nM	0.15
7 25 nM Reverse primer	3.75 nM	0.15
8 cDNA	-	1.0
ปริมาตรรวม		**10.0**

ตารางที่ 3.3 สภาวะในการทำเทคนิค conventional PCR ของยีน *IFNGR1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1 Initial denaturation	95	3 นาที
2 PCR cycle (28 และ 30 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	53	1 นาที
- Extension	72	1 นาที
3 Final extension	72	10 นาที
4 Holding	4	

3.3.5.4 เจลอิเล็กโทรโฟริซิส

นำ PCR product มาทดสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อตรวจสอบดูการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ได้จากการทำ conventional PCR บนแผ่น agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยใช้บัฟเฟอร์ TBE เป็นสารตัวกลาง และใช้เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (BIO-HELIX, Taiwan)

3.3.6 วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance และ student's t-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติหลังจากได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในแต่ละเซลล์ว่ามีความแตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน (negative control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และเซลล์ไตปกติหลังจากได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละความเข้มข้นเดียวกันระหว่างเซลล์ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ Independent t-test โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบผลจากการวัดค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเข้มแบนจากของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกเลี้ยงใน 3 สภาวะว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มแบนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารจากผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

สารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่สกัดได้จากเครื่อง Soxhlet extractor มีสีน้ำตาลอมเหลืองมีลักษณะเป็นสารละลายใส ดังภาพที่ 4.1 สกัดวันที่ 15 มกราคม 2564

ภาพที่ 4.1 สารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน

ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ วัดได้เท่ากับ 6,130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ก่อนและหลังจากอบที่ตู้สำหรับอบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

บีกเกอร์	**น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)**	**น้ำหนักหลังอบ (กรัม)**	**น้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)**
1	29.379	29.446	0.067
2	28.539	28.600	0.061
3	34.054	34.110	0.056

*วันที่บันทึกผล 15 มกราคม 2564

คำนวณค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)

ค่าเฉลี่ย (กรัม) = ∑(น้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ) / 3

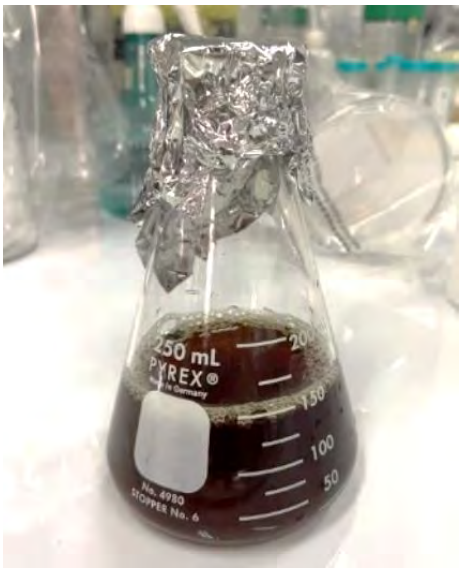
= 0.184 / 3

= 0.0613 กรัม

เปลี่ยนหน่วย กรัม เป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 (ก่อนอบ)	10	มิลลิลิตร
ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5	$0.0613 / 10 \times 10^{-6}$	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5	6,130	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่สกัดได้จากเครื่อง Soxhlet extractor มีสีน้ำตาลเข้มมีลักษณะเป็นสารละลายใส ดังภาพที่ 4.2 สกัดวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2564



ภาพที่ 4.2 สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน

ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ วัดได้เท่ากับ 2,567 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานก่อนและหลังจากอบที่ตู้สำหรับอบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

บีกเกอร์	**น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)**	**น้ำหนักหลังอบ (กรัม)**	**น้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)**
1	29.038	29.061	0.023
2	29.176	29.204	0.028
3	28.503	28.529	0.026

*วันที่บันทึกผล 16 กุมภาพันธ์ 2564

คำนวณค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)

ค่าเฉลี่ย (กรัม) = ∑(น้ำหนักหลังอบ – น้ำหนักก่อนอบ) / 3

= 0.077 / 3

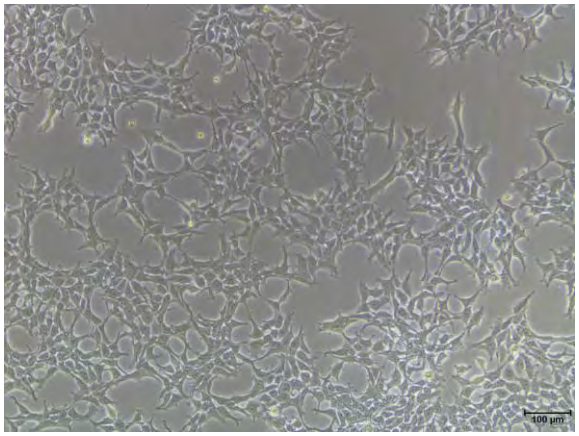
= 0.02567 กรัม

เปลี่ยนหน่วย กรัม เป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 (ก่อนอบ)	10	มิลลิลิตร
ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5	$0.02567 / 10 \times 10^{-6}$	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5	2,567	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

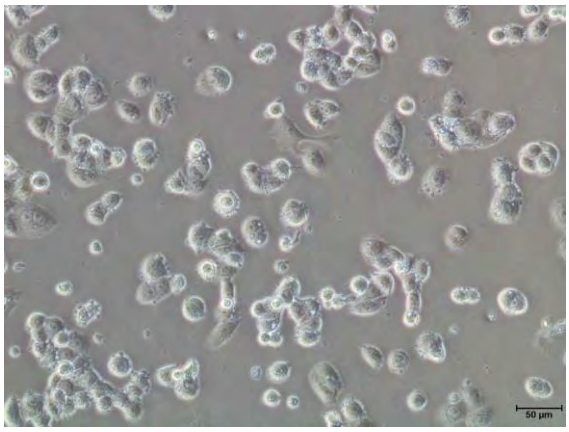
4.2 การเลี้ยงเซลล์

4.2.1 เซลล์ไตปกติชนิด HEK293T มีลักษณะเป็นหัวกระสวย ในภาพ 4.3 เซลล์โตได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใน T-25 flask



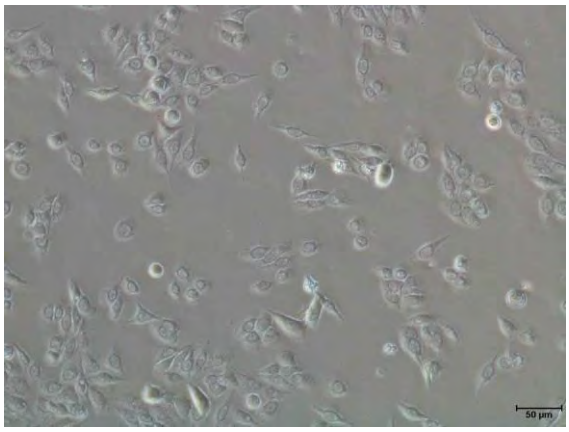
ภาพที่ 4.3 เซลล์ไตปกติชนิด HEK293T มีลักษณะของเซลล์แบบหัวกระสวย

4.2.2 เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิด C33A มีลักษณะของเซลล์แบบเรียวยาว ในภาพ 4.4 เซลล์โตได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใน T-25 flask



ภาพที่ 4.4 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มีลักษณะของเซลล์แบบเรียวยาว

4.2.3 เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิด SiHa มีลักษณะของเซลล์แบบกลมรี หัวท้ายแหลม ในภาพ 4.5 เซลล์โตได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใน T-25 flask

