

ผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมาน *Phellinus linteus* เป็นองค์ประกอบต่อการมีชีวิตรของ
เซลล์ วัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิส และการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็ง
ต่อมลูกหมาก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS CONTAINING *Phellinus linteus* ON CELLVIABILITY, CELL
CYCLE, APOPTOSIS AND GENE EXPRESSION IN COLON CANCER AND PROSTATE CANCER
CELLS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีให้ดกระถินพิมาน *Phellinus
linteus* เป็นองค์ประกอบต่อการมีชีวิตของเซลล์ วัฏจักร
เซลล์ อะพอพโทซิส และการแสดงออกของยีนใน
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

โดย

น.ส.ประกายทิพย์ สมจิตต์

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.โชติกา สมรรถจันทร์)

6470115123 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: Phellinus linteus: Cell viability: Cell cycle: Apoptosis: IFNGR1 gene: KRAS gene
 Prakaithip Somjit : EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS CONTAINING *Phellinus linteus* ON
 CELLVIABILITY, CELL CYCLE, APOPTOSIS AND GENE EXPRESSION IN COLON CANCER
 AND PROSTATE CANCER CELLS. Advisor: Assoc. Prof. PATTAMAWADEE
 YANATATSANEEJIT

Colon cancer is a type of cancer with the highest incidence and mortality rate across all age groups and prostate cancer is the second-leading cause of cancer incidence and death among males. Current studies found that *Phellinus linteus* and some other herbs have anti-cancer effects. The objectives of this study were to determine the anti-tumor effects and inhibition mechanisms of an extract containing *P. linteus* as a constituent with other herbs (recipe) and only *P. linteus* in colon cancer cells HCT116 SW620 and HT-29 and prostate cancer cell PC-3. The result of cell viability inhibition using MTT assay showed that the recipe extract could inhibit the viability of cancer cells by 50% (IC₅₀) at a lower concentration than the extract that only *P. linteus* significantly. The inhibition mechanism of colon and prostate cancer cells of recipe extract was studied through the cell cycle and apoptosis cell death using PI assay and Annexin V apoptosis assay, respectively. The recipe extract increased cell cycle arrest at the G₀/G₁ phase and produced necrosis in prostate cancer cells, according to the findings. The recipe increased cell population at G₂ phase arrest in HCT116 and HT-29 and S phase in SW620 colon cancer cells and triggered apoptosis in colon cancer cells. Therefore, the effect of the recipe extract on the regulation of cell cycle arrest of prostate cancer and HT-29 colon cancer cells was associated with a significantly downregulation of *KRAS* gene expression. Moreover, apoptosis of prostate cancer cells and colon cancer cells HCT116 and HT-29 were associated with a significant upregulation and downregulation in *IFNGR1* gene expression. Thus, this study demonstrated the ability of *P. linteus* in combination with other herbs to regulate responses in colon and prostate cancer cells by regulating the cell cycle apoptosis and gene expression.

Field of Study: Genetics

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสมบูรณ์ ด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาทำให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์นี้ขึ้น ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นตลอดการศึกษาในครั้งนี้ รวมถึงตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง ครบถ้วน และสำเร็จลุล่วงด้วยดี จึงกราบขอบพระคุณอย่างสูง ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.โชติกา สมรรถจันทร์ กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ และชี้แนะในส่วนที่ต้องปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่สนับสนุนสถานที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกรุณาให้ใช้อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบริษัท เนเจอร์ เฮอร์บ อินเตอร์เนชั่น โอลดิง (Nature Herbs International Holding Company Limited) ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ชี้แนะ ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือตลอดงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพ่อแม่และครอบครัวสำหรับการสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประกายทิพย์ สมจิตต์

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2	4
ทบทวนเอกสาร	4
2.1 มะเร็งต่อมลูกหมาก.....	4
2.1.1 อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	4
2.1.2 สาเหตุ และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก.....	5
2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่	6
2.2.1 อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	6

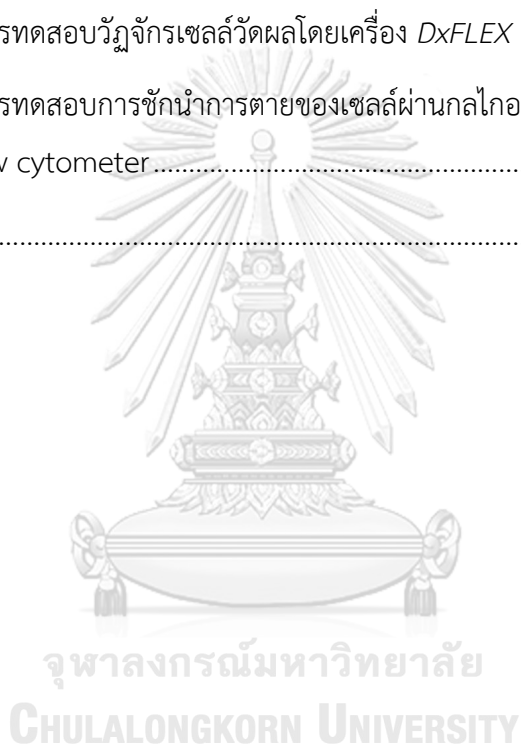
2.2.2 สาเหตุ และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	7
2.3 แนวทางการรักษามะเร็ง	8
2.3.1 การผ่าตัด (surgery).....	8
2.3.2 การฉายรังสีรักษา (Collaboration).....	8
2.3.3 เคมีบำบัด (chemotherapy).....	8
2.3.4 การรักษาอย่างตรงจุด (targeted cell therapy).....	9
2.4 เทคโนโลยีพันธุศาสตร์	9
2.4.1 ข้อมูลทั่วไป.....	9
2.4.2 คุณสมบัติในการรักษาโรค.....	10
2.5 MTT assay	10
2.6 cell cycle analysis (PI assay).....	11
2.7 Annexin V apoptosis assay	12
2.8 Real Time polymerase chain reaction (real-time PCR).....	13
2.9 ยีน Interferon gamma receptor 1 (<i>IFN-γRI</i>)	14
2.10 ยีน KRAS proto-oncogene (<i>KRAS</i>)	15
บทที่ 3	17
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	17
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	17
3.2 สารเคมี.....	18
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	20
3.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองและการเลี้ยงเซลล์	20
3.5 วิธีการทดลอง.....	20
3.5.1 การสกัดสารตัวอย่าง.....	20
3.5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์	21

3.5.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์.....	21
3.5.3.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์.....	21
3.5.3.2 การเตรียมเซลล์สำหรับวัดจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์.....	22
3.5.3.3 การศึกษาวัฏจักรเซลล์.....	22
3.5.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส.....	22
3.5.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์.....	22
3.5.4.2 การเตรียมเซลล์สำหรับวัดจำนวนประชากรเซลล์ที่เข้าสู่กลไกอะพอพโทซิส.....	23
3.5.4.3 การศึกษาความสามารถในการชักนำเซลล์เข้าสู่กลไกอะพอพโทซิส.....	23
3.5.5 การทดสอบการแสดงออกของยีน.....	23
3.5.5.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์.....	23
3.5.5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	24
3.5.5.3 การสกัด complementary DNA (cDNA).....	24
3.5.5.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน IFNGR1 และยีน KRAS.....	24
3.5.5.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR.....	25
บทที่ 4.....	27
ผลการทดลอง.....	27
4.1 ผลการสกัดสารจากผงตัวอย่างทั้ง 2 สูตร และความเข้มข้นของสารสกัด.....	27
4.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์.....	27
4.2.1 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ด้วยสารสกัดสูตร ตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน.....	27
4.2.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ด้วยสารสกัดสูตร ตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน.....	28
4.2.3 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน.....	29

4.2.4 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% หาระกษณพพมาน	30
4.2.5 ผลการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์.....	31
4.2.6 ผลการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตร 100% หาระกษณพพมานในการลดการมีชีวิตของเซลล์	32
4.3 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์.....	34
4.3.1 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3	34
4.3.2 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116	35
4.3.3 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	35
4.3.4 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29	36
4.4 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	37
4.4.1 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	38
4.4.2 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	39
4.4.3 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	40
4.4.4 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	41
4.5 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน	42
4.5.1 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>IFNGR1</i> <i>KRAS</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3.....	42
4.5.2 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>IFNGR1</i> <i>KRAS</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116.....	42
4.5.3 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>IFNGR1</i> <i>KRAS</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	44

4.5.4 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>IFNGR1</i> <i>KRAS</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29	45
บทที่ 5	46
อภิปรายผลการทดลอง.....	46
5.1 การสกัดสารจากผงตัวอย่างทั้ง 2 สูตร และความเข้มข้นของสารสกัด	46
5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์.....	46
5.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์	47
5.3.1 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก	48
5.3.2 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116.....	48
5.3.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	49
5.3.4 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29.....	50
5.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	51
5.4.1 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากผ่านกลไกอะพอพโทซิส..	51
5.4.2 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส	52
5.4.3 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส.....	52
5.4.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส.....	53
5.5 การทดสอบการแสดงออกของยีน.....	54
5.5.1 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก	54
5.5.2 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116.....	55
5.5.3 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	56
5.5.4 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29	58
บทที่ 6	60

