โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

Effects of crude polysaccharide extracted from mushroom isolated in Thailand on cervical cancer cells

ชื่อนิสิต ชนิกานต์ ดาวไสว **เลขประจำตัวนิสิต** 5932108723

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นางสาวชนิกานต์ ดาวไสว

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Effects of crude polysaccharide extracted from mushroom isolated in Thailand on cervical cancer cells

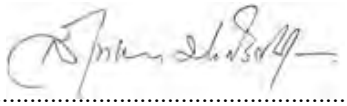
Miss Chanikan Daosawai

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 2019

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	นางสาวชนิกานต์ ดาวไสว
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2562

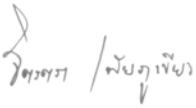
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์



.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

รัชนีกร ธรรมโชติ .....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยต่อ เซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	นางสาวชนิกานต์ ดาวไสว
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดบางชนิดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดที่คัดแยกได้ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MH2-ORG, DTM 1.1 และ CU-07 ด้วยวิธีสกัดด้วยน้ำร้อนโดยใช้ soxhlet จากนั้นวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test พบว่า MH2-ORG มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดคือ 6.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่าง CU-07 มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 2.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้ดีที่สุด โดยมีค่าการมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 40.50 % จากนั้นนำ CU-07 มาตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้

คำสำคัญ มะเร็งปากมดลูก สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด Internal Transcribed Spacer (ITS)

Title	Effects of crude polysaccharide extracted from mushroom isolated in Thailand on cervical cancer cells
Student name	Chanikan Daosawai
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
Co- Advisor	Assist. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Academic year	2019

Abstract

This research studies the biological activity of the polysaccharide crude extracts from some types of selected mushrooms in Thailand in the inhibition of the growth of cervical cancer cells by extracting the polysaccharide from mycelia of three sample selected mushrooms, namely MH2-ORG, DTM 1.1, and CU-07 by hot water extraction using Soxhlet. Then, from the measurement of the polysaccharides by anthrone method, it was found that MH2-ORG had the highest polysaccharide content of 6.55 milligrams per milliliter. Afterwards, the crude extracts were tested for biological activity against SiHa cervical cancer cells using MTT assay technique. It was found that the polysaccharide crude extracts obtained from the CU-07 sample contained polysaccharides at 2.07 milligrams per milliliter. These extracts could inhibit the SiHa cervical cancer cells best, with the viability of cells at 40.50%. The CU-07 was then examined using molecular biology techniques by DNA sequencing in the Internal Transcribed Spacer (ITS). The DNA could be extracted and the number of genes in the ITS could be amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

Keywords cervical cancer, crude polysaccharide extracted from mushroom, Internal Transcribed Spacer (ITS)

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกด้าน

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชและหน่วยปฏิบัติการ 306 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

ขอขอบพระคุณพี่ๆในห้องปฏิบัติการที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษาและการช่วยเหลือในด้านต่างๆด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณะจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	3
2.1.1 มะเร็งและสาเหตุการเกิดมะเร็ง	3
2.1.2 วิธีการรักษามะเร็งในปัจจุบัน	4
2.1.3 เห็ด	4
2.1.4 สารสกัดจากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกับการรักษามะเร็ง	5
2.1.5 พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด	5
2.1.6 กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง	5
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	
3.1 เซลล์ที่ใช้ในการวิจัย	7
3.2 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์	7
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	7
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	9
3.4.1 รวบรวมตัวอย่างเห็ด	9
3.4.2 เตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งที่คัดแยกได้ก่อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์	9
3.4.3 สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง โดยใช้น้ำร่วมกับความร้อน	9
3.4.4 หาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test	10

3.4.5 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็ง 10

3.4.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก 10

3.4.5.2 นับจำนวนเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาความหนาแน่นของเซลล์ 10
โดยใช้hemacytometer

3.4.5.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มี 10
พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

3.4.6 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วย 11
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูล 11

3.4.8 สรุปผลและเขียนรายงาน 11

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งและสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์โดย 12
ใช้น้ำร่วมกับความร้อน

4.2 ผลการหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test 13

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ 14
ต่อการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก

4.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก 14

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด 14
ต่อการมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

4.4 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วย 15
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง 16

เอกสารอ้างอิง 18

ภาคผนวก ก 22

ภาคผนวก ข 24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 3.1 ลักษณะของโคโลนีของตัวอย่างเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07	9
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดอบแห้งที่ผ่านการบดก่อนนำไปสกัดสาร A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07	12
ภาพที่ 4.2 สารสกัดหยาบจากเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดชนิดต่างๆ A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07	13
ภาพที่ 4.3 เซลล์มะเร็งชนิด SiHa ที่กำลังขยาย 20x	14
ภาพที่ 4.4 ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ	15
ภาพที่ 4.5 ผลการทำ PCR ยีน ITS จากตัวอย่าง CU-07	15
ภาพที่ ก.1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ด้วยวิธีอันโทรน	22