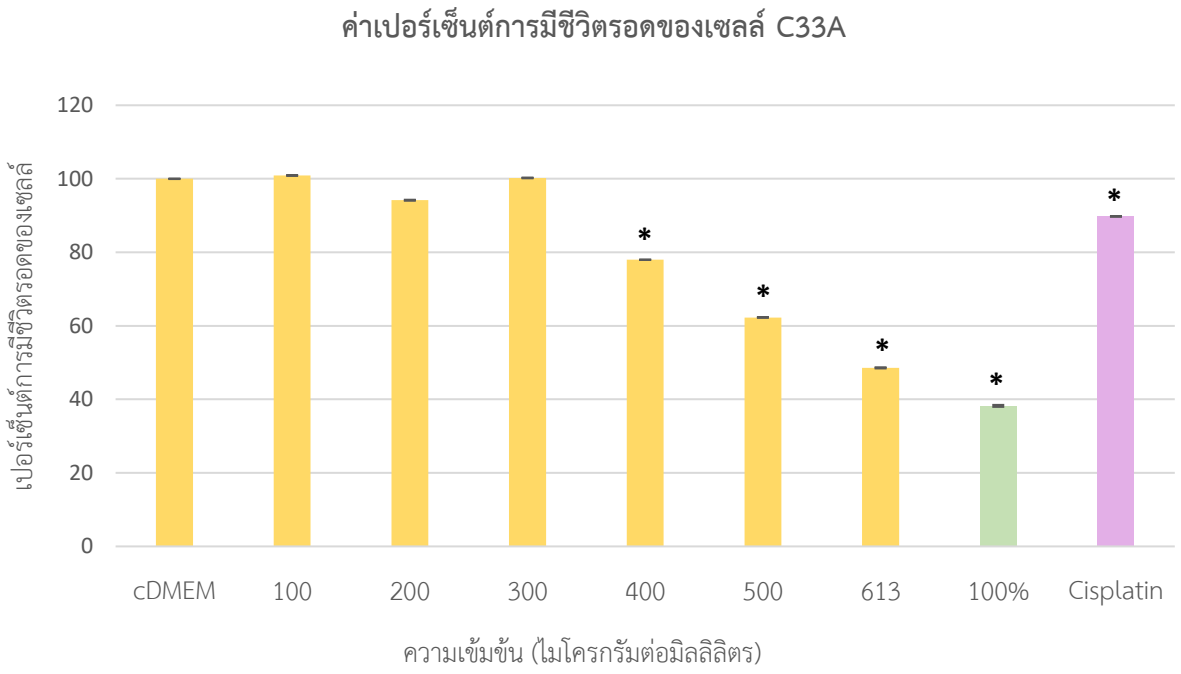


ภาพที่ 4.5 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มีลักษณะของเซลล์แบบกลมรี หัวท้ายแหลม

4.3 ผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค MTT assay

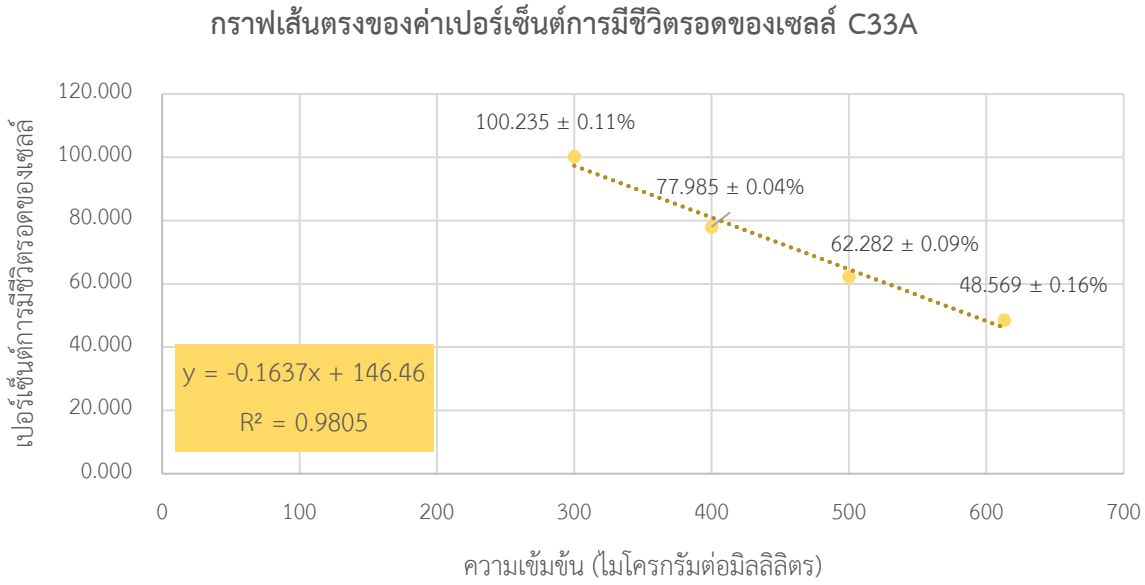
จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ด้วยสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ด้วยเทคนิค MTT assay ได้กราฟค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A ดังภาพที่ 4.6 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A มีค่า 100.902 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์, 94.167 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์, 100.235 ± 0.11 เปอร์เซ็นต์, 77.985 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์, 62.282 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์และ 48.569 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A เท่ากับ 38.223 ± 0.28 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A เท่ากับ 89.763 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A มาคำนวณหาค่า IC50 ที่คำนวณได้จากสมการของกราฟเส้นตรง y = -0.1637x + 146.46 ที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพที่ 4.7 สามารถบอกถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ทำให้เซลล์ C33A ตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ใช้ความเข้มข้นจากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 589.249 ± 6.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะพบการตายของเซลล์มะเร็งตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด



ภาพที่ 4.6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 (negative control)

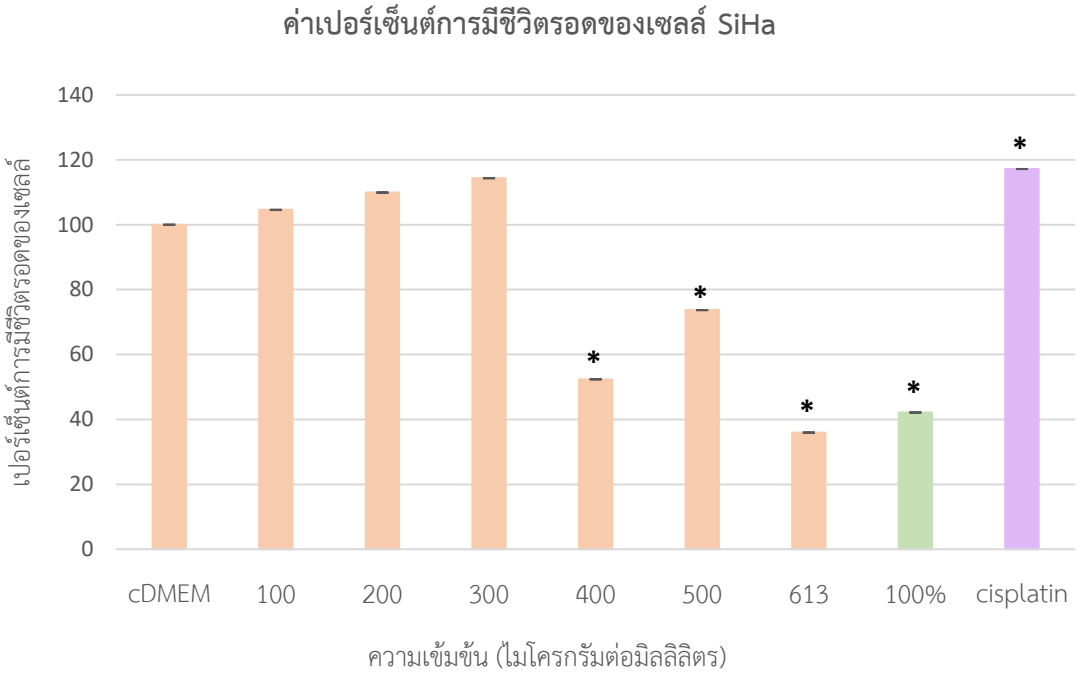
* แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *P<0.05*
หมายเหตุ: ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ได้มาจากการคำนวณค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4.7 กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A หลังจากได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ด้วยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 โดยมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ด้วยเทคนิค MTT assay ได้กราฟค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa ดังภาพที่ 4.8 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร , 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa มีค่า 104.572 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์, 109.906 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์**,** 114.315 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์, 52.347 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์, 73.674 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ และ 35.947 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับโดยเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa เท่ากับ 42.116 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ที่ได้รับยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa เท่ากับ 117.155 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa มาคำนวณหาค่า IC50 ที่คำนวณได้จากสมการของกราฟเส้นตรง y = -0.179x + 147.2 ที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพที่ 4.9 สามารถบอกถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ทำให้