สรุปผลการทดลอง.....	60
บรรณานุกรม.....	61
ภาคผนวก.....	72
ผลการคำนวณความเข้มข้นของสารสกัด.....	72
สูตรคำนวณหาค่า % cell viability	73
ผลทดสอบการมีชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับซิสพลาติน	73
ผลการวิเคราะห์การทดสอบวัฏจักรเซลล์วัดผลโดยเครื่อง <i>DxFLEX</i> Flow cytometer	75
ผลการวิเคราะห์การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสวัดผลโดยเครื่อง <i>DxFLEX</i> Flow cytometer.....	82
ประวัติผู้เขียน.....	91



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน IFNGR1 และ KRAS โดยมียีน GAPDH และ MKI67 เป็นยีนอ้างอิง.....	25
ตารางที่ 2 ค่า IC ₅₀ สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29	32
ตารางที่ 3 ค่า IC ₅₀ สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของสารสกัดสูตร 100% หาระกษณพมามนในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29	33
ตารางที่ 4 ข้อมูลน้ำหนักของสารสกัดสูตรตำรับก่อนและหลังการอบแห้ง	72
ตารางที่ 5 ข้อมูลน้ำหนักของสารสกัดสูตร 100% หาระกษณพมามนก่อนและหลังการอบแห้ง	72
ตารางที่ 6 ค่า IC ₅₀ สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน). 74	
ตารางที่ 7 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 สะสมในวัฏจักรเซลล์	76
ตารางที่ 8 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 สะสมในวัฏจักรเซลล์	77
ตารางที่ 9 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 สะสมในวัฏจักรเซลล์.....	79
ตารางที่ 10 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 สะสมในวัฏจักรเซลล์	80
ตารางที่ 11 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% หาระกษณพมามน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติน.....	83
ตารางที่ 12 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% หาระกษณพมามน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติน.....	85
ตารางที่ 13 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% หาระกษณพมามน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติน.....	87
ตารางที่ 14 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% หาระกษณพมามน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติน.....	89

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 อัตราการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากทุกกลุ่มอายุของประชากรชายในทวีปเอเชียปีพ.ศ. 2563 ...	4
รูปที่ 2 อัตราการเกิดและอัตราการตายจากโรคมะเร็งของประชากรไทยปีพ.ศ. 2563	6
รูปที่ 3 กลไกการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่	7
รูปที่ 4 รูปร่างลักษณะของเม็ดกระถินพิมาน	9
รูปที่ 5 การเปลี่ยนโครงสร้างสาร MTT โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase	11
รูปที่ 6 ฮิสโตแกรมจำนวนประชากรเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรเซลล์	12
รูปที่ 7 การวิเคราะห์ข้อมูลแบบสองตัวแปรแสดงจำนวนประชากรเซลล์ในระยะต่าง ๆ	13
รูปที่ 8 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยทำงานผ่าน IFN- γ signaling pathway.....	15
รูปที่ 9 การส่งสัญญาณของโปรตีน K-RAS ผ่านเส้นทาง RAS-MAPK	16
รูปที่ 10 ผงตัวอย่างสูตรตำรับและสูตร 100% เม็ดกระถินพิมาน	20
รูปที่ 11 สารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เม็ดกระถินพิมาน.....	27
รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ PC-3.....	28
รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ HCT116.....	29
รูปที่ 14 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ SW620.....	30
รูปที่ 15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ HT-29	31
รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ	32
รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100%	33
รูปที่ 18 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ PC-3 ในวัฏจักรเซลล์.....	34
รูปที่ 19 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ HCT116 ในวัฏจักรเซลล์.....	35
รูปที่ 20 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ SW620 ในวัฏจักรเซลล์.....	36

รูปที่ 21 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ HT-29 ในวัฏจักรเซลล์	37
รูปที่ 22 ร้อยละจำนวนเซลล์ PC-3 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอโทซิส	38
รูปที่ 23 ร้อยละจำนวนเซลล์ HCT116 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอโทซิส	39
รูปที่ 24 ร้อยละจำนวนเซลล์ SW620 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอโทซิส	40
รูปที่ 25 ร้อยละจำนวนเซลล์ HT-29 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอโทซิส	41
รูปที่ 26 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน IFNGR1 KRAS และ MKI67 ในเซลล์ PC-3	43
รูปที่ 27 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน IFNGR1 KRAS และ MKI67 ในเซลล์ HCT116	43
รูปที่ 28 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน IFNGR1 KRAS และ MKI67 ในเซลล์ SW620	44
รูปที่ 29 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน IFNGR1 KRAS และ MKI67 ในเซลล์ HT-29	45
รูปที่ 30 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์มะเร็งลำไส้	73
รูปที่ 31 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งต่อม ลูกหมาก	74
รูปที่ 32 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ในวัฏจักรเซลล์ ..	75
รูปที่ 33 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ในวัฏจักรเซลล์	77
รูปที่ 34 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ในวัฏจักรเซลล์	78
รูปที่ 35 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ในวัฏจักรเซลล์ .80	
รูปที่ 36 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116	82
รูปที่ 37 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	84
รูปที่ 38 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29	86
รูปที่ 39 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด PC-3	88

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็ง เป็นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติอย่างควบคุมไม่ได้ อีกทั้งเซลล์มะเร็งยังมีความสามารถในการหลบหลีกการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถรุกรานไปยังอวัยวะข้างเคียงหรือลุกลามไปตามอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายผ่านทางระบบไหลเวียนเลือดและระบบน้ำเหลือง หนึ่งในมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสี่ในผู้ป่วยมะเร็งทุกกลุ่มอายุ คือมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก (Terzić et al., 2010) และมีสาเหตุการตายเป็นอันดับสามในผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วโลก (Labianca et al., 2010) โดยพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่มาจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งมีความผิดปกติมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) (Karanikas and Esebidis, 2016) และอีกหนึ่งมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับต้น ๆ ของผู้ชาย คือมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณต่อมลูกหมาก มะเร็งต่อมลูกหมากมักพบในผู้ชายสูงอายุส่วนใหญ่จะพบในผู้ชายอายุ 50 ปีขึ้นไป (Quinn and Babb, 2002) อีกทั้งยังพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลต่อการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก หากพบว่ามีความผิดปกติในครอบครัวผู้ป่วยเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากจะมีโอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากมากกว่าคนทั่วไป รวมถึงเชื้อชาติมีผลต่ออุบัติการณ์เกิดมะเร็งต่อมลูกหมากโดยมักพบในผู้ชายชาวตะวันตกมากกว่าผู้ชายชาวเอเชีย (Crawford, 2003) ในปัจจุบันการรักษามะเร็งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด, การฉายรังสีรักษา, เคมีบำบัด และการรักษาด้วยการแพทย์ทางเลือกโดยการใช้สมุนไพร

เห็ดกระถินพิมาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phellinus linteus* ลักษณะทั่วไปของเห็ดกระถินพิมาน มีลักษณะคล้ายเปลือกหอย ลำต้นมีสีน้ำตาล ดอกเห็ดมีลักษณะแข็งเหมือนเนื้อไม้ และไม่มีก้าน (Pleninger and Volk, 2005) สารสกัดจากสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบนั้น จากการศึกษาบทความวิจัยพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่ได้จากสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน มีความสามารถในการต้านการอักเสบ การต้านอนุมูลอิสระ รักษาความผิดปกติของตับ ต้านมะเร็ง และต้านอาการแพ้ และเนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับและมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น (Zhu et al., 2008)

เนื่องจากการกล่าวอ้างสรรพคุณของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานว่าสามารถช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคอีสุกอีใส โรคงูสวัด เป็นต้น ดังนั้นจึงสนใจศึกษาในที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งจัดเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (ไซโตไคน์) ที่ระบบภูมิคุ้มกันสร้างขึ้นคือ ยีน Interferon gamma receptor 1 (*IFNGR1*) ที่จะถูกแปลรหัสได้โปรตีน IFN- γ 1 เป็นตัวรับสัญญาณของไซโตไคน์ที่มีชื่อว่า interferon gamma (IFN- γ) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สามารถชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ มากำจัดเซลล์มะเร็งได้หากมีการตรวจพบ (Bernabei et al., 2001) นอกจากนี้อีกหนึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยตรงได้แก่ ยีน GTPase KRas (*KRAS*) ที่จะถูกแปลรหัสได้โปรตีน K-RAS เป็นตัวแปลงสัญญาณ (signal transducer protein) มีหน้าที่ส่งสัญญาณเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ โดย *KRAS* จะแปลงสัญญาณผ่านหลายเส้นทาง (Jančík et al., 2010) จึงจัดเป็นยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย (proto-oncogene)