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบ 13

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดอันดับที่ 2 ของมะเร็งในสตรีไทย เกิดจากการที่เซลล์บริเวณปากมดลูกมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ มีการเจริญเติบโตผิดปกติและควบคุมไม่ได้ สามารถแทรกแซงเนื้อเยื่อใกล้เคียงและมีการกระจายไปสู่อวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายได้ทางหลอดเลือดและระบบน้ำเหลือง โดยมีการรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ การผ่าตัด ถ้ามะเร็งอยู่เฉพาะปากมดลูกอาจจะตัดแค่บริเวณปากมดลูก แต่ถ้ามะเร็งแพร่กระจายมากแพทย์อาจจะตัดมดลูกท่อรังไข่เว้นรังไข่รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง การให้รังสีรักษาทำได้ 2 วิธี โดยการให้รังสีรักษาจากเครื่อง แพทย์จะให้รังสีเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง การให้เคมีบำบัด โดยการให้เคมีเข้าในเลือดเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง เป็นการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อให้ภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์มะเร็งมักใช้ในการรักษามะเร็งที่ระยะแพร่กระจายไปมากแล้วหรือระยะกลับมาเป็นใหม่หรือใช้หลาย ๆ วิธีร่วมกัน แต่วิธีรักษาข้างต้นมักพบอาการข้างเคียงด้วยเสมอ เนื่องจากสารเคมีจะไปทำลายเซลล์ปกติบางส่วนด้วย จึงมีการศึกษาเพื่อหาสารใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีและมีผลข้างเคียงจากการรักษาน้อย โดยสารสกัดพอลิเซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นหนึ่งในสารที่มีการศึกษาเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยา (Jang et al., 1997; World Health Organization, 2014)

เห็ดเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เติบโตในรูปแบบของเส้นใยต่อเมื่อถึงระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะรวมตัวกันเป็นกลุ่ม เกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและสามารถพบพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้เป็นจำนวนมาก พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นพอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตที่พบได้เป็นจำนวนมากบนผนังเซลล์ (วินัย กลิ่นหอม และอุษา กลิ่นหอม, 2548; อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551; Moradali et al., 2007)

พอลิแซ็กคาไรด์สายหลักที่พบจะเป็นโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า – (1,3) [β – (1,3)] เรียกว่า กลูแคน (glucan) ซึ่งละลายน้ำได้ สำหรับชื่อเรียกของพอลิ-แซ็กคาไรด์ตัวอื่น ที่พบในเห็ดเช่น เฮทเทอโร-เบต้า-กลูแคน (hetero-β-glucans), อัลฟา-แมนโน-เบต้า-กลูแคน-คอมเพล็กซ์ (α-manno-β-glucan complexs) หรือเรียกตามชนิดของเห็ดนั้น ๆ เช่น เลนติแนน (lentinan) จาก *Lentinula edodes* เป็นต้น ต่างก็มีโครงสร้างสายหลักเป็นกลูแคนทั้งสิ้น แต่แตกต่างกันที่ชนิดของน้ำตาลที่มาต่อเป็นโซ่กิ่งที่พันธะเบต้า – (1,6) [β - (1,6)] ซึ่งส่งผลให้มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งได้ต่างกันด้วย (Mizuno, 1996, 1999; Wasser and Weis, 1999; Ikekawa, 2001)

การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูกจากเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum* (Fr).) Karst. โดยทดสอบการออกฤทธิ์ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกคนที่เจริญในหนูไมซ์ไร้ขน พบว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากทั้งเส้นใยหรือดอกเห็ดมีฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูไร้ขนสูงมาก และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้ โดยการฉีดให้แก่หนูไร้ขน พบว่าตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วันซึ่งแสดงว่าสารที่สกัดได้ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติและไม่ทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลง (ปริญญา รัตนะพิมาน, 2535)

การระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลักยังคงมีข้อจำกัดจากความแปรผันทางสัณฐานวิทยาจึงมีการจำแนกเห็ดโดยใช้สารพันธุกรรมจำเพาะที่บ่งบอกชนิดและสายพันธุ์จึงมีการศึกษาสารพันธุกรรมส่วน Internal transcribed spacer (ITS) คือบริเวณลำดับเบสที่เรียกว่า non- coding sequence โดยมีอยู่ 2 ตำแหน่ง คือ ITS1 ตั้งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และ ITS2 ตั้งอยู่ระหว่าง5.8S และ large subunit ribosomal DNA ซึ่งเป็นลำดับเบสที่สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของเห็ดได้ โดยสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกันมีการแตกแขนงออกมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจึงมีการศึกษาทางวิวัฒนาการเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ที่มีอยู่ในอดีตและความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม ในการทดลองนี้จึงเลือกศึกษาบริเวณ ITS โดยนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์ เพื่อระบุชนิดเห็ดที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และนำข้อมูลมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) เพื่อศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างเห็ดแต่ละชนิด (กมลพร ปานง่อม, สุคนธ์ทิพย์ บุญวงค์ และกุลชนา เกศสุวรรณ์, 2554; อมรรัตน์ โมฬี, 2549; Chen et al., 2016)

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 มะเร็งและสาเหตุการเกิดมะเร็ง