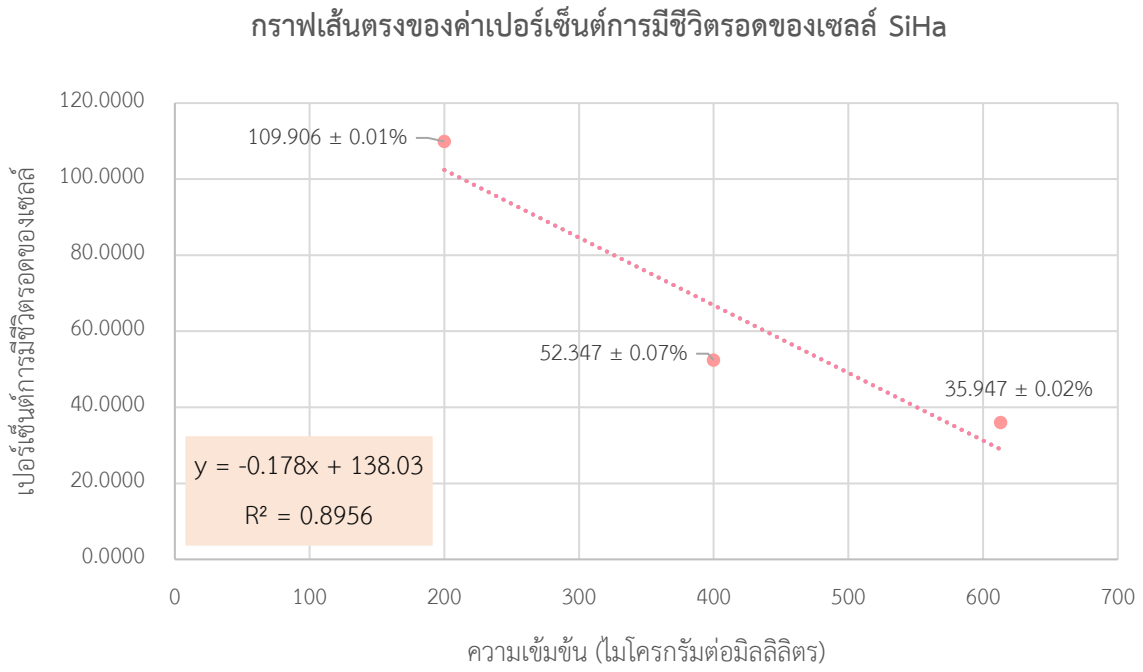
เซลล์ SiHa ตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ใช้ความเข้มข้นจากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 494.550 ± 15.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะพบการตายของเซลล์มะเร็งตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด



ภาพที่ 4.8 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 (negative control)

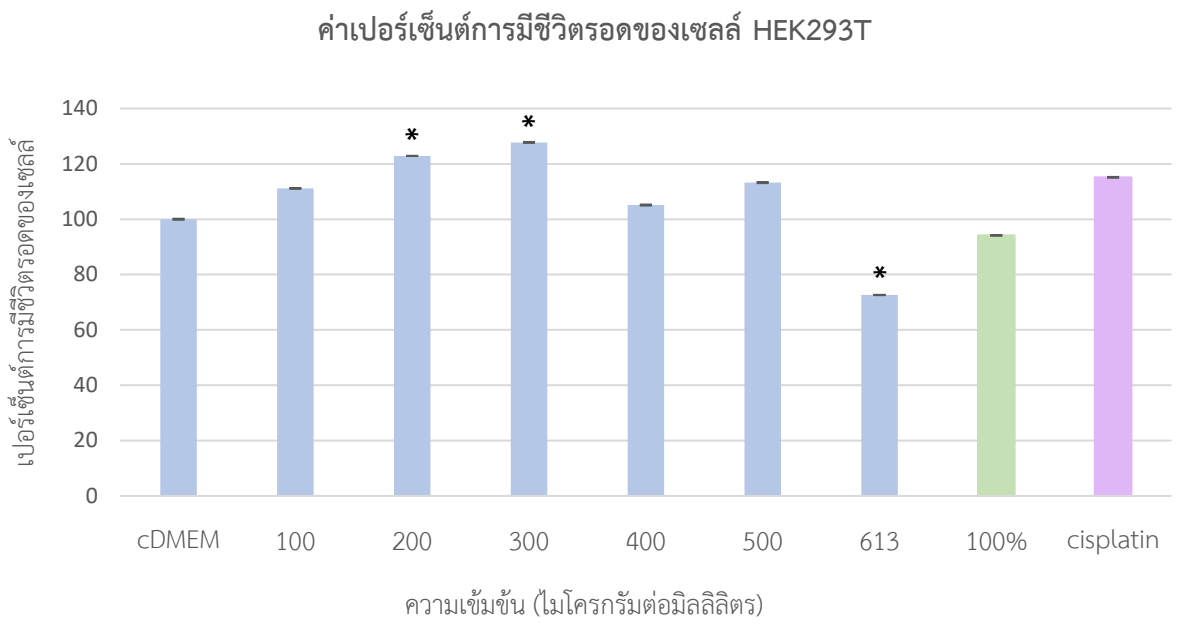
* แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$

หมายเหตุ : ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ได้มาจากการคำนวณค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4.9 กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa หลังจากได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

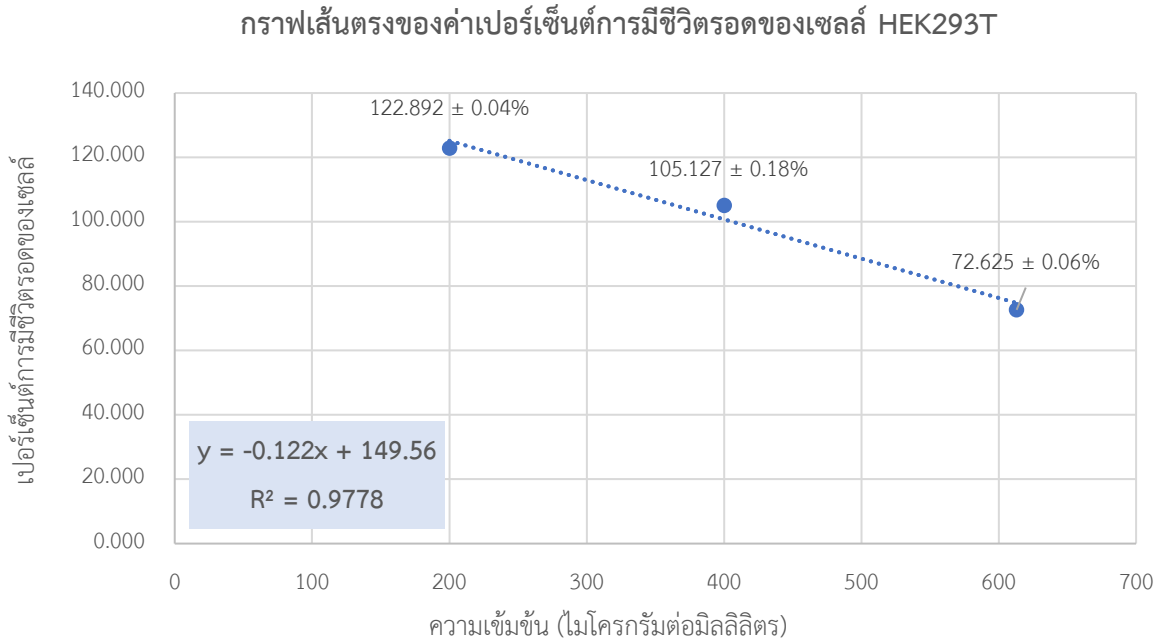
จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ไตปกติชนิด HEK 293T ด้วยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 โดยมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์วัดด้วยเทคนิค MTT assay ได้กราฟค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK 293T ดังภาพที่ 4.10 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK 293T หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T มีค่า 111.137 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์, 122.892 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์, 127.761 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์, 105.127 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์, 113.258 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์และ 72.625 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ HEK293T ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 94.160 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A ที่ได้รับยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A เท่ากับ 115.139 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ แต่จากสมการของกราฟเส้นตรง $y = -0.122x + 149.56$ ที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพที่ 4.11 ไม่สามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ทำให้เซลล์ HEK293T ตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด



ภาพที่ 4.10 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไตปกติชนิด HEK 293T หลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ HEK 293T ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 (negative control)

* แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *P<0.05*

หมายเหตุ: ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ได้มาจากการคำนวณค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



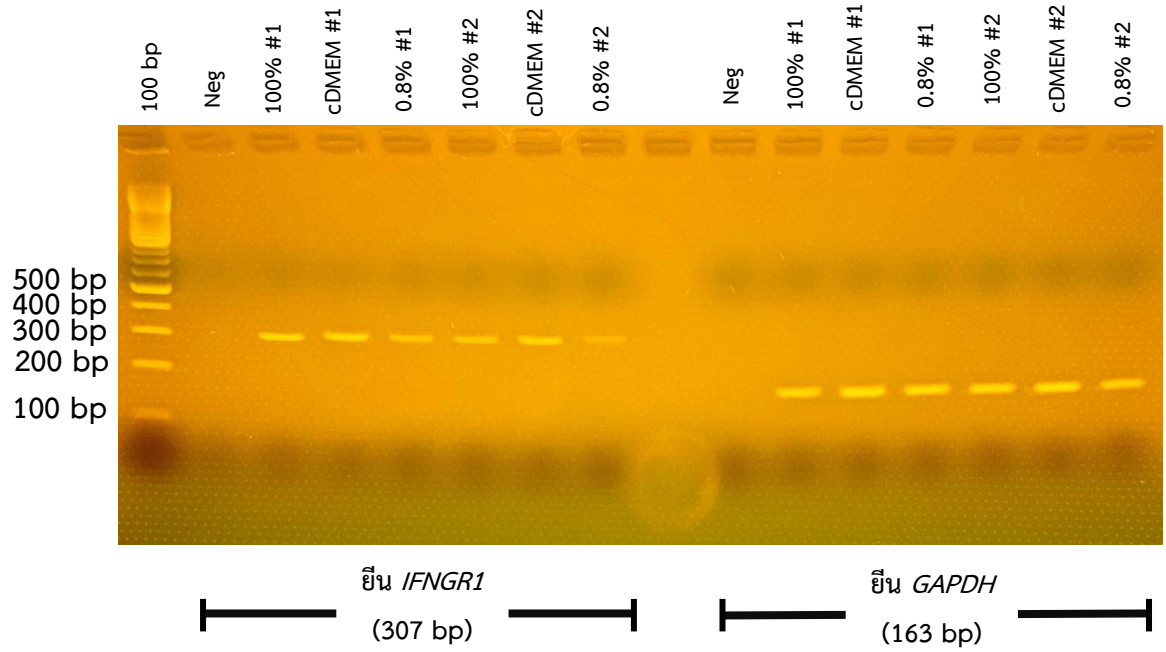
ภาพที่ 4.11 กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T หลังจากได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.4 ผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัด ต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค BrdU assay

เนื่องจากปัญหาการขนส่งสารเคมีที่จำเป็นต่อการทดลองด้วยเทคนิค BrdU assay มีการขนส่งที่ล่าช้า จึงทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัด ต่ออัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค BrdU assay ได้ทันในระยะเวลาที่กำหนด

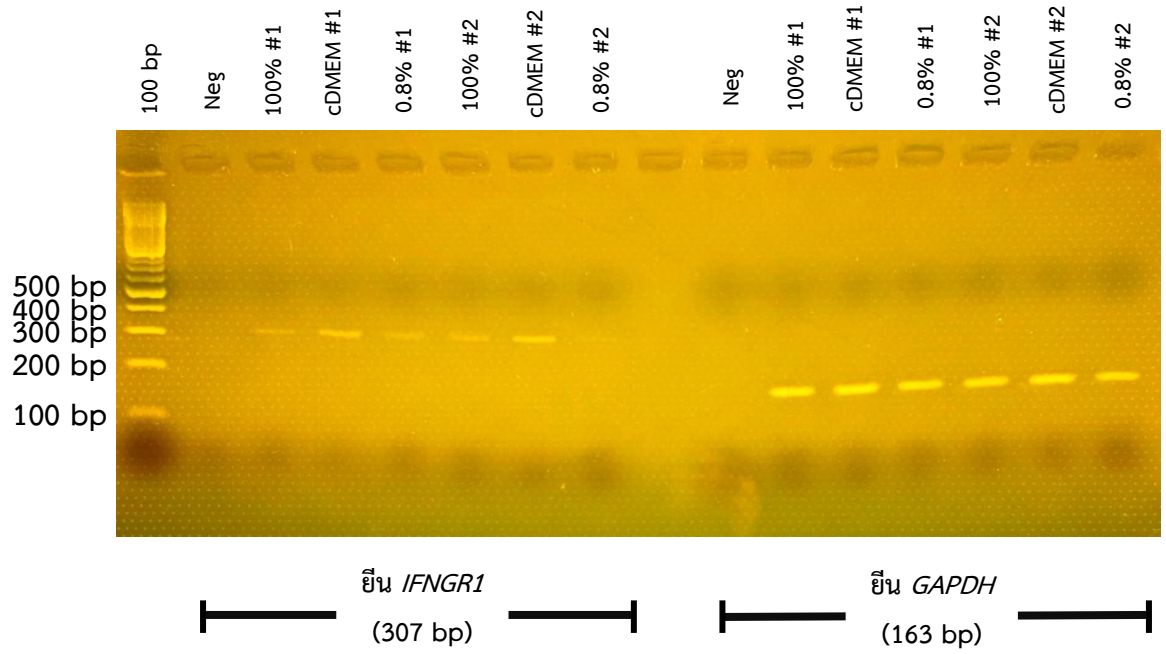
4.5 ผลการวัดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเทคนิค conventional PCR

ผลจากการสกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA เพื่อดูการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยความเข้มข้นของสารสกัดสูตรที่ 5 ที่ใส่สำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด C33A มีค่าเท่ากับ 589.249 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค conventional PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *IFNGR1* แล้วนำ PCR product มาผ่านเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจสอบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 นี้มีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* หรือไม่ ซึ่งพบว่า เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติมีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์มีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* น้อยที่สุดดังภาพที่ 4.12 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5