ในการศึกษาครั้งนี้สนใจศึกษาสารสกัด 2 สูตรคือ สารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ (สูตรตำรับ) ร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ เช่น เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ เป็นต้น และสารสกัดที่มีเฉพาะเห็ดกระถินพิมาน โดยนำสารสกัดทั้ง 2 สูตรนี้ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 3 ชนิดได้แก่ HCT116 SW620 และ HT-29 ทั้งนี้ได้มีการนำยาเคมีบำบัดซิสพลาติน (cisplatin) เป็นชุดควบคุมบวก (positive control) เพื่อทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ มะเร็งดังกล่าวหลังจากได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร และซิสพลาติน เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและ 48 ชั่วโมงในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ หลังจากนั้นทำการประเมินระดับการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ต่อมานำค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละช่วงความเข้มข้นมาคำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตเท่ากับ 50% (50% inhibitory concentration: IC_{50}) เพื่อใช้ในการศึกษาวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธี cell cycle analysis (PI assay) อะพอพโทซิสด้วยวิธี Annexin V apoptosis assay และศึกษาการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* เนื่องจากคุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่สามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันหรือชักนำกระบวนการอะพอพโทซิสและช่วยชะลอกระบวนการแบ่งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ของมะเร็งหลายชนิด จึงได้เลือกศึกษาการแสดงออก 3 ยีนดังกล่าวข้างต้น เพื่อคาดการณ์กลไกในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากด้วยวิธี Real Time polymerase chain reaction (real-time PCR) และวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมลบ (negative control)

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทำให้ทราบถึงความสามารถของสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ วัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิสของ และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ยังสามารถคาดการณ์กลไกที่สารสกัดใช้ในการ

ยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษา เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบต่อการมีชีวิตของเซลล์ วัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และยีน *KRAS* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำข้อมูลฤทธิ์ของสารสกัดให้ดกระถินพิมานต่อการมีชีวิตของเซลล์ วัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิส และการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ไปใช้ในเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งต่อมลูกหมากต่อไป

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาค่าความเข้มข้นของสารสกัด 2 สูตรที่ทำให้ระดับการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดมีค่าเท่ากับ 50% เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด (ชุดควบคุมลบ)
2. หาค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์แต่ละชนิดหลังจากได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร
3. หาค่าร้อยละจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์แต่ละชนิดหลังจากได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร
4. ทหาระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และ *KRAS* ในเซลล์แต่ละชนิดหลังจากได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร

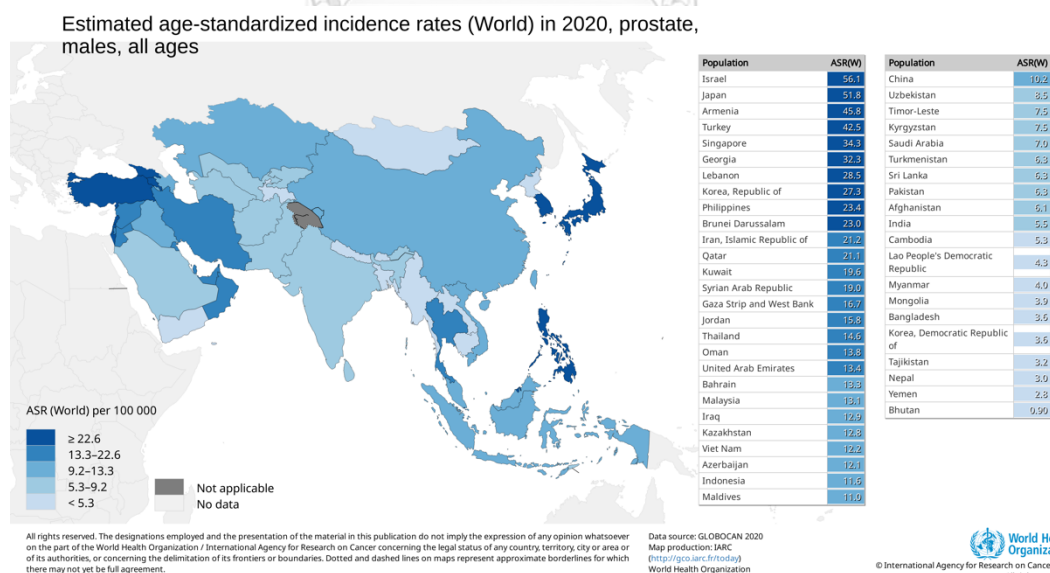
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 มะเร็งต่อมลูกหมาก

2.1.1 อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งที่มีอัตราการเกิดโรคสูงเป็นอันดับสอง และมีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับห้าของผู้ชายทั่วโลก (Alvarez et al., 2018) โดยในปี 2561 มีรายงานพบผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากรายใหม่ประมาณ 1,276,000 ราย และเสียชีวิต 359,000 ราย (Ferlay et al., 2018) เนื่องจากประชากรโลกก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุมากขึ้น (Center et al., 2012) จากฐานข้อมูลการตายขององค์การอนามัยโลก พบว่า 72% ของผู้ป่วยและ 53% ของผู้เสียชีวิตในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น แต่จะพบต่ำในแถบประเทศเอเชียกลาง แอฟริกาเหนือ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Organization, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 1 แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลของ International Agency for Research on Cancer (IARC) เกี่ยวกับอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งและอัตราการเสียชีวิตโดยประมาณในทุกประเทศทั่วโลกในฐานข้อมูลของ GLOBOCAN ในปี พ.ศ. 2561 ถึงแม้ทวีปเอเชียจะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำที่สุดในโลก แต่ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2555 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในบางประเทศเช่น ประเทศไทยพบแนวโน้มเพิ่มขึ้น 6.2% (Culp et al., 2020)



รูปที่ 1 อัตราการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากทุกกลุ่มอายุของประชากรชายในทวีปเอเชียปีพ.ศ. 2563 (International Agency for Research on Cancer, WHO)

สำหรับประเทศไทย รายงานจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติประเทศไทยเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของมะเร็งต่อมลูกหมากในปัจจุบันเท่ากับ 14.6 รายต่อประชากร 100,000 ราย คิดเป็นอันดับหกครองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ แต่มีแนวโน้มพบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเทคโนโลยีทางการแพทย์ในปัจจุบันที่พัฒนาขึ้นทำให้สามารถตรวจพบมะเร็งต่อมลูกหมากได้มากขึ้น โดยมีอัตราการเกิดสูงในภาคใต้ของประเทศไทยเมื่อเทียบกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Alvarez et al., 2018)

2.1.2 สาเหตุ และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก

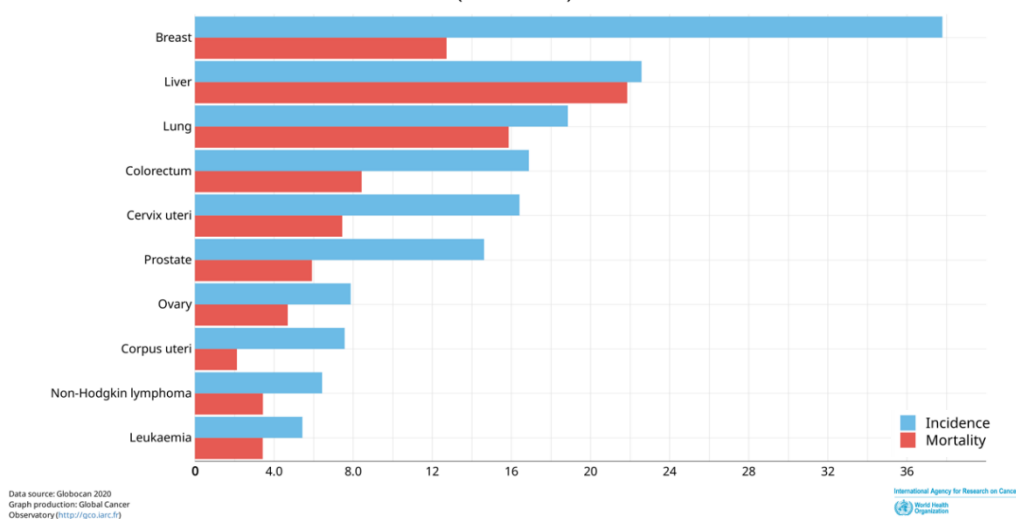
มะเร็งต่อมลูกหมากเกิดจากการแบ่งตัวและเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์ต่อมลูกหมากจนกลายเป็นก้อนเนื้อมะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากจะสามารถแพร่กระจายผ่านกระแสเลือด หรือต่อมน้ำเหลืองและลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย (Strickler and Goedert, 2001) ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุสาเหตุของโรคมะเร็งต่อมลูกหมากที่แน่ชัดได้ (Pernar et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามผลจากการสำรวจพบว่าอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยคือ 72-74 ปี และประมาณ 85% ของผู้ป่วยตรวจพบโรคหลังอายุ 65 ปี (Sweden, 2009) จากการศึกษาผู้ชาย 600 คนในเมืองดีทรอยต์ รัฐมิชิแกน สหรัฐอเมริกา พบอัตราการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก 30% ในผู้ชายอายุ 30 ปี 50% ในผู้ชายอายุ 50 ปีและมากกว่า 70% ในผู้ชายอายุมากกว่า 85 ปี (Sakr et al., 1993) โดยอัตราการเกิดโรคแตกต่างกันมากถึง 90 เท่าระหว่างกลุ่มประชากร ซึ่งความแตกต่างนี้อาจมาจากความอ่อนแอทางพันธุกรรมจากการศึกษาการย้ายถิ่นของชาวเอเชีย (อุบัติการณ์ต่ำ) ไปยังยุโรป (อุบัติการณ์สูง) อุตสาหกรรมของชาวเอเชียเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้น (Races and Sexes, 2002) หรือพบอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากในสหรัฐอเมริกาในกลุ่มชายผิวดำมากกว่าชายผิวขาว (Howlader et al., 2012) บ่งชี้ถึงอิทธิพลของเชื้อชาติและชาติพันธุ์ส่งผลต่ออัตราการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยความเสี่ยงในด้านพันธุกรรม โดยพบว่าผู้ที่มีประวัติผู้ชายในครอบครัวเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมากมีความเสี่ยงสูงกว่า 2-3 เท่าของผู้ชายที่ไม่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก (Brandt et al., 2012) ประมาณการการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงถึง 57% (Mucci et al., 2016) ผู้ชายที่มีพี่ชายเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมากมากกว่าผู้ชายที่มีพ่อเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก อาจบ่งชี้ได้ว่าความบกพร่องหรือความอ่อนแอทางพันธุกรรมนี้ถูกส่งต่อผ่านโครโมโซม X (Monroe et al., 1995) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านอาหารกับมะเร็งต่อมลูกหมาก (Lee et al., 1998) พบว่าการรับประทานอาหารที่มีไขมัน เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากนมในปริมาณสูงจะได้รับกรด α -linolenic และแคลเซียมในปริมาณสูง ผลการวินิจฉัยของแพทย์พบว่าผู้ชายที่ได้รับแคลเซียมมากกว่า 600 มิลลิกรัมต่อวันมีโอกาสเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากมากกว่าผู้ชายที่บริโภค 150 มิลลิกรัมต่อวันหรือน้อยกว่า (Chan et al., 2001)