มะเร็งคือ โรคที่เกิดจากการเจริญของเซลล์ที่ผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมได้เหมือนเซลล์ทั่ว ๆ ไป พบในบริเวณที่ผิดปกติ ผลลัพธ์ที่ได้คือคลุ่มความผิดปกติของเซลล์ซึ่งสามารถขยายขนาดได้ไม่สิ้นสุด ชักนำให้มีเส้นเลือดมาเลี้ยงตัวเองได้ ต้านการตายของเซลล์ (apoptosis) สามารถบุกรุกเซลล์ข้างเคียงและกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกายได้ โดยสาเหตุของความผิดปกติสามารถเกิดได้จากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม (Gibbs, 2003) เนื่องจากสาเหตุเหล่านี้ทำให้สารพันธุกรรมในเซลล์เกิดความเสียหายและเกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ สามารถแบ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ ยีนก่อมะเร็ง ยีนต้านมะเร็งและยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมดีเอ็นเอภายในจีโนม ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) คือยีนที่โดยปกติมีส่วนเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์โดยทำหน้าที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์หรือเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (proto-oncogene) แต่เมื่อยีนนี้เกิดการกลายส่งผลให้เกิดเป็นยีนที่สามารถก่อมะเร็งได้ โดยส่งเสริมให้เซลล์มีวัฏจักรที่เปลี่ยนแปลงไป เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างงรวดเร็วไม่สามารถควบคุมได้ ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ในภาวะปกติยีนนี้จะทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ให้ปกติและควบคุมกระบวนการการฆ่าตัวตายของเซลล์ เมื่อเกิดการสูญเสียหน้าที่ของยีนเป็นผลมาจากการขาดของโครโมโซม การกลายหรือความผิดปกติของยีนทั้ง 2 แอลลีล ยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมดีเอ็นเอภายในจีโนม (DNA mismatch repair gene) ในภาวะปกติยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอจะซ่อมแซมดีเอ็นเอที่มีความเสียหายได้ปกติแต่ถ้ายีนซ่อมแซมเกิดความเสียหายทำให้ยีนขาดความสามารถในการซ่อมแซมยีนเช่นยีนก่อมะเร็งหรือยีนต้านมะเร็งจะส่งผลให้เซลล์นั้นสามารถเป็นเซลล์มะเร็งได้ สาเหตุของความผิดปกติที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อาหารก่อมะเร็ง เชื้อราในอาหาร อาหารปิ้ง ย่าง รมควัน สารพีเอเอช ยาฆ่าแมลง การสูบบุหรี่และดื่มสุรา รังสีเอ็กซ์และรังสีอุลตร้าไวโอเลต จากแสงแดด การติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) เป็นต้น (Daba and Ezeronye, 2003; ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต และศุภกิจ โขวุฒิธรรม, 2555)

2.1.2 วิธีการรักษามะเร็งในปัจจุบัน

1) การผ่าตัดหรือการศัลยกรรม เป็นวิธีมาตรฐานโดยการตัดเอาก้อนเนื้อหรือบริเวณที่เป็นมะเร็งออก

2) การให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) มักใช้ในกรณีที่มีความรุนแรงจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปตามท่อน้ำเหลือง ต่อมน้ำเหลือง หรืออวัยวะอื่นๆภายในร่างกาย โดยการรับประทานยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งในปริมาณที่น้อยและมีผลกระทบต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด วิธีนี้มักมีข้อเสียคือเซลล์ปกติอาจจะถูกทำลายไปบางส่วน

3) การใช้รังสีรักษา (radiotherapy) เป็นการให้รังสีไปที่บริเวณที่เป็นมะเร็งโดยตรง อาจทำการรักษาร่ามกับการผ่าตัด มันมีผลข้างเคียงคือปัสสาวะแสบขัด ผิวหนังแสบแดงเป็นต้น

4) การใช้ฮอร์โมน เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีกับเซลล์มะเร็งบางบริเวณเท่านั้น จึงไม่เป็นที่นิยมในการนำมารักษา

5) การเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย วิธีนี้เป็นการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เช่น สมุนไพร กระเทียม บอระเพ็ด สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดหลินจือ เป็นต้น วิธีนี้มักใช้ร่วมกับการทำเคมีบำบัด

6) การรักษาที่ยีนที่ทำให้เกิดมะเร็งโดยตรง เป็นวิธีที่ยากและไม่นิยมนำมาใช้เนื่องจากยังไม่เป็นที่ประสบผลสำเร็จมากนัก (Jang et al., 1997; World Health Organization, 2014)

2.1.3 เห็ด

เห็ด คือราที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าราชนิดอื่นๆ เป็นกลุ่มราที่มีเส้นใยรวมกันเกิดเป็นโครงสร้างดอก ไม่มีคอลโรฟิลด์จึงไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ จัดอยู่ใน 2 ไฟลัม คือเบซิดิโอไมโคตา (basidiomycota) และแอสโคไมโคตา (ascomycota) แต่ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัมเบซิดิโอไมโคตา วงจรชีวิตเห็ดที่เกิดขึ้นในธรรมชาติเริ่มจากสปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยเพศเรียกว่า เบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) เห็ดบางชนิดในไฟลัมแอสโคไมโคตา ซึ่งมีสปอร์ที่เกิดแบบอาศัยเพศเรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) เมื่อสปอร์เหล่านี้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะเกิดเป็นเส้นใยจากนั้นจะพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดโดยดอกเห็ดจะอยู่ได้ไม่นานแต่เส้นใยของเห็ดสามารถอยู่ได้นานหลายปีทั้งในซากพืช ซากสัตว์ ในดิน เส้นใยของดอกจะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) โดยเปลี่ยนไปทำหน้าที่สืบพันธุ์และขยายพันธุ์ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551)

2.1.4 สารสกัดจากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกับการรักษามะเร็ง

ในประเทศจีน ญี่ปุ่นและเกาหลีนิยมรับประทานอาหารที่ทำจากเห็ดเนื่องจากมีงานวิจัยที่พบว่าเห็ดมีสรรพคุณในการต้านมะเร็ง จึงมีการนำเห็ดหลายสายพันธุ์มาสกัดเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งร่วมกับการทำเคมีบำบัดเช่น เห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus blazei*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เป็นต้น พบว่าสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบได้ในเห็ดเช่น พอลิแซ็กคาไรด์สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งได้ วิตามินบีรวม วิตามินดี และสาร

อื่นๆ เช่น Pantothenic และ Lentinan ซึ่งช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย โดยที่สารสกัดจากเห็ดเหล่านี้ไม่พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในร่างกายและไม่พบผลข้างเคียงในการนำไปใช้ (Wu et al., 2012)