ภาพที่ 4.12 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเทคนิค conventional PCR ซึ่งมีจำนวน PCR cycle 30 รอบโดย 100bp คือ 100 bp DNA Ladder, 100% #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1, 100% #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ซ้ำที่ 2, cDMEM #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ซ้ำที่ 1, cDMEM #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ซ้ำที่ 2, 0.8% #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ซ้ำที่ 1, 0.8% #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ซ้ำที่ 2

จากภาพที่ 4.12 เพื่อให้เห็นถึงความแตกต่างของความเข้มแบนได้มากขึ้นทางผู้วิจัยจึงได้ลดจำนวน PCR cycle ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในเทคนิค conventional PCR ลดลงเป็น 28 รอบ จึงทำให้เห็นถึงความแตกต่างของความเข้มแบนได้ชัดขึ้นดังภาพที่ 4.13 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *GAPDH* จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเทคนิค conventional PCR ซึ่งมีจำนวน PCR cycle 28 รอบโดย 100bp คือ 100 bp DNA Ladder, 100% #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1, 100% #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2, cDMEM #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ซ้ำที่ 1, cDMEM #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ซ้ำที่ 2, 0.8% #1 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ซ้ำที่ 1, 0.8% #2 คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ซ้ำที่ 2

จากภาพที่ 4.13 จะเห็นถึงความแตกต่างของความเข้มแบนได้ชัดเจนคือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ C33A ที่เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์มีความเข้มแบนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ C33A ที่เลี้ยงในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อยืนยันผลของความเข้มแบนที่ได้จากการทำเจลอิเล็กโทรโฟริซิส จึงได้ทำการวิเคราะห์ความเข้มแบนด้วยโปรแกรม gelanalyzer 19.1 โดยมีค่าความเข้มแบนที่ได้แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มแบนซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม gelanalyzer 19.1

	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเข้มแบน		
	cDMEM ± SD	**100% ± SD**	**0.8% ± SD**
PCR cycle (30 รอบ)	3.729 ± 0.42*	3.274 ± 0.11*	2.800 ± 0.28*
PCR cycle (28 รอบ)	3.383 ± 0.15*	2.668 ± 0.16*	2.308 ± 0.59*

หมายเหตุ: **P<0.05*, โดย cDMEM คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, 100% คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และ 0.8% คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง และสรุปผล

5.1 การสกัดสารจากผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5

การสกัดสารจากผงจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ด้วยเครื่อง Soxhlet extractor พบความผิดพลาดที่เกิดจากน้ำแข็งที่เข้าไปติดที่บริเวณเครื่องปั๊มน้ำ จึงส่งผลทำให้อุณหภูมิในส่วนของ condenser tube เพิ่มขึ้น (ปกติส่วนนี้จะต้องมีอุณหภูมิที่เย็น) จึงทำให้ไม่สามารถสกัดสารต่อไปไม่ได้ในครั้งนี้ เพราะหากนำสารสกัดที่ได้จากการกลั่นในครั้งนี้ไปทำการทดลองต่อในขั้นตอนถัดไปอาจส่งผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้งสามชนิดคือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ผิดพลาดได้ อาจพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์จะมีมากขึ้นเนื่องจากความไม่เหมาะสมของอุณหภูมิอาจส่งผลต่อสารสำคัญบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานไม่ถูกสกัดออกมา จึงต้องแก้ไขโดยการยกเลิกการสกัดและเริ่มการสกัดสารใหม่ในวันถัดไป โดยผลที่ได้จากการสกัดใหม่สารสกัดมีสีน้ำตาลอมเหลือง มีลักษณะเป็นสารละลายใส วัดความเข้มข้นได้ 6,130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

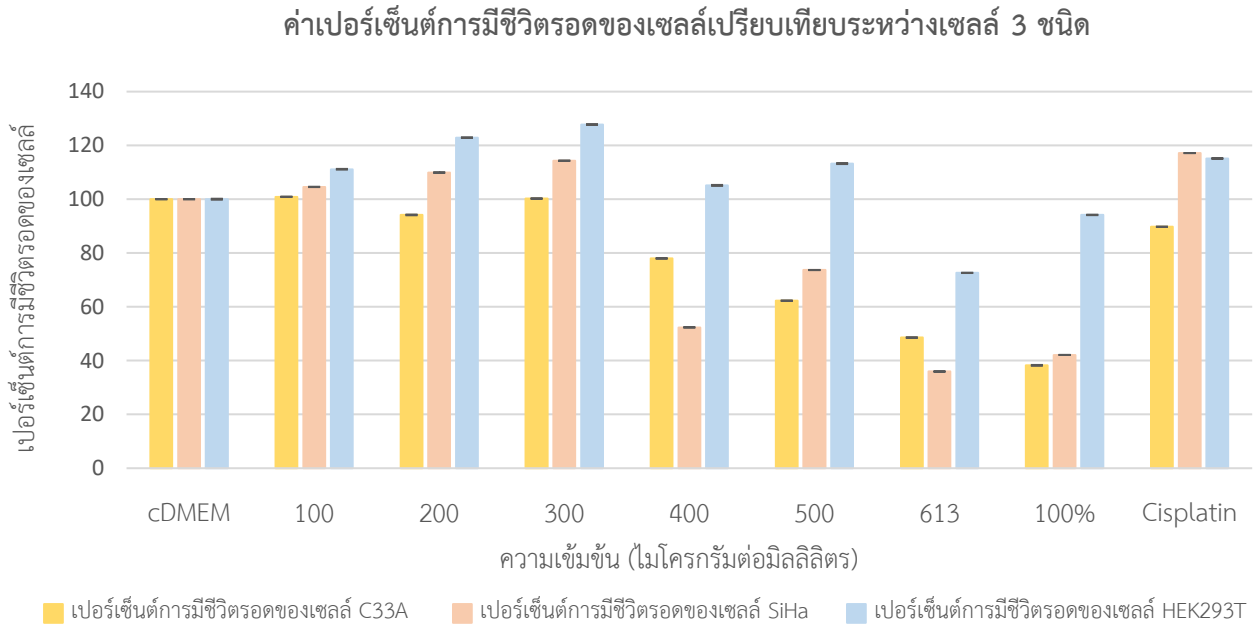
5.2 การเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์ HEK293T โดยเซลล์ลักษณะเป็นหัวกระสวย และมีระยะเวลาการเติบโตอยู่ที่ 3-4 วัน ในการทดลองเลี้ยงเซลล์ครั้งแรกพบว่ามีการปนเปื้อนของสปอร์ของราใน T25 flask สังเกตได้จากระยะการเติบโตของเซลล์ช้ากว่าปกติ กล่าวคือเซลล์ใช้เวลาในการเจริญประมาณ 5-6 วันจากเวลาปกติ อาจสันนิษฐานได้ว่าเซลล์ที่เลี้ยงไว้มีการปนเปื้อนจึงต้องทิ้งเซลล์ทั้งหมดที่คาดว่าปนเปื้อนสปอร์ราทิ้งและรอเซลล์ใหม่ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคมนุษย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทยเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ทำให้การทดลองเกิดความล่าช้า และในกรณีตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) ที่มีการปนเปื้อนของสปอร์รา แก้ไขโดยทำการอบฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์ด้วยฟอร์มาลีน

5.3 สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัด ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค MTT assay

จากผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ด้วยเทคนิค MTT assay จึงนำค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ที่ความเข้มข้นเดียวกันในทุก ๆ ความเข้มข้น ดังภาพที่ 5.1 พบว่าเซลล์ C33A และ SiHa มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าเซลล์ HEK293T ที่ทุก ๆ ความ