2.2 มะเร็งลำไส้ใหญ่

2.2.1 อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่มีอัตราการเกิดโรคสูงเป็นอันดับสี่ และมีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับสามของผู้ป่วยมะเร็งทั่วโลก (Terzić et al., 2010) อุบัติการณ์ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย (Jullumstrød et al., 2011) โดยพบมากในประเทศที่พัฒนาแล้วซึ่งมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่สูงกว่าประเทศกำลังพัฒนาหรืออาจกล่าวได้ว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งนี้เพิ่มขึ้นตามการพัฒนาของอุตสาหกรรมและการขยายตัวของชุมชนเมือง โดยมีอุบัติการณ์ที่สูงในประเทศอเมริกาเหนือ ยุโรป และออสเตรเลีย (Labianca et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั่วโลกพบอุบัติการณ์เกิดโรคที่เพิ่มขึ้นในแอฟริกาและเอเชียบางประเทศ โดยประมาณ 70% ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป แต่จะพบได้น้อยในกลุ่มอายุต่ำกว่า 45 ปี (Parkin et al., 2001)

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, Thailand, both sexes, all ages (excl. NMSC)



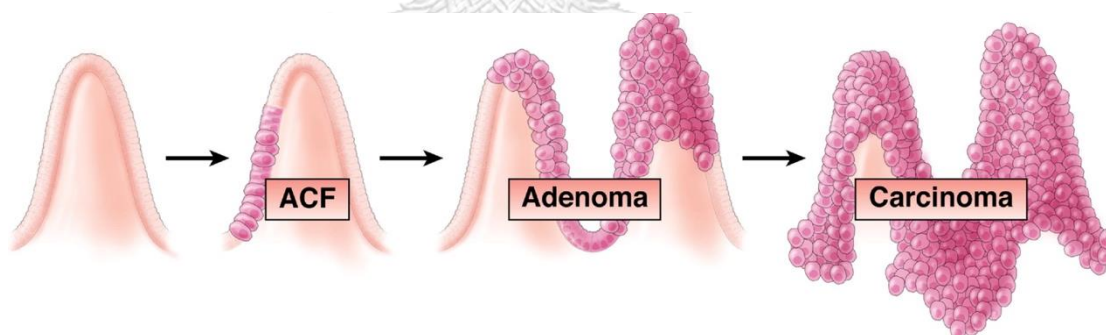
รูปที่ 2 อัตราการเกิดและอัตราการตายจากโรคมะเร็งของประชากรไทยปีพ.ศ. 2563
(International Agency for Research on Cancer, WHO)

สำหรับประเทศไทยพบอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่สูงเป็นอันดับสามในผู้ป่วยมะเร็งทั้งเพศชายและหญิง (Tiankanon et al., 2021) ในปี 2560 อัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้น 55% ในเพศชาย และ 19% ในเพศหญิง และในปี 2561 ตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้นอีก 10.3% ของผู้ป่วยรายใหม่ (Virani et al., 2017) โดยปกติมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นสามารถ

รักษาให้หายได้หากมีการตรวจพบและรักษาในระยะเริ่มต้น แต่โดยส่วนมากแล้วผู้ป่วยจะตรวจพบหลังจากแสดงอาการของโรคเมื่ออยู่ในขั้นลุกลาม (Levin et al., 2008)

2.2.2 สาเหตุ และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากดีเอ็นเอในเซลล์ลำไส้ใหญ่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ทำให้เซลล์สามารถหลบหลีกการควบคุมของระบบภูมิคุ้มกัน จึงไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวได้ (Markowitz et al., 2002) โดยพบว่ายีนที่มักพบการกลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งมักเป็นยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย (proto-oncogene) ของเซลล์ปกติที่จะเปลี่ยนเป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) อีกทั้งยังทำให้ความสามารถในการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอลดลง (Bogaert and Prenen, 2014) โดยมีกลไกการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ เริ่มจากการสะสมของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีการกลายพันธุ์ในยีนก่อมะเร็งและยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) โดยมียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีนเช่น ยีน Adenomatous Polyposis Coli (Howlader et al.) การกลายพันธุ์ในยีนนี้ทำให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นรอยโรคของมะเร็งลำไส้ใหญ่ Aberrant Crypt Foci (ACF) (Terzić et al., 2010) และการกลายพันธุ์ของยีน KRAS และยีน Netrin receptor DCC (DCC) รวมถึงสูญเสียการทำงานของยีน tumor protein 53 (p53) ซึ่งเป็นยีนควบคุมระยะการแบ่งเซลล์จากระยะ G₁/S ในวัฏจักรเซลล์ จึงทำให้อ่อนแอ (adenoma) จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นมะเร็งที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (carcinoma) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 กลไกการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

(Terzić et al., 2010)

โดยมีปัจจัยเสี่ยงที่ส่งผลต่อการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เช่น ความผิดปกติของยีนที่กล่าวข้างต้น สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมภายในครอบครัว หากมีบุคคลในครอบครัวเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่จะมีโอกาสสูงที่จะตรวจพบยีนที่ผิดปกติ จากข้อมูลของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค 90% ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 50 ปีขึ้นไปมีความเสี่ยงสูงในการตรวจพบมะเร็งลำไส้ใหญ่ อีกทั้งเชื้อชาติยังมีผลต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคในชาวตะวันตกมากกว่าชาวเอเชีย

(Crawford, 2003) แต่อย่างไรก็ตามยังพบปัจจัยเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากการดำเนินชีวิต จากข้อมูลของ American Cancer Society (ACS) พบว่า 55% ของการวิจัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสหรัฐอเมริกา สาเหตุมาจากการดำเนินชีวิต เช่น ปัจจัยเสี่ยงในเรื่องอาหาร โดยความเสี่ยงจะสูงขึ้นในผู้ที่รับประทาน อาหารที่มีไขมันสูง เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวนมาก (Johnson et al., 2013) ปัจจัยเสี่ยงในเรื่องน้ำหนัก สูงมากในผู้ที่มีน้ำหนักเกินหรือเป็นโรคอ้วน ปัจจัยเสี่ยงในเรื่องการสูบบุหรี่ ประมาณ 12% ของผู้ป่วย มะเร็งลำไส้ใหญ่มีประวัติการสูบบุหรี่ที่ยาวนานจากอดีตถึงปัจจุบัน และปัจจัยเสี่ยงในการดื่มเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ปริมาณมากอาจเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Hagggar and Boushey, 2009)

2.3 แนวทางการรักษามะเร็ง

การรักษามะเร็งจะพิจารณาจากการแบ่งตัวของมะเร็งโดยมีการแบ่งตัว 5 ระยะ ได้แก่ ระยะ ที่ 0 เป็นมะเร็งระยะก่อนการลุกลามโดยจะเป็นเพียงเซลล์มะเร็งระยะเริ่มต้น ยังไม่แพร่กระจายไปยัง เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะข้างเคียง ระยะที่ 1 เซลล์มะเร็งก่อตัวเป็นก้อนเนื้อมะเร็งขนาดเล็กเพิ่งเริ่มเติบโต แต่ยังไม่มีการรุกรานไปยังต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะข้างเคียง ระยะที่ 2 ก้อนเนื้อมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น เติบโตบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียง และอาจมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ระยะที่ 3 มีการ รุกรานของเซลล์มะเร็งมากกว่าระยะที่ 2 และระยะที่ 4 มะเร็งแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ภายใน ร่างกาย (Greene et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามโรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถรักษาให้หายขาดได้หาก ตรวจพบในระยะแรก โดยปัจจุบันการรักษามะเร็งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