2.1.5 พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linker) เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างมีความซับซ้อนเนื่องจากบางครั้งเกิดพันธะโควาเลนท์กับคาร์บอนอะตอมหลายคู่ ด้วยเหตุผลนี้ทำให้น้ำตาลหนึ่งหน่วยสามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลมากกว่า 2 โมเลกุลได้ ส่งผลให้เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และแตกแขนงมาก พอลิแซ็กคาไรด์จึงเป็นโครงสร้างที่มีความหลากหลายและแปรปรวนทางโครงสร้างสูง พอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ดพบได้มาบริเวณผนังเซลล์ มีทั้งที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ ส่วนใหญ่มักเป็นกลูแคน (glucan) เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า – (1,3), (1,6) [β – (1,3), (1,6)] และพันธะเบต้า – (1,3) [β – (1,3)] แต่ส่วนมากเป็นเฮทเทอโรไกลแคน (heteroglycans) ที่สามารถมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆมาเชื่อมต่อเป็นกิ่งก้านสาขาไม่สิ้นสุดโดยการที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกันเช่น กาแลคโทส (galactose) แมนโนส (mannose) อะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) เป็นต้นมาต่อเป็นโซ่กิ่งที่พันธะเบต้า – (1,6) [β - (1,6)] ส่งผลให้มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งได้ต่างกันด้วย (Wasser, 2002) โดยกลูแคนที่มีมวลโมเลกุลมากกว่ามักมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งมากกว่ากลูแคนที่มีมวลโมเลกุลน้อย (Mizuno et al., 1996; Mizuno, 1999)

2.1.6 กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง

กลไกการทำงานของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกับเซลล์มะเร็งมีทั้งหมด 3 กลไกคือ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เพิ่มขึ้น โดยกลไกนี้พอลิแซ็กคาไรด์จะไปเพิ่มการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งกลไกนี้เป็นกลไกที่ค่อนข้างได้รับการยอมรับและสามารถพิสูจน์ได้ เช่น เลนติแนน โดยเลนติแนนจะไปกระตุ้นการทำงานของ tumor necrosis factor (TNFα), interleukin-1, interleukin-3, interferon (ITF), Natural Killer cell และ cytotoxic T lymphocytes ให้มีจำนวนมากขึ้นและเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น รูปแบบที่ 2 คือการกระตุ้นการสร้างสารบางชนิดเพื่อป้องกันการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง ส่วนกลไกที่ 3 เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยนักวิทยาศาสตร์คาดว่าบนเซลล์มะเร็งจะมีตัวรับที่จำเพาะต่อสารพอลิแซ็กคาไรด์ และเมื่อพอลิแซ็กคาไรด์ไปจับกับตัวรับทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์ แต่กลไกนี้ยังเป็นกลไกที่ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ที่ชัดเจน (Moradali et al., 2007)

มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดไปใช้ในการรักษามะเร็งชนิดต่างๆในสัตว์ทดลอง เช่น

Ikekawa (2001) มีการทำการทดลองในหนูไมซ์ โดยถ่ายเซลล์มะเร็งปอดให้กับหนูไมซ์ที่เคยได้รับสารพอลิแซ็กคาไรด์และไม่ได้รับสารพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าหนูที่เคยได้รับสารพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมะเร็งน้อยกว่าน้อยกว่าหนูที่ไม่ได้รับสาพอลิแซ็กคาไรด์

Ishii และคณะ (2011) พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารเสริมจากสารสกัดเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus blazei*) ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ช่วยเพิ่มระดับเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในร่างกายให้สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ หรือเซลล์ที่สามารถกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ได้ดีขึ้น Ahn และคณะ (2004) พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก มะเร็งรังไข่ และมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระดุมบราซิล ร่างกายจะมีการทำงานของ Natural killer cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์มะเร็งดีขึ้น

Loganathan และคณะ (2014) พิสูจน์ว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือ ซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุและยังมี เทอร์พีนอยด์, พอลิแซ็กคาไรด์ และ ฟีนอล ซึ่งช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดขนาดของก้อนมะเร็งเต้านมในหนูทดลองและป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็งไปสู่ปอด โดยผ่านการกดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง โดยมีผลต่อเซลล์ปกติเล็กน้อย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa

3.2 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Olympus optical Co., Ltd/ Japan
เครื่องกรองสุญญากาศ	Tokyo Rikakikai Co., Ltd/ Japan
เครื่องเขย่า	Labcon/ The Repulic of South Africa
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instument Company/USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich/ Germany
เครื่องสกัดสาร Soxhlet	
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Agilant/ USA
ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ	REXMED Industries Co., Ltd/ Taiwan
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	ISSOC/ Thailand
ตู้อบ 60 องศาเซลเซียส	Memmert/ Germany
ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม	
ปิเปตอัตโนมัติ	
Hemacytometer	
Microplate reader	Moleculae Devices/ USA

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
Anthrone (9, 10 – dihydro - 9 – oxoanthracene)	Fluka/ India
D-glucose	Ajax Finechem/ Australia

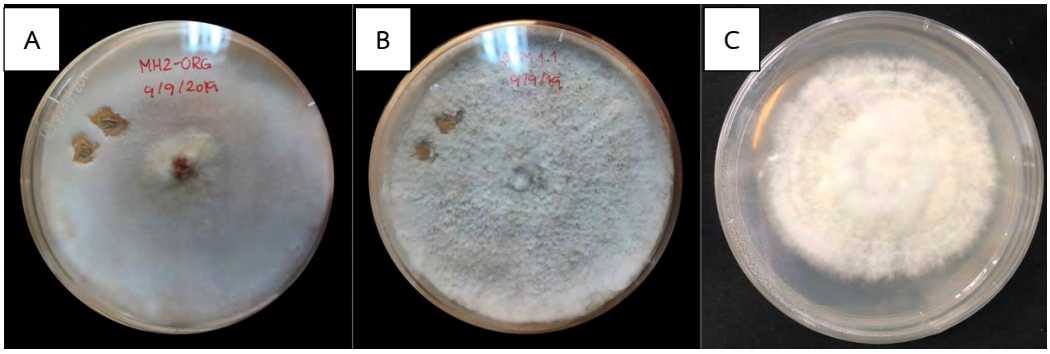
สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/ USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/ USA
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco/ USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco/ USA
Antibiotic-Actinomycotic	Gibco/ USA
AlamarBlue	Gold Biotechnology/USA