เข้มข้นของสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *P<0.05*



ภาพที่ 5.1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ทั้ง 3 ชนิดหลังจากได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้รับสารสกัดเห็นกระถินพิมานและยาเคมีบำบัดสูตร cisplatin เป็น positive control และเซลล์ทั้งสองชนิดที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็น negative control เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ C33A, 256.667 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์ SiHa เปรียบเทียบกับ negative control มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *P<0.05* และเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ที่เปรียบเทียบกับ negative control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ C33A, SiHa ที่ถูกเลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับ negative control ดังภาพที่ 4.6 และ 4.8 ตามลำดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *P<0.05* แต่เซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับ negative control ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นอาจบ่งบอกได้ว่าสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A, SiHa มากกว่าเซลล์ไตปกติ แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดที่มีเห็ด

กระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ ที่อาจมีส่วนในการชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง (Wang et al., 2018) เนื่องจากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เช่น especially β- glucan, flavonoids, coumarins, strylpyrones, steroids, macrolides และ sesquiterpenes เป็นต้น ที่มีส่วนช่วยในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (Zapora et al., 2016) จากการศึกษาวิจัยของ Yu Dong และคณะ พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SMMC7721 และ BGC823 เมื่อได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SMMC7721 และ BGC823 ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (Dong et al., 2019)

5.4 สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 และเห็ดกระถินพิมานสกัดต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค BrdU assay

เนื่องด้วยปัญหาการขนส่งสารเคมีที่จำเป็นสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค BrdU assay ที่ล่าช้าทางผู้วิจัยจึงได้วางแผนการทดลองเพื่อทดสอบดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากที่ได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิค MTT assay ที่เวลาหลังจากเซลล์ถูกเลี้ยงในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็นเวลา 48, 54 และ 56 ชั่วโมงเพื่อดูแนวโน้มการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยผลการทดลองตามแผนการทดลองที่วางไว้ข้างต้นที่ผู้วิจัยคาดว่าจะพบหลังจากเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะพบการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยที่สุด รองลงมาคือเซลล์ที่ถูกเลี้ยงเป็นเวลา 54 และ 56 ชั่วโมงตามลำดับ และจึงทำการเปรียบเทียบการชีวิตรอดของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดโดยพบว่าเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T มีการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่เวลา 56 ชั่วโมงมากที่สุด รองลงมาคือเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ตามลำดับ แต่เนื่องด้วยปัญหาขัดข้องด้านอิเล็กทรอนิกส์ของเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (Dynex, USA) ซึ่งอยู่ในระหว่างการส่งซ่อม ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากที่ได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิค BrdU assay ได้

5.5 การวัดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ด้วยเทคนิค conventional PCR

จากตารางที่ 4.3 บอกได้ว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความเข้มแบนหรือการแสดงออกของยีน *IFNGR1* น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดสูตรที่ 5 ที่มีเห็ดกระถินพิมานอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์มีผลไปลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* จากการศึกษาของ Nannan และคณะจาก

The First Hospital of China Medical University ประเทศจีน ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ IFN-γ และ tumor necrosis factor (TNF)-α ในมะเร็งต่อมไทรอยด์ 3 ชนิดคือ TPC-1, BCPAP และ K1 ต่อการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของ epithelial-mesenchymal transition (EMT) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของก้อนมะเร็งและความสามารถของเซลล์มะเร็งในการหลบหลีกการตรวจจับของภูมิคุ้มกัน โดยเขาพบว่า IFN-γ และ TNF-α มีผลไปเพิ่มการรุกราน เพิ่มการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้ง 3 ชนิด ผลจากการศึกษาของ Nannan และคณะ บ่งบอกว่า IFN-γ และ TNF-α ไปมีผลส่งเสริมการแสดงออกของ EMT ทำให้เซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้ง 3 ชนิดสามารถแพร่กระจาย และลุกลามไปยังบริเวณอื่นได้มากขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถในการหลบหลีกการตรวจจับของภูมิคุ้มกัน (LV et al., 2015) กล่าวได้ว่าเมื่อ IFN-γ ทำงานร่วมกับ TNF-α จะส่งผลทำให้ไปมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจากการศึกษาบทความวิจัยของ Nannan และคณะ อาจช่วยอธิบายได้ว่าถ้าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ IFN-γ อยู่จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกัน จึงเอื้อต่อการทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโต สอดคล้องกับการศึกษาในโครงงานฉบับนี้ คือ cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกเลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* น้อยลง ส่งผลให้ IFN-γ เข้าสู่เซลล์มะเร็งได้น้อยลง จึงทำให้เซลล์มะเร็งหลบหลีกภูมิคุ้มกันได้น้อยลง เพิ่มโอกาสให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายได้เพิ่มขึ้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ไปมีผลในกลไกนี้ แต่เนื่องด้วยการเกิดมะเร็งหรือฆ่าเซลล์มะเร็งไม่ได้เป็นการยับยั้งยีนเพียงยีนเดียว ดังนั้นกลไกการยับยั้งยีน *IFNGR1* ที่เสนอไปข้างต้นอาจเป็นอีกหนึ่งกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มีเปอร์เซ็นต์การตายที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในสารสกัดซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์มีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* มากกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่เลี้ยงในสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ อาจเนื่องด้วยสารสกัดสูตรที่ 5 นอกจากมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ยังมีสมุนไพรชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย เช่น รำข้าว, ผลพิงลังกาสา, เห็ดหอม, เห็ดถังเช่าสีทอง เป็นต้น ซึ่งสมุนไพรชนิดอื่นที่กล่าวข้างต้นอาจมีผลไปช่วยส่งเสริมให้ลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ลงหรืออาจกล่าวได้ว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* น้อยกว่าสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และ SiHa และนำมาทดสอบในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 โดยมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 589.249 ± 6.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดและสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 494.550 ± 15.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด แต่สารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ที่ความเข้มข้น 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ไม่สามารถทำให้เซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ตายได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด และศึกษาการแสดงออกของยีน *IFNGR1* จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ทดสอบโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณที่จับจำเพาะกับ IFN-γ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแสดงออก 2.800 ± 0.28 ที่วัดได้จากการทำ conventional PCR ที่มีจำนวนรอบ PCR cycle 30 รอบมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และสารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากกว่าเซลล์ไตปกติ และมีผลไปลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ส่งผลให้เซลล์มะเร็งถูกระบบภูมิคุ้มกันตรวจเจอ จึงทำลายได้เพิ่มมากขึ้น จึงอาจบอกได้ว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 มีผลข้างเคียงกับเซลล์ไตปกติของร่างกายน้อย และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มากกว่า ฉะนั้นการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยการแพทย์ทางเลือกโดยการใช้สารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาในอุตสาหกรรมยาต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

จิรประภา นาที. 2562. มะเร็งปากมดลูก [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.phukethospital.com/th/healthy-articles/cervical-cancer/ [8 พฤษภาคม 2563].

วาสนา ศิริรังษี. 2541. มิติใหม่ของความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและเซลล์เจ้าบ้าน. Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences. หน้า: 60-62.

สาริน กิจพาณิชย์. 2562. Cancer immunology and cancer vaccine. มะเร็งวิวัฒน์. หน้า: 118-213.

Beck, G. and Habicht, G.S. 1996. Immunity and the invertebrates. Scientific American 275: 3-60.

Benci, J.L. et al. 2019. Opposing functions of interferon coordinate adaptive and innate immune responses to cancer immune checkpoint blockade. Cell Press 178 : 933-948.

Bernabei, P. et al. 2001. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. Journal of Leukocyte Biology 70: 950-960.

Carneiro, T.R., Peralta, H.S., Pinheiro, M.C., Oliveira, S.M., Peralta, J.M. and Bezerra, F.S. 2013. A conventional polymerase chain reaction-based method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 108: 1037–1044.

Cassileth, B.R. 2013. Herbal medicine. [online]. 2020. Available from : https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/ConditionsAndTreatments/herbal-medicine [2020, Aug 29].