2.3.1 การผ่าตัด (surgery)

การผ่าตัดมะเร็ง คือการผ่าตัดเอาเนื้อบางส่วนที่มีการติดเชื้อมะเร็งออก แต่ผลเสียจากการ รักษาโดยการผ่าตัดอาจทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะข้างเคียงทำให้มีเลือดออก เกิดการติดเชื้อจาก บาดแผล หรือมีอาการปวดบริเวณแผลที่ผ่าตัด (Reedy, 2019)

2.3.2 การฉายรังสีรักษา (Collaboration)

การฉายรังสี เป็นการรักษามะเร็งเฉพาะตำแหน่ง การฉายรังสีเป็นการรักษามะเร็งโดยใช้รังสี ที่มีพลังงานสูง ซึ่งการรักษาโดยการฉายรังสีจะขึ้นอยู่กับระยะของโรค หากผู้ป่วยเป็นมะเร็งระยะแรก จะมีโอกาสหายเกือบ 100% แต่การรักษาโดยการฉายรังสี ผู้ป่วยต้องเข้ารับการฉายแสงอย่างต่ำ 25-30 ครั้ง ทำให้ผลเสียจากการรักษาโดยการฉายรังสีจะทำให้ผู้ป่วยมีแผลลอกขนาดใหญ่ และแผลที่ได้ จากการรักษามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ (Lukka et al., 2002)

2.3.3 เคมีบำบัด (chemotherapy)

เคมีบำบัด เป็นการรักษามะเร็งโดยใช้สารเคมีที่มีผลทำลายเซลล์มะเร็ง โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดจะไปขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญลง โดย ส่วนมากจะใช้วิธีการรักษามะเร็งโดยเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งระยะที่ 3 ซึ่งเซลล์มะเร็งได้มีการลุกลาม

ไปยังอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายแล้ว แต่ผลเสียจากการรักษาโดยเคมีบำบัดจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการผมร่วง เบื่ออาหาร ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวในร่างกายต่ำ ลงอาจมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ การทำงานของไตลดลง เป็นต้น (cervical cancer meta-analysis collaboration, 2018)

2.3.4 การรักษาอย่างตรงจุด (targeted cell therapy)

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

2.4 เห็ดกระถินพิมาน

2.4.1 ข้อมูลทั่วไป

เห็ดกระถินพิมาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phellinus linteus* ลักษณะทั่วไปของเห็ดกระถินพิมาน ดอกเห็ดจะมีลักษณะแข็งกระด้างคล้ายเนื้อไม้ มีรูปทรงคล้ายครึ่งวงกลม มักขึ้นอยู่บนต้นกระถินพิมาน (Sliva, 2010) ดังแสดงในรูปที่ 4 มักเจริญเติบโตในพื้นที่เขตร้อนโดยส่วนใหญ่มาจากอเมริกา แอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และพบมากในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี โดยได้รับการยอมรับมาอย่างยาวนานกว่า 2,000 ปีว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Gu, 1955)



รูปที่ 4 รูปร่างลักษณะของเห็ดกระถินพิมาน

(Chen et al., 2019)

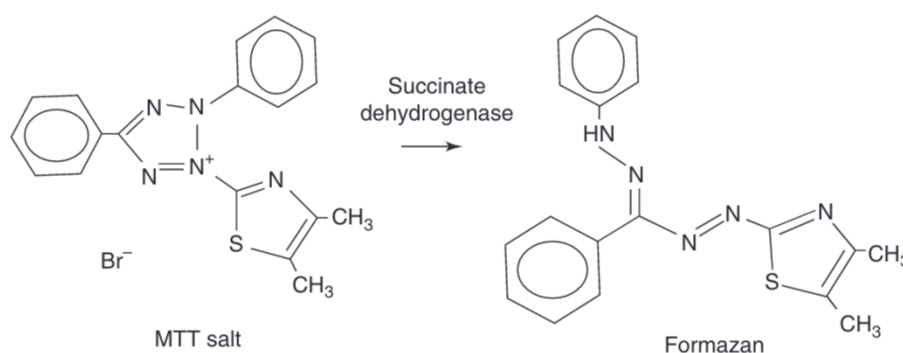
2.4.2 คุณสมบัติในการรักษาโรค

สรรพคุณพื้นฐานของเห็ดกระถินพินานสามารถใช้รักษาอาการปวดหู เริม เบาทหวาน ท้องเสีย ประจำเดือนมาไม่ปกติ และงูสวัด (Kim et al., 2007) (Zapora et al., 2016) และจากการศึกษา ค้นคว้าพบว่าในสารสกัดจากเห็ดกระถินพินานมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ เช่น especially, β -glucan, flavonoids, coumarins, strylypyrones, steroids, macrolides และ sesquiterpenes เป็นต้น (Lemieszek and Rzeski, 2012) อีกทั้งยังพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ โพรติโอไกลแคน (Proteoglycan) และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น ฮิสโปลอน (Hispolon) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) davallialactone, interfungins A และ inoscavin A (Sliva, 2010) จากสารสกัดเห็ดกระถินพินานมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มกิจกรรมของ T-cells มาโครฟาจ (Macrophage) และ natural killer cells และ B-cells (Han et al., 1999) ด้านมะเร็ง (Ikekawa et al., 1968) ด้านการอักเสบ ด้านการแพ้ และด้านอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2007) ดังนั้นสารประกอบที่แยกได้จาก สารสกัดเห็ดกระถินพินานจึงแสดงการยับยั้งเส้นทางการส่งสัญญาณในเซลล์มะเร็งต่าง ๆ จากการศึกษาของ Fei-Fei Wang และคณะ พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพินานมีส่วนในการชักนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 5 ชนิด ได้แก่ HepG2 (มะเร็งตับ), AGS และ SGC-7901 (มะเร็งกระเพาะอาหาร), Hela (มะเร็งปากมดลูก) และ A549 (มะเร็งปอด) และสามารถ ปิดการทำงานของจุดตรวจสอบที่อยู่ระหว่างรอยต่อของระยะ G₀/G₁ ในวัฏจักรของเซลล์ส่งผลทำให้ เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Wang et al., 2018) ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดเห็ดกระถินพินานในเซลล์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่หลายชนิดเช่น SW480 และ HT1080 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพินานมีฤทธิ์ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งกระตุ้นการปลดปล่อย Cytochrome c เพื่อทำให้เกิด กระบวนการอะพอพโทซิสทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็นต้น (Li et al., 2004) มีการศึกษาอื่นได้ ทำการศึกษาในหนูทดลองและหลอดทดลองที่มีเซลล์ HT-29 พบว่าการศึกษาในหนูปริมาณและ น้ำหนักของเนื้องอกลดลง และผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์เพิ่มวัฏจักร เซลล์ในระยะ S อีกทั้งยังเพิ่มการแสดงออกของ cyclin D1, cyclin E และ CDK2 ในเซลล์ HT-29 (Li et al., 2011) และพบว่าสารสกัดเห็ดกระถินพินานมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HCT116 (Sohn et al., 2010) เป็นต้น

2.5 MTT assay

Tim Mosmann นำเสนอเทคนิค MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) ในปีพ.ศ. 2526 เป็นเทคนิคที่ใช้การวิเคราะห์สารสี เพื่อใช้ระบุการเพิ่มจำนวนเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถวิเคราะห์

ผลได้อย่างรวดเร็วโดยเครื่อง spectrophotometer plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Mosmann, 1983) โดยมีหลักการวิเคราะห์จากการลดลงของ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (สีเหลือง) (Sylvester, 2011) โดยสาร MTT จะสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ที่ยังมีชีวิตผ่านเข้าไปในไมโทคอนเดรียซึ่งมีเอนไซม์ succinate dehydrogenase จะทำงานโดยตัดโครงสร้างวงแหวน tetrazolium ของโครงสร้างเคมีของสาร MTT ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 5 แต่ผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานจะสะสมอยู่ในเซลล์เนื่องจากไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกไปได้ ดังนั้นจึงต้องเติมสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (Inayat-Hussain et al., 2009) จึงสามารถวิเคราะห์ปริมาณสีม่วงของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นในช่วง 500-600 นาโนเมตร (Kuate et al., 2017) ดังนั้นหากเป็นเซลล์ที่ตายแล้วจะเสียสภาพการสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase จึงไม่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของสาร MTT ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานได้