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 รวบรวมตัวอย่างเห็ด

รวบรวมตัวอย่างเชื้อเห็ด (mycelial culture) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ MH2-ORG, DTM 1.1 และ CU-07



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของโคโลนีของตัวอย่างเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07

3.4.2 เตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งที่คัดแยกได้ก่อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ข) นำเส้นใยบริสุทธิ์ของตัวอย่างเห็ดที่ได้รับวางลงบน PDA เป็นระยะเวลา 5 วันและเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ PDB ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น นำเส้นใยบริสุทธิ์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อมาเจาะเป็นวงกลมด้วย cork border ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้นใส่ลงใน PDB เลี้ยงเส้นใยเห็ดบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จึงนำเส้นใยเห็ดที่เจริญออกจาก PDB ในขวดเลี้ยงมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเส้นใยที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.3 สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง โดยใช้น้ำร่วมกับความร้อน

ทำการบดเส้นใยบริสุทธิ์ที่อบแห้งแล้วนำไปสกัดด้วยน้ำร้อน ในอัตราส่วนเส้นใยหรือดอกเห็ด 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสกัดสาร soxhlet จากนั้นนำ

สารสกัดหยาบจากเห็ดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum pump)

3.4.4 หาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test

เตรียมสารละลายอันโทรน (anthrone) โดยชั่งสารอันโทรนจำนวน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ (conc.H_2SO_4 98%) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในภาชนะทึบตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเพื่อหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดย ผสมสารสกัดหยาบจากเห็ดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลายอันโทรนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที สารสกัดที่มีสารพอลิแว็กคาไรด์จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ทำจำนวน 3 ซ้ำ และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.4.5 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็ง

3.4.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a และ SiHa ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะ Antibiotic-Antimycotic 1% (v/v) ในภาวะที่ไม่มีสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด โดยบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น

3.4.5.2 นับจำนวนเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาความหนาแน่นของเซลล์ โดยใช้ hemacytometer

3.4.5.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay นำเซลล์ชนิด SiHa แบ่งลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยมีเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1.2x10^4$ เซลล์ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและ cDMEM

ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้สารทดสอบคือ AlamarBlue (Gold Biotechnology, USA) เติมลงใน ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่นช่วง emission ที่ 570 นาโนเมตร และ excited ที่ 600 นาโนเมตร

3.4.6 ตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

สกัดดีเอ็นเอเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดโดยเขี่ยเส้นใยมาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำตัวอย่างที่บดละเอียด 0.5 กรัมใส่ลงในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2X CTAB buffer จำนวน 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติม chloroform 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารลละลายทิ้งและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้งและเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์สากล และตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

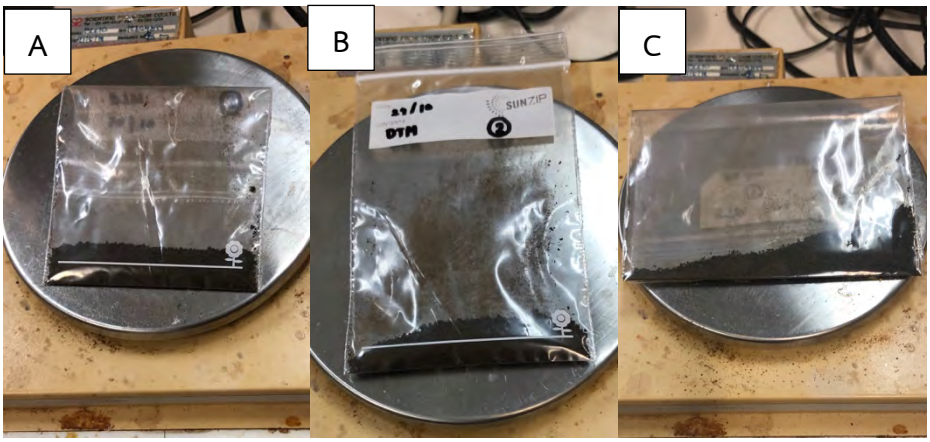
ทดสอบค่าทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ $p<0.05$ ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistic version 22 (SPSS, USA) แสดงผลการทดสอบด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.8 สรุปผลและเขียนรายงาน

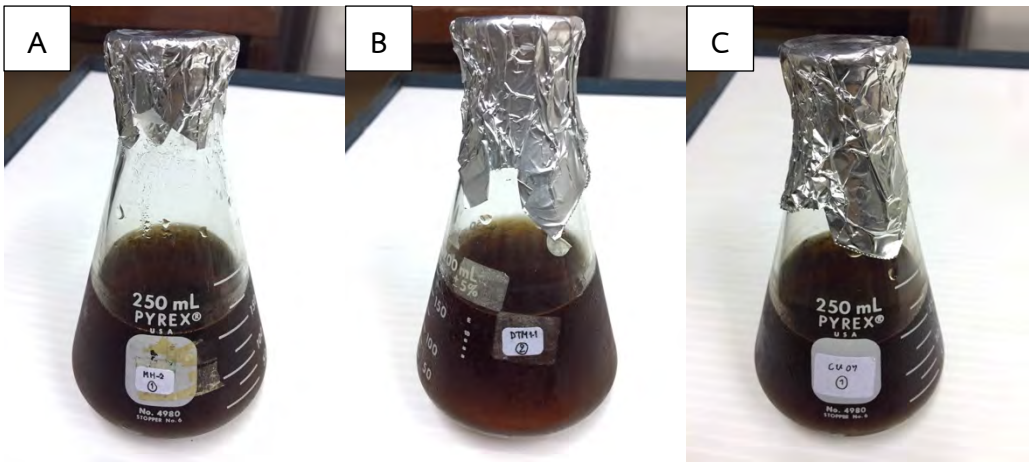
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งและสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้น้ำร่วมกับความร้อน