Castro, F., Cardoso, A.P., Goncalves, R.M., Serre, K. and Oliveira, J.M. 2018. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. Frontiers in Immunology 9 : 1-19.

Celi, S.F., Zenilman, E.M. and Shuldiner, R.A. 1993. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. Nucleic Acids Research 21: 1047.

Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. 2008. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. Journal of Clinical Oncology 35 : 5802-5812.

Chen, S.D. and Mellman, I. 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity Cycle. Immunity 39 : 1-10.

Crane, A.M. and Bhattacharya, S.K. 2013. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation. Methods in Molecular Biology 1014 : 65-70.

Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J. and Darnell Jr, J.E. 1991. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. The EMBO Journal 4 : 927-932.

Dong, Y. et.al. 2019. A Combined Phytochemistry and Network Pharmacology Approach to Reveal the Potential Antitumor Effective Substances and Mechanism of Phellinus igniarius. Frontiers in Pharmacology 266 : 1-16.

Ferguson, A.T., Choi, J. and Green, R.D. 2011. Armed response: how dying cells influence T cell functions. Immunological Reviews 241 : 77–88.

Fotakis, G. and Timbrell, J.A. 2005. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters 160 : 171-177.

Franciszkiewic, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C. and Mami-Chouaib, F. 2012. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. American Association for Cancer Research 10 : 6325-6332.

Gao, W., Wang, W., Sun, W., Wang, M., Zhang, N. and Yu, S. 2017. Antitumor and immunomodulating activities of six Phellinus igniarius polysaccharides of different origins. PubMed Central 14 : 4627-4632.

Keenan, E.T., Burke, P.K. and Van Allen, M.E. 2019. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. Nature Medicine 25 : 389–402.

Lindel, K., Forster, A., Altermatt, H.J., Greiner, R. and Gruber, G. 2007. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: No evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. The Breast 16 : 172-177.

Lukka, R.H. et.al. 2002. Concurrent cisplatin-based chemotherapy plus radiotherapy for cervical cancer – a Meta-analysis. Clinical Oncology 14 : 203-212.

LV, N. et.al. 2015. Inflammatory mediators, tumor necrosis factor-α and interferon-γ, induce EMT in human PTC cell lines. Oncology Letters 10: 2591–2597.

Majoros, A. et al. 2017. Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: lessons from Interferons for cytokine responses. Frontiers in Immunology 10 : 8-29.

Maghni, K ., Nicolescu, O.M. and Martin, J.G. 1999. Suitability of cell metabolic colorimetric

assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU) ELISA. Journal of Immunological Methods 223 : 185-194.

Mellman, I., Coukos, G. and Dranoff, G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480–489

Motz, G.T. and Coukos, G. 2013. Deciphering and reversing tumor immune suppression. Immunity 39 : 61-73.

Muir, D., Varon, S. and Manthorpe, M. 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. Analytical Biochemistry 24 : 377-382.

Ni, L. and Lu, J. 2018. Interferon gamma in cancer immunotherapy. Cancer Medicine 9 : 4509–4516.

O'Byrne, K.J. and Dalgleish, A.G. 2001. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. British Journal of Cancer 84 : 473–483.

Peng, W. et al. 2012. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-γ Inducible chemokines. American Association for Cancer Research 10 : 1158-1187.

Pleninger, D. and Volk, T., *Phellinus igniarius*, Iqmik, used by native Americans with tobacco [ออนไลน์], 1 เมษายน 2563. แหล่งที่มา: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2005.html

Reedy, G.M. 2019. Cervical cancer. [online]. Available from : https://www.cancer.org/cancer-information-in-other-languages.html [2020, Aug 29]

Stewart, W.E. 2012. The Interferon System. 2nd edition. New York : Springer verlag,

Suabjakyong, P. 2015. Characterization and biological activities of polyphenol and polysaccharide extract from Phellinus linteus and Phellinus igniarius. SAGE journals 50 : 1890-1998.

Sylvester, P.W. 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. Methods in Molecular Biology 716 : 157-168.

Tawinwung, S. 2017. The potential of adoptive T cell therapy for cancer. Thai Journal of Pharmacology 2 : 49.

Tangwattanachuleeporn. M., Avihingsanon Y. and Hirankarn. N. 2006. Role of interferon alpha in SLE pathogenesis. Chulalongkorn Medical Journal 10 : 49–739.

Thorsson, V. et al. 2017. The immune landscape of cancer. Immunity 48 : 812-830.

Tiensiwakul P. 1985. Interferon and cancer-therapy. Chulalongkorn Medical Journal 1 : 923-934.

Wang, F.F., Shi, C., Yang, Y., Fang, Y., Sheng, L. and Li, N. 2018. Medicinal mushroom *Phellinus igniarius* induced cell apoptosis in gastric cancer SGC-7901 through a mitochondria-dependent pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy 102 : 18-25.

Yan, J.K., Pei, J.., Ma, H.L., Wang, Z.B. and Liu, Y.S. 2017. Advances in antitumor polysaccharides from *phellinus* sensu lato: Production, isolation, structure, antitumor activity, and mechanism. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 6 : 1256–1269.

Zapora, E., Wolkowycki, M., Bakier, S. and Zjawiony, K. J. 2016. *Phellinus igniarius*: A pharmacologically active polypore mushroom. SAGE journals 11 : 1043-1046.

Zhu, T., Kim, S.H. and Chen, C.Y. 2008. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. Current Medicinal Chemistry 15 : 1330–1335.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1 การเตรียม DMEM (1000 มิลลิลิตร)

1.1 เตรียมผง Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, USA) 1 ซอง เทลงขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการ autoclave

1.2 เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave 800 มิลลิลิตรลงในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตรในข้อ 1.1 และเขย่าให้เข้ากัน

1.3 ชั่งผง sodium bicarbonate ปริมาณ 3.7 มิลลิลิตรซึ่งมีสภาพความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.2

1.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

1.5 นำไปกรองด้วยเครื่องกรอง

1.6 เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ต่อไป

2 การเตรียม Complete DMEM (100 มิลลิลิตร)

2.1 เติม DMEM (ที่ได้จากข้อ 1) ปริมาตร 178 มิลลิลิตร ลงในขวด 200 มิลลิลิตร

2.2 เติม Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, USA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโต)

2.3 เติม Antibiotic-Antimycotic (100X) (GIBCO, USA) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย)

2.4 เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ต่อไป

3 การวัดความสามารถของการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค MTT assay

5.1 คำนวณปริมาณสารสกัดสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์เพื่อเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$613 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 1{,}000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 163.132 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 163.132 ไมโครลิตร

ปริมาตรของ cDMEM 836.868 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$613 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 200 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 1{,}000 \text{ ไมโครลิตร}$$

V_1 = 326.264 ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 326.264 ไมโครลิตร

ปริมาตรของ cDMEM 673.736 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 1,000 ไมโครลิตร

V_1 = 489.396 ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 489.396 ไมโครลิตร

ปริมาตรของ cDMEM 510.604 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 1,000 ไมโครลิตร

V_1 = 652.529 ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 652.529 ไมโครลิตร

ปริมาตรของ cDMEM 347.471 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 1,000 ไมโครลิตร

V_1 = 815.661 ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 815.661 ไมโครลิตร

ปริมาตรของ cDMEM 184.339 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 1,000 ไมโครลิตร

V_1 = 1,000 ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาตรสารสกัดที่ต้องใช้ 1,000 ไมโครลิตร