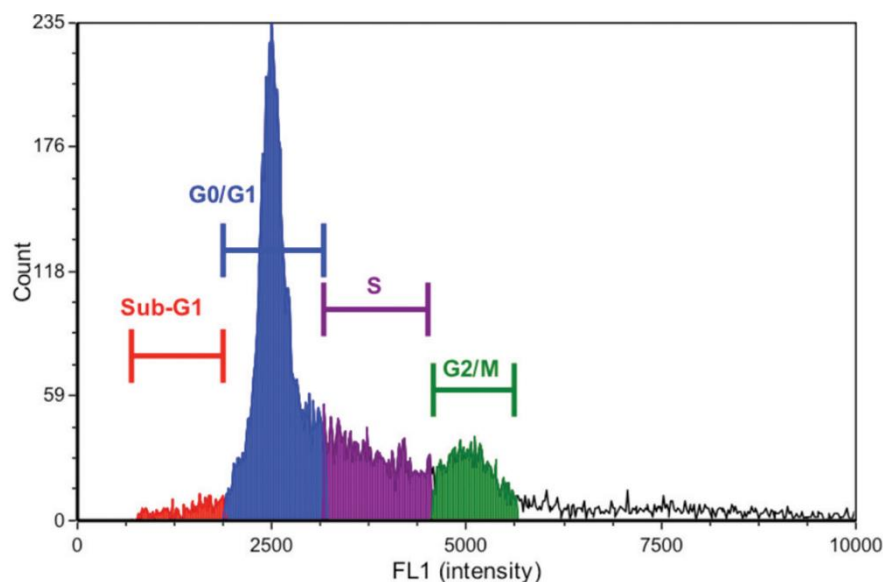


รูปที่ 5 การเปลี่ยนโครงสร้างสาร MTT โดยเอนไซม์ succinate dehydrogenase เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (Inayat-Hussain et al., 2009)

2.6 cell cycle analysis (PI assay)

กระบวนการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการแบ่งเซลล์ (Cell division) เรียกว่า วัฏจักรของเซลล์ โดยทั่วไปจะแบ่งออกเป็น 5 ระยะคือ G₀; ระยะพัก G₁; ระยะการเจริญเติบโต S; ระยะการจำลองตัวของดีเอ็นเอ G₂; ระยะการเตรียมพร้อมเพื่อเข้าสู่การแบ่งเซลล์ และ M; ระยะการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) (Israels and Israels, 2000) ดังนั้นการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยการหาร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรเซลล์โดยใช้เครื่องวัดขนาดเซลล์โดยใช้แสงเลเซอร์ (Flow cytometer) เพื่อกำหนดสัดส่วนของดีเอ็นเอในแต่ละช่วงของวัฏจักรเซลล์โดยดีเอ็นเอของมนุษย์สามารถย้อมได้ด้วยสีย้อมที่จับกับดีเอ็นเอได้แก่ PI (Propidium Iodide) ซึ่งสีย้อม PI จะไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ที่ยังมีชีวิตได้ (Darzynkiewicz,

2011) ดังนั้นการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์โดยการใช้สีย้อม PI จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการตรึงเซลล์โดยการใช้เอทานอล (Ethanol) ก่อนการย้อมด้วยสีย้อม PI หลังจากนั้นจำนวนดีเอ็นเอที่ถูกย้อมจะแสดงผลตามสัดส่วนการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้น (Chan et al., 2011) ดังแสดงในรูปที่ 6

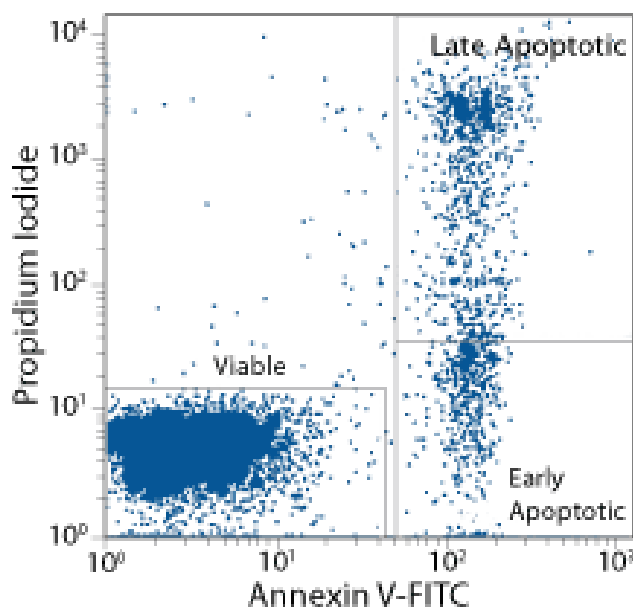


รูปที่ 6 ฮิสโตแกรมจำนวนประชากรเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรเซลล์ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer วิเคราะห์โดยโปรแกรม FCS Express 4 software (Chan et al., 2011)

2.7 Annexin V apoptosis assay

อะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นกลไกควบคุมการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (Programmed cell death) กระบวนการถูกควบคุมด้วยยีนที่เกี่ยวข้องซึ่งมีการตั้งกลไกและเปิดใช้งานเส้นทางภายในที่เฉพาะเจาะจงจนทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด เป็นกระบวนการที่มีเพื่อสร้างความสมดุลของจำนวนเซลล์ภายในร่างกาย เมื่อเทียบกับการตายของเซลล์แบบ necrotic ที่มีความรุนแรงและนำไปสู่การบาดเจ็บและการอักเสบของเซลล์ (Elmore, 2007) ดังนั้นการตรวจอะพอพโทซิสโดยการใช้ Flow cytometer สามารถวัดประชากรเซลล์ที่อยู่ระหว่างการตายของเซลล์ในระยะต่าง ๆ โดยในระยะแรกของการตายของเซลล์ (early apoptosis) phosphatidyl serine (Konno et al.) ได้ซึ่งเป็นฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ชนิดหนึ่งและเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จะเคลื่อนย้ายจากชั้นในไปชั้นนอก (PS externalization) และในระยะต่อมาเยื่อหุ้มเซลล์จะสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านอย่างสมบูรณ์ (Vermes et al., 1995) ดังนั้นจึงใช้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสนี้ทดสอบด้วย Flow cytometry โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของสีย้อมคือ Annexin V ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติจับการอย่างจำเพาะกับ PS บนเยื่อหุ้มเซลล์ และ PI ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติสามารถแทรกเข้าไปในเซลล์และไปติดดีเอ็นเอ

ที่เมื่อเกิดกระบวนการอะพอโทซิสแล้วจะเกิดการแตกหักหรือเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) โดยสามารถตรวจสอบอะพอโทซิสระยะต่าง ๆ ได้โดยการแบ่งแยกเซลล์ที่ติดเฉพาะสีเขียว Annexin V เป็นเซลล์กลุ่ม early apoptosis (annexin V - /PI +) ส่วนกลุ่มเซลล์ที่ติดสีเขียวสองสีเป็นเซลล์กลุ่ม late apoptosis (annexin V + /PI +) (Cornelissen et al., 2002) ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ข้อมูลแบบสองตัวแปรแสดงจำนวนประชากรเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการอะพอโทซิสโดย viable (annexin V - /PI -) Early Apoptosis (annexin V - /PI +) และ Late Apoptosis (annexin V + /PI +)

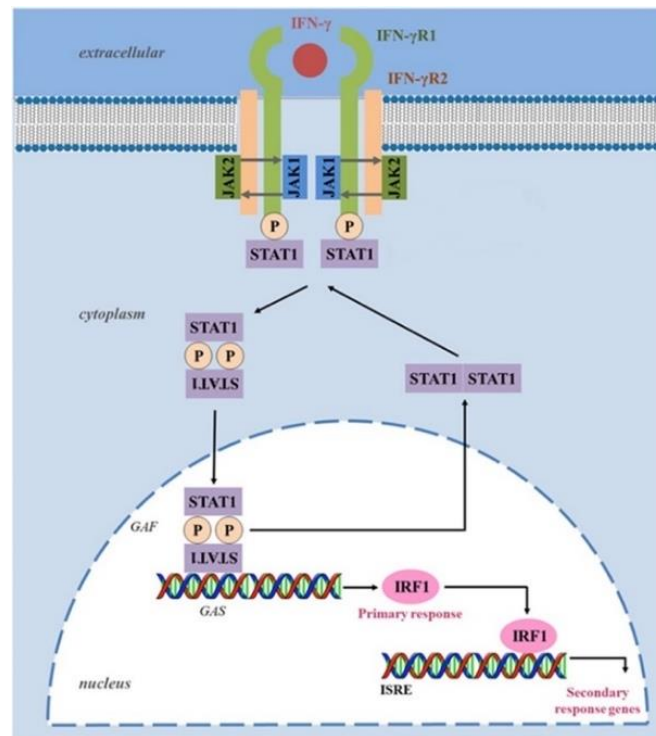
2.8 Real Time polymerase chain reaction (real-time PCR)