แยกเส้นใยให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่ามีเส้นใยเจริญออกจากเนื้อเยื่อ นำเส้นใยจากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่างมาเพิ่มบริมาณโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDB ในสภาวะเขย่าเป็นเวลา 5 วัน พบว่าได้เส้นใยเห็ดที่มีลักษณะเป็นก้อน มีสีขาว นำเส้นใยบริสุทธิ์มากรองและล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่ตู้ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปบดให้เป็นผง พบว่ามีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4.1) โดยเฉลี่ยได้น้ำหนักเส้นใยบริสุทธิ์แห้ง 2.24 ± 0.05 กรัมต่ออาหารเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อนำผงเส้นใยบริสุทธิ์แห้งไปทำการสกัดด้วยน้ำร้อน ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสกัดสาร Soxhlet ด้วยอัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 4.2) มีกลิ่นที่มีเอกลักษณ์เฉพาะโดยขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดอบแห้งที่ผ่านการบดก่อนนำไปสกัดสาร
A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07



ภาพที่ 4.2 สารสกัดหยาบจากเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดชนิดต่างๆ
A. MH2-ORG B. DTM 1.1 C. CU-07

4.2 ผลการหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test

นำสารสกัดหยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอันโทรน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งที่ไว้เป็นเวลา 5 นาทีในสภาวะมืด พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่า MH2-ORG, DTM 1.1 และ CU-07 มีค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.656, 0.274 และ 0.620 ตามลำดับ และนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวนหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดแต่ละชนิดพบว่ามีค่าเท่ากับ 6.55, 1.77 และ 2.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและ 1 กรัมของเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งจะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 73.85, 18.71 และ 24.33 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

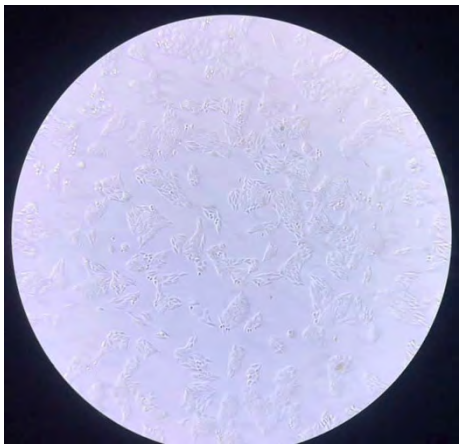
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบ

ตัวอย่างเห็ด	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยบริสุทธิ์เห็ด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อผงเห็ด 1 กรัม (มิลลิกรัม)
MH2-ORG	6.55	73.85 ± 0.79
DTM 1.1	1.77	18.71 ± 0.88
CU-07	2.07	24.33 ± 0.41

4.3 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก

4.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก

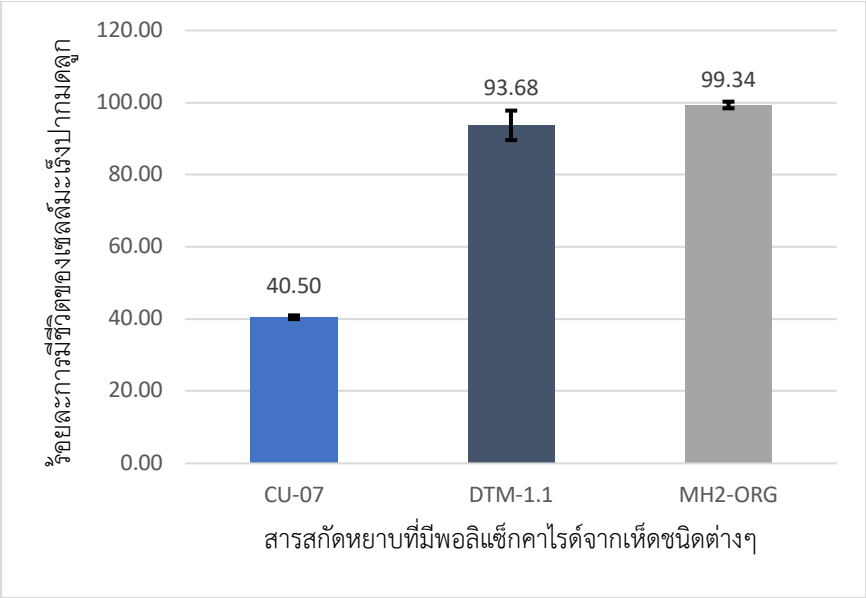
เลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa (ภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV16) ในขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (cDMEM) ในภาวะที่ไม่มีสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด บ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น โดยเซลล์มะเร็งปากมดลูกมีลักษณะเป็นรูปคล้ายกระสวยและเป็นเซลล์เกาะผิว



ภาพที่ 4.3 ลักษณะเซลล์มะเร็งชนิด SiHa ที่กำลังขยาย 20x

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay

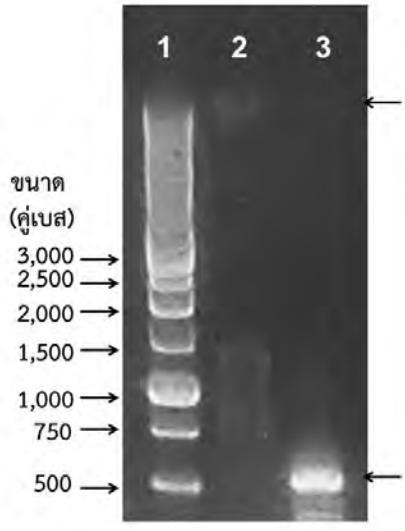
จากการทดลองเมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มาทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพอลิ-แซ็กคาไรด์จากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่าง บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมและตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และวัดค่าดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงมาคิดร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) พบว่า สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง CU-07, DTM-1.1 และ MH2-ORG ให้ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเท่ากับ 40.50, 93.68 และ 99.34 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง CU-07 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำที่สุด พบว่าเซลล์มีรูปร่างที่เปลี่ยนไป ไม่ยึดเกาะพื้นผิว แขวนลอยอยู่ในสารละลาย