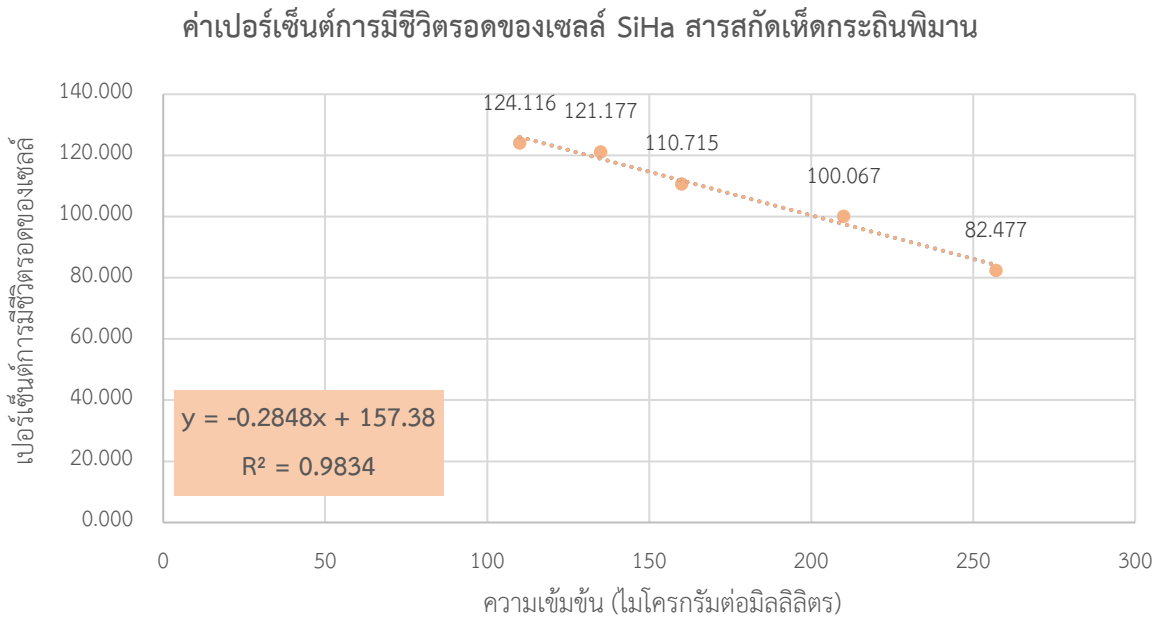
ปริมาตรของ cDMEM 0 ไมโครลิตร

5.2 การนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ Hemocytometer โดยนับเซลล์จำนวน 5 ช่อง (ซ้ายบนสุด ล่างซ้ายสุด บนขวาสุด ล่างขวาสุด กลาง)

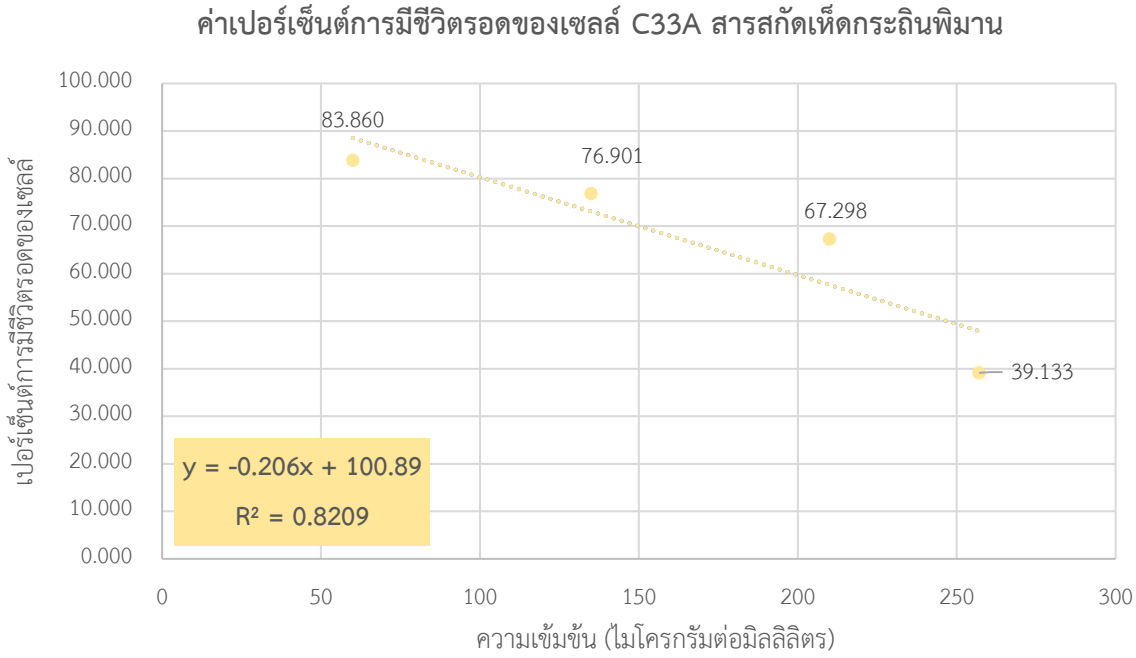
<u>สูตรการคำนวณจำนวนเซลล์</u>

จำนวนเซลล์ในสารละลาย (เซลล์/มิลลิลิตร) = (จำนวนเซลล์ที่นับได้ /5) x 10 x 2 x 10^4

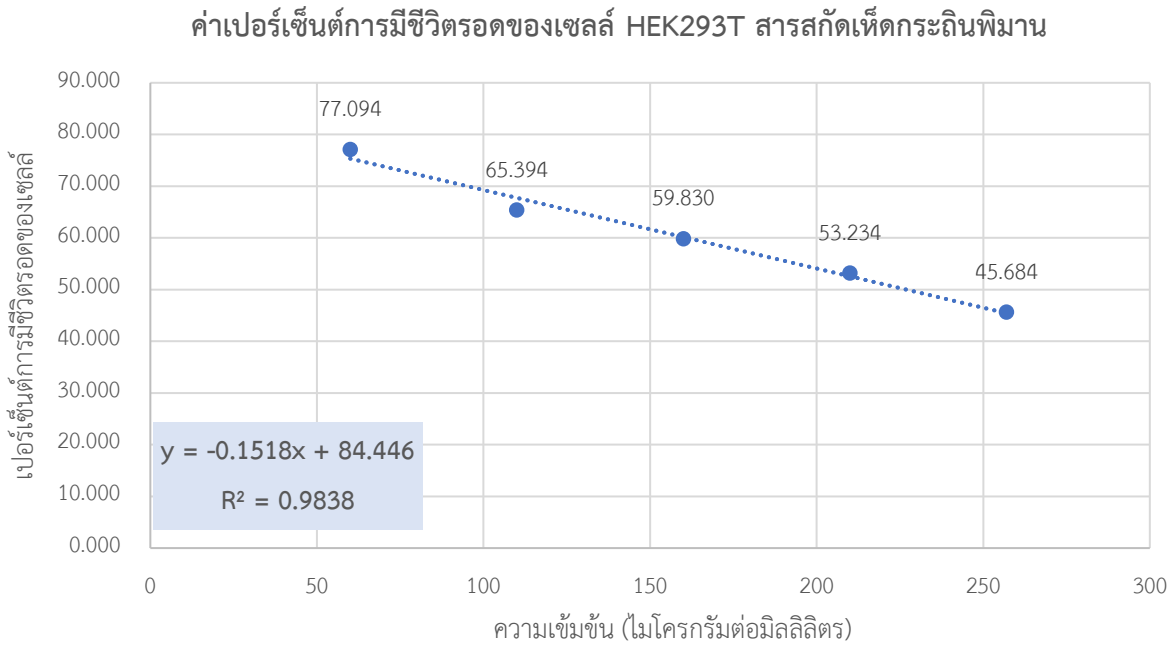
ภาคผนวก ข



กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อคำนวณหาค่า IC50 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa



กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อคำนวณหาค่า IC50 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A



กราฟเส้นตรงที่ได้จากการพล็อตจุดของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อคำนวณหาค่า IC50 ในเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T