real-time PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและสามารถตรวจวัดการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอที่สนใจได้ในทุก ๆ รอบของการเพิ่มจำนวน (CT) ถึงแม้ว่าขณะนั้นปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ก็ตาม โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณแสงเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมาซึ่งปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบของการเพิ่มจำนวน (Ferguson et al., 2011) จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการหาระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer); ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ จำนวน 18-22 เบสทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ของเป้าหมาย (double-stranded DNA (dsDNA)) ควรออกแบบให้ melting temperature (Sorenson and Eastman) อยู่ในช่วง 50-75°C (Mackay et al., 2002) โดยบริเวณนี้จะถูกเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณโดยหลักการ PCR ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในทุก ๆ รอบนี้สามารถตรวจสอบการเพิ่มจำนวนได้โดยอาศัยการติดตามเรืองแสง (fluorescent

probe) ซึ่งสารเรืองแสงที่ได้รับความนิยมได้แก่ SYBR Green สามารถจับดีเอ็นเอสายคู่และส่งสัญญาณเรืองแสงที่ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 494 และ 521 นาโนเมตรตามลำดับ TaqMan probes รูปร่างเป็นสายเดี่ยวที่บริเวณปลาย 5' ของสายมีสี reporter dye ติดอยู่และปลาย 3' มีสี quencher dye ใช้หลักการคายพลังงานออกมาในรูปแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Soheili and Samiei, 2005) วิเคราะห์ผลโดยการหาปริมาณสัมพันธ์ ($\Delta\Delta CT$) ระหว่างยีนอ้างอิง (reference gene) มักเป็น Housekeeping genes เช่น glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) β -actin และ 18S rRNA กับยีนเป้าหมาย (target gene) (Rao et al., 2013)

2.9 ยีน Interferon gamma receptor 1 (*IFN- γ R1*)

ยีน *IFNGR1* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของมนุษย์ตำแหน่งบนแขนข้างยาว ตำแหน่งที่ 3 แถบที่ 2 แถบย่อยที่ 3 (6q23.3) เมื่อถูกแปลรหัสได้โปรตีน *IFN- γ R1* ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่บนผิวเซลล์ ที่สามารถจับกันอย่างจำเพาะกับไซโตไคน์ชนิด *IFN- γ* ในสภาวะปกติที่เซลล์ภายในร่างกายไม่ถูกรุกราน *IFN- γ R1* จะอยู่บนผิวเซลล์แบบ monomer คู่กับโปรตีนตัวรับอีกชนิดหนึ่งคือ interferon gamma receptor 2 (*IFN- γ R2*) หากมีการเคลื่อนที่ของ *IFN- γ* เข้ามาที่บริเวณผิวเซลล์ ตัวรับสัญญาณที่มี *IFN- γ R1* และ *IFN- γ R2* โมเลกุลของ *IFN- γ* จะกระตุ้นให้ *IFN- γ R1* และ *IFN- γ R2* ที่อยู่บนผิวเซลล์แบบ monomer เคลื่อนที่เข้ามาประกอบกันเป็นโครงสร้างแบบ heterodimer (*IFN- γ R1/2*) ดังแสดงในรูปที่ 8 ทำให้สามารถเข้าไปจับกับ *IFN- γ* ได้อย่างจำเพาะ (Bernabei et al., 2001) ถ้า *IFN- γ* เข้ามาจับกับตัวรับสัญญาณ (*IFN- γ R1/2*) ที่อยู่บนผิวเซลล์มะเร็ง *IFN- γ* จะชักนำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านเส้นทาง JAK / STAT ทำให้เกิดกลไกการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อ *IFN- γ* ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและชักนำการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (Majoros et al., 2017)

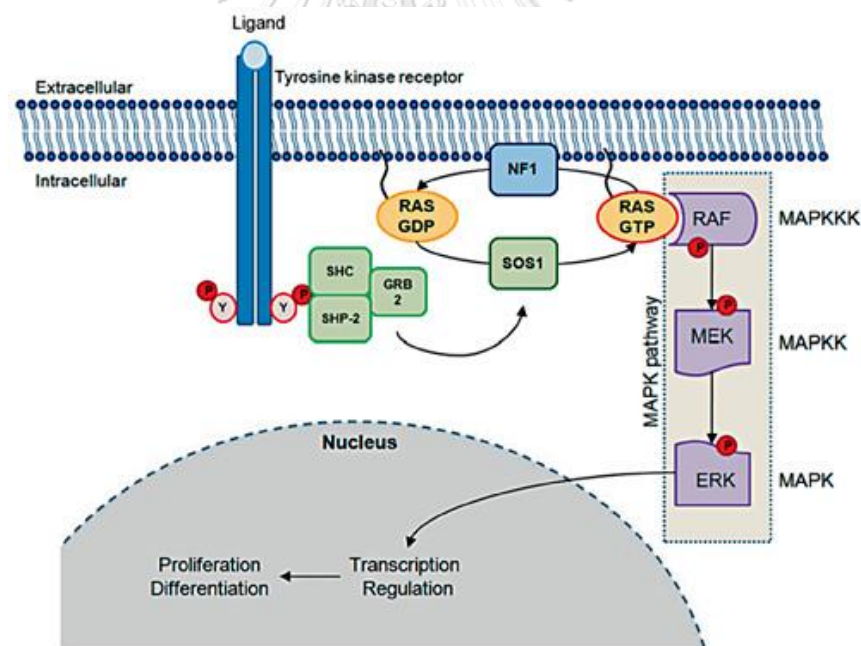


รูปที่ 8 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยทำงานผ่าน IFN- γ signaling pathway (เส้นทาง JAK / STAT) (Castro et al., 2018)

2.10 ยีน KRAS proto-oncogene (KRAS)

ยีน *KRAS* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ของมนุษย์ตำแหน่งบนแขนข้างสั้น ตำแหน่งที่ 1 แถบที่ 2 แถบย่อยที่ 1 (12p12.1) เมื่อถูกแปลรหัสได้โปรตีน K-RAS ซึ่งมีหน้าที่เสมือนสวิตช์ที่ถูกเปิดหรือปิด หรือโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณจากภายนอกเซลล์เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ ซึ่งจะมีการทำงานได้โดยโมเลกุล GTP และ GDP โดยมีเอนไซม์ GTP-binding proteins (GTPase) เป็นตัวกระตุ้นการ hydrolysis ของ GTP ให้เปลี่ยนเป็น GDP K-RAS จะปิดสวิตช์ กล่าวคือจะไม่มีการส่งสัญญาณไปยังนิวเคลียสของเซลล์ กลับกันหาก GDP เปลี่ยนเป็น GTP K-RAS จะเปิดสวิตช์จึงเกิดการส่งสัญญาณไปยังนิวเคลียสของเซลล์ (Schwab, 2001) โดยโปรตีน K-RAS เป็นส่วนหนึ่งของ RAS-MAPK pathway ซึ่งเป็นเส้นทางการส่งสัญญาณที่สั่งให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว หรือเพิ่มจำนวน การอยู่รอดของเซลล์ การเคลื่อนที่ และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) อีกทั้ง K-RAS ยังจัดว่าเป็น proto-oncogene หรือยีนก่อมะเร็ง กล่าวคือหากยีน *KRAS* เกิดการกลายพันธุ์ จะส่งผลให้เซลล์นั้นมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยไม่สามารถควบคุมได้และก่อให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด

(Kukongviriyapan and Buranrat, 2009) การทำงานของโปรตีน K-RAS ผ่าน RAS-MAPK pathway โดยเริ่มจาก Epidermal growth factor receptor (EGFR) เป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่บนผิวเซลล์ สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยตัวกระตุ้นหลายชนิดคือ epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), heparin-binding EGF, amphiregulin, betacellulin, epiregulin และ neuregulin G2b สารหรือฮอร์โมนเหล่านี้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านทางหลายเส้นทางการส่งสัญญาณเช่น phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt, mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospholipase C γ (PLC- γ) เป็นต้น และเกิดการส่งสัญญาณเป็นลำดับ ผ่าน nucleotide exchange factor Son of Sevenless (SOS) และ growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น RAS (H-, K-, N-isotypes; guanine nucleotide-binding protein) โดยการกระตุ้นให้ GDP เป็น GTP ทำให้เกิดการทำงาน ส่งผลไปกระตุ้นให้ Raf kinases (ARAF, BRAF and CRAF) ซึ่งทำหน้าที่เป็น MAPK kinase kinase (MAPKKK) เพื่อกระตุ้นการทำงานของ MEK1 และ MEK2 หรือการทำงานของ ERK1 และ ERK2 kinases เพื่อส่งสัญญาณต่อเข้าไปภายในนิวเคลียส (Santarpia et al., 2012)