ภาพที่ 4.4 ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ

4.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยบริสุทธิ์ของตัวอย่างเห็ด CU-07 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่า PCR products เกิดแถบขึ้นบริเวณความยาว 500 คู่เบส แสดงดังภาพ 4.8



ภาพที่ 4.5 ผลการทำ PCR ยีน ITS จากตัวอย่าง CU-07

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

สรุปว่าจากการทดลองทำการสกัดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดทั้งหมด 3 ตัวอย่างโดยสกัดด้วยวิธีการใช้น้ำร่วมกับความร้อนด้วยเครื่องสกัด Soxhlet พบว่าสารสกัดจากตัวอย่าง MH2-ORG ให้ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดจาก 3 ตัวอย่าง เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa พบว่าสารสกัดจากตัวอย่าง CU-07 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีที่สุดโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 40.50 จากนั้นจึงนำตัวอย่าง CU-07 ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

การเพิ่มปริมาณเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดทำโดยเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดใน PDB เลี้ยงในสภาวะเขย่าเพื่อลดระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณเมื่อเทียบกับวิธีตั้งในสภาวะนิ่ง (วิศรุต กิจพิพิธ, 2552) การเลี้ยงในสภาวะเขย่าสามารถให้เส้นใยบริสุทธิ์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการตั้งไว้ในสภาวะนิ่งโดยใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่า

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดตัวอย่าง CU-07 ที่มีความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์ 2.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถให้ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกน้อยที่สุดจากทั้ง 3 ตัวอย่าง ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด (*Ganoderma lucidum* (Fr).) Karst. ทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของมะเร็งปากมดลูกของคนที่ปลูกถ่ายเข้าสู่หนู พบว่าสามารถต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับน้ำกลั่น และสารสกัดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ สำหรับการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดตัวอย่าง CU-07 สามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดบางชนิด

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Zeng and Zhu,2017) โดยเป็นสารสกัดพอลิแซ็ก-คาไรด์จาก *Helvella leucopus* ซึ่งเป็นเห็ดกินได้และพบได้ในประเทศจีน ซึ่งตรงกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดจากเห็ดมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกเช่นเดียวกับรายงานการศึกษาอื่นๆเกี่ยวกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่น สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Lentinula edodes* มีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร รวมถึงเซลล์มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น (Zhang et al., 2019)

การศึกษาในอนาคตควรมีการศึกษาด้านการทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์และนำสารพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในมะเร็งชนิดอื่นๆ เนื่องจากสารสกัดอาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นได้ดี ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถในการทำให้เซลล์มะเร็งลดลงไปครึ่งหนึ่งและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอนาคต นอกจากนี้ควรทำการระบุชนิดพันธุ์ของเห็ดที่นำมาทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและง่ายต่อการนำไปศึกษาต่อ

เอกสารอ้างอิง

กมลพร ปานง่อม สุคนธ์ทิพย์ บุญวงค์ และกุลชนา เกศสุวรรณ์. 2554. **รายงานผลการวิจัย การศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล**. แพร่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต และศุภกิจ โขวุฒิธรรม. 2555. มะเร็งความลับที่อยู่ในรหัสพันธุกรรม. **Thai Journal of Genetics** 5(1) : 1-20.

ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์, นิรมล ศากยวงศ์ และสายัณห์ สมฤทธิ์ผล. 2557. การจำแนกราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ และความสามารถในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 5 : 683-694.

ปริญญา รัตนะพิมาน. 2535. **การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี [*Ganoderma lucidum (Fr.)* Karst.].** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วินัย กลิ่นหอม และอุษา กลิ่นหอม. 2548. **57 เห็ดเป็นยาแห่งป่าอีสาน**. กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิสุขภาพไทย.

วิศรุต กิจพิพิธ. 2552. **การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรรัตน์ โมฬี. 2549. **ชีวสารสนเทศทางสัตว์**. ภาควิชาสัตวบาล. คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล ธานี พานิชผล ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ และอนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2551. **เห็ดในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่2. นนทบุรี : ทีฟิล์ม.

Ahn, W.S., et al. 2004. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **International Journal of Gynecological Cancer** 14(4) : 589-594.

Chen, J., et al. 2016. Genetic analyses of the Internal Transcribed Spacer sequences suggest introgression and duplication in the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. **PLoS ONE** 11 : 1-15.

Daba, A.S and Ezeronye, O.U. 2003. Antitumor effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms (minireview). **African Journal of Biotechnology** 2 : 672-678.

Gibbs, W.W. 2003. Untangling the root of cancer. **Scientific American** 289: 48-57.

Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 3: 291-298.

Ishii, P.L., et al. 2011. Evaluation of *Agaricus blazei in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 59(3): 412-422.

Jang, M., et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science** 10 : 218-221.

Loganathan, J., et al. 2014. The mushroom Ganoderma lucidum suppresses breast-to-lung cancer metastasis through the inhibition of pro-invasive genes. **International Journal of Oncology.** 44: 2009-2015.

Mizuno, T. 1996. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan** 167: 69-85.

Mizuno, T. 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 1: 9-29.

Mizuno, T., Yeohlui, P., Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H., and Mayuzumi, Y. 1996. Antitumor activity and chemical modification of polysaccharides from Niohshimeji mushroom, Tricholoma giganteum. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 60: 30 –33.

Moradali, M., Mostafavi, H., Ghods, S., and Hedjaroude, G. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) (review). **International Immunophamacology** 7: 701-724.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.

Wasser, S.P., and Weis, A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushroom: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 1: 31-62.

Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60: 258 – 274.

World Health Organization. 2014. **Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice** Geneva**:** World Health Organization.

Wu, B., Cui, J., Zhang, C. and Li, Z. 2012. A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. **International Journal of Biological Macromolecules** 50(4): 1116-1120.

Zeng, D. and Zhu, S. 2017. Purification, characterization, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides extracted from Bachu mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules** 107: 1086-1092.

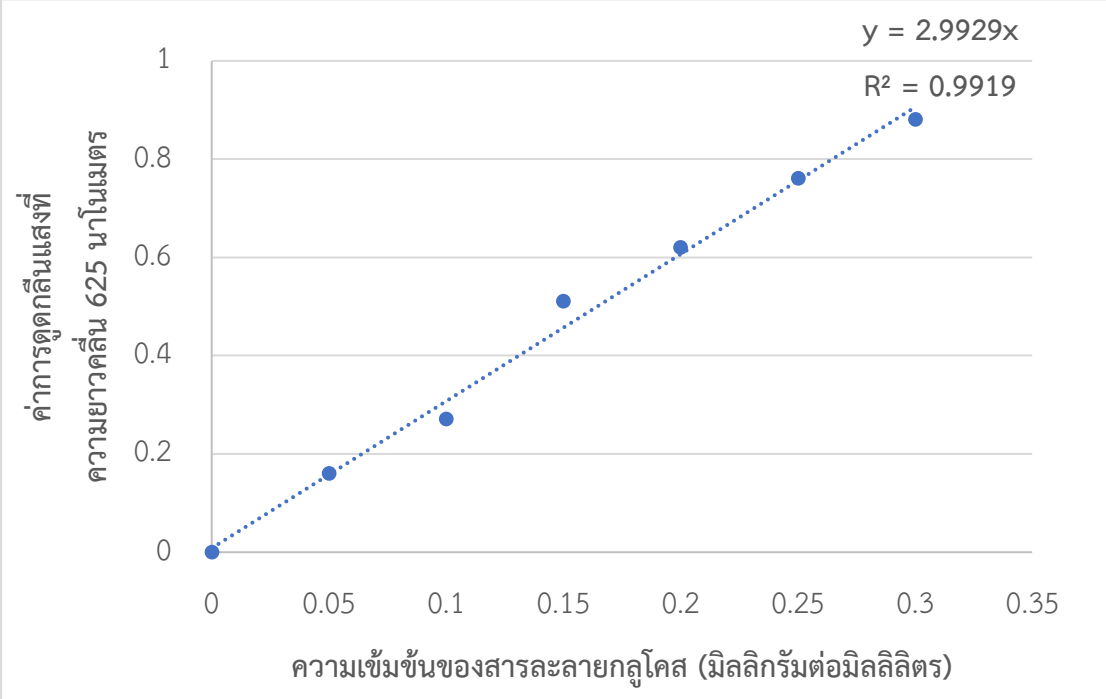
Zhang, M., Zhang, Y., Zhang, L. and Tian, Q. 2019. Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China. **Progress in Molecular Biology and Translational Science** 163: 297-328.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก.1 การทำกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานสามารถเตรียมได้โดย เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแก้วหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายอันโทรนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสมาตรฐาน (ภาพที่ ก.1)



ภาพที่ ก.1 กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ด้วยวิธีอันโทรน

ก.2 การคำนวณเซลล์

นำสารละลายที่มีเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย trypan blue stain ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน hemocytometer นับจำนวนเซลล์จากนั้นนำมาคำนวณเซลล์ที่ต้องใช้โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์รวม } \mathbf{4} \text{ ช่อง}}{\mathbf{4}} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{ปริมาณสารละลายที่ใช้ผสมกับเซลล์ (ml)} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ที่ต้อง}}{\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร}}$$

ก.3 การคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นช่วง emission ที่ 570 นาโนเมตร และ excited ที่ 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณด้วยสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (\% of cell viability)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสารสกัด} \; x \; 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสารสกัด}}$$

ภาคผนวก ข
การเตรียมสาร

ข.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกโทรส (Dextrose) หรือ กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำกลั่นจนชิ้นมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเนื้อมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมเดกโทรสหรือกลูโคส คนให้ละลาย ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีผงวุ้นอยู่ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

2) Potato Dextrose Broth (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกโทรส (Dextrose) หรือ กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปต้มในน้ำกลั่นจนชิ้นมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเนื้อมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมเดกโทรสหรือกลูโคส คนให้ละลาย ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

ข.2 เลี้ยงเซลล์

1) อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagel Medium (DMEM)

ผง Dulbecco's Modified Eagle Medium	1	ซอง
น้ำปลอดเชื้อ	1,000	มิลลิลิตร
ผงโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	ปริมาณขึ้นอยู่กับสูตรแต่ละบริษัท	

เตรียมน้ำปลอดเชื้อ 900 มิลลิลิตรผสมกับผง Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 ซอง ในขวดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมผงโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตตามสูตรของแต่ละบริษัท ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองและเก็บเพื่อนำไปใช้ต่อ

2) การเตรียม Complete Dulbecco's Modified Eagel Medium (cDMEM)

DMEM	94	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS)	5	มิลลิลิตร
Antibiotic-Antimycotic (100x)	1	มิลลิลิตร

นำ DMEM ที่เตรียมไว้ผสมกับ FBS และ Antibiotic-Antimycotic (100x) ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3) Phosphate buffered saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.25	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมโซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และน้ำกลั่น ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้อง