รูปที่ 9 การส่งสัญญาณของโปรตีน K-RAS ผ่านเส้นทาง RAS-MAPK เพื่อส่งสัญญาณเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์เพื่อสั่งให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว หรือเพิ่มจำนวน (Jorge et al., 2009)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 6 12 and 96 well plate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Autoclave
- CO₂ Incubators (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *DxFLEX* Flow cytometer (Beckman Coulter, USA)
- Flask cell culture T25 and T75 with filter (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hemocytometer
- Hot air oven (*Memmert*, Germany)
- Laminar Flow Hood (Heal Force integrates R&D, China)
- Microscope (*Nikon*, Japan)
- Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA), Nanodrop 2000/2000c Software
- PCR plate (96-well)
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, USA), QuantStudio™ Design & Analysis Software
- Serological pipette 2, 5, 10 and 25 ml (*SPL Life Sciences*, USA)
- Soxhlet extractor
- Sterile Bottle Top Filters (0.20 µm Pore 33 mm PES membrane) (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)
- VarioskanTM LUX multimod microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA),
SkanIt RE 5.0 Software, SoftMax Pro 6.5.1
- Water bath (*Memmert*, Germany)
- กระจกบอทวง
- ขวดแก้ว
- ขวดรูปชมพู
- เครื่องซั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Benchmark Scientific, USA)
- ตู้ควบคุมความเย็น -4 °C (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ตู้แช่แข็ง -20 °C (Revco Industries Inc, USA)
- ตู้แช่แข็ง -80 °C (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ปีกเกอร์
- ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip)
- หลอด Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- หลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

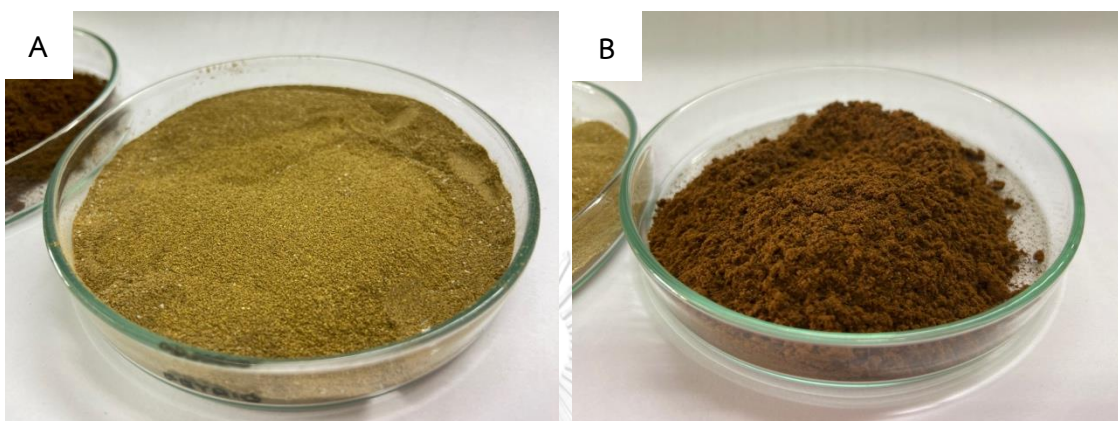
3.2 สารเคมี

- 10X Binding Buffer Concentrate (Ambion[®], Life Technologies, USA)
- 75% Ethanol
- Annexin V- DY-634 PI Apoptosis Staining (Abcam, UK)

- Antibiotic Antimycotic Solution (100x)
- Capital™ qPCR green (Biotechrabbit, Germany)
- Capital™ qPCR green (Biotechrabbit, Germany)
- cDNA Synthesis Kit (Biotechrabbit, Germany)
- Chloroform
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Emplura®, Germany)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) powder (Grand Island Biological Company; GIBCO)
- Fetal Bovine Serum (10x) (FBS)
- Isopropanol
- kit cDNA Synthesis Kit (biotechrabbit, Germany)
- LE Agarose
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, USA)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Prodidium Iodide (PI) Staining Solution (*BD Biosciences, Canada*)
- RNase A (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sodium carbonate (Na₂CO₃)
- TRIzol® Reagent (Ambion®, Life Technologies, USA)
- Trypan Blue solution (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin-EDTA solution

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มีทั้งหมด 2 สูตรได้แก่ สูตรตำรับที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบหลักร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ เช่น เหง้าข้าวเย็นเหนือ และเหง้าข้าวเย็นใต้ เป็นต้น และสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน ตัวอย่างอยู่ในรูปของผงละเอียดดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ผงตัวอย่างสูตรตำรับและสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน
(A) ตัวอย่างสูตรตำรับ (B) ตัวอย่างสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน

3.4 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองและการเลี้ยงเซลล์

การศึกษาค้างนี้สนใจศึกษาความสามารถในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผ่านกลไกต่างๆ ของสารสกัด 2 สูตร โดยเซลล์ที่เลือกมาศึกษาประกอบไปด้วยเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้แก่ เซลล์ PC-3 (มะเร็งต่อมลูกหมากที่แพร่กระจายไปยังกระดูก) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ 3 ชนิดได้แก่ เซลล์ HCT116 (พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 13 ของ RAS proto-oncogene), เซลล์ SW620 (พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 273 ของยีน *p53*), เซลล์ HT-29 (พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 273 ของยีน *p53* มีการแสดงออกของ N-myc proto-oncogene) โดยเซลล์ทั้งหมดถูกเลี้ยงใน complete DMEM (cDMEM) ประกอบด้วย Antibiotic Antimycotic Solution: 1%, FBS: 10% และ DMEM: 89% ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้ CO₂ incubator ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การสกัดสารตัวอย่าง

เริ่มจากการอบผงตัวอย่างสูตรยา 2 สูตรที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างในสัดส่วนตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 4 กรัมต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร สกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor (Rajha et al., 2012) ใช้เวลาสกัดทั้งสิ้น 6 ชั่วโมงแบ่งเป็น 2 รอบ รอบละ 3 ชั่วโมง จึงได้สารสกัดในรูปของสารละลายสีน้ำตาลและนำสารละลายกรองด้วยฟิวเตอร์กรองขนาด 0.22

ไมโครเมตร ต่อมาหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดโดยนำสารสกัดมาระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้งของตะกอนที่เหลือจากการระเหยน้ำออก หลังจากนั้นเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่ตู้แช่ 4 °C

3.5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 96 หลุมโดยควบคุมจำนวนเซลล์ 3,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์เลี้ยงในตู้ 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมรวมกับสารสกัดแต่ละสูตรลงในหลุมหลังจากที่ดูดอาหารเก่าทิ้ง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับสารสกัดสูตรตำรับมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 75 ถึง 650 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเห็ดกระถินผานมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 200 ถึง 3,750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีซิสพลาตินเป็นชุดควบคุมบวกที่ความเข้มข้น 2.12 ถึง 4.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น และเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเป็นชุดควบคุมลบ โดยแต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 4 ซ้ำ หลังจากใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมรวมกับสารสกัดลงไปแล้วนำเซลล์เลี้ยงใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 และ 72 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ PC-3 เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดมาประเมินระดับการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับ DMEM ในสัดส่วน 1:9 และบ่มที่ 37°C incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้งและทำการละลายผลึกฟอร์มazan สีม่วงด้วย DMSO และวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate reader) และจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรที่วัดได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) เพื่อใช้คำนวณหา IC₅₀ ในสารสกัดสูตรตำรับ และสารสกัดเห็ดกระถินผาน เพื่อใช้ค่าความเข้มข้นของ IC₅₀ ที่คำนวณได้จากสมการเชิงเส้นของกราฟเส้นตรงในการทดสอบวัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิส และการแสดงออกของยีนต่อไป

3.5.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์

3.5.3.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 6 หลุมโดยควบคุมจำนวนเซลล์ 150,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์เลี้ยงในตู้ 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดเห็ดกระถินผานใช้ความเข้มข้นตามค่า IC₅₀ ที่คำนวณได้จากการทดสอบหัวข้อ 3.5.2 รวมถึงชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ต่อมนำเซลล์เลี้ยงใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 และ

72 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ PC-3 เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเก่าทิ้ง ทำการแยกเซลล์ออกจากกันโดยใช้ทริปซิน (Trypsinization) และเก็บเซลล์ในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.5.3.2 การเตรียมเซลล์สำหรับวัดจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

นำเซลล์ในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนบนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนเซลล์ ทำการล้างทริปซินออกด้วย 1X PBS ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรพร้อมกับย้ายเซลล์ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรพร้อมกับนำไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยง RCF 300g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการ fixation เซลล์ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรแช่เซลล์ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมงในตู้แช่ -4°C จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ค่าความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนของ 70% Ethanol ทิ้งและล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงที่ค่าความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วน 1X PBS ทิ้งและเติม RNase A 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรพร้อมกับย้ายเซลล์ลง cell strainer flow tubes จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย PI Staining (BD Biosciences, Canada) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

3.5.3.3 การศึกษาวัฏจักรเซลล์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อจากหัวข้อ 3.5.3.2 หลังจากครบเวลาบ่มเซลล์ด้วย PI Staining ทำการเติม RNase A 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 400 ไมโครลิตรก่อนนำไปวัดจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ด้วยเครื่อง DxFLEX Flow cytometer ต่อมานำค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ของชุดทดลองที่ได้รับสารสกัด และชุดควบคุมลบที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent T-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 28

3.5.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

3.5.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 6 หลุมโดยควบคุมจำนวนเซลล์ 150,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์เลี้ยงในตู้ 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าทิ้งโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดแต่ละสูตรใส่ลงในแต่ละหลุม โดยสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดเห็ดกระถินพินานใช้ความเข้มข้นตามค่า IC₅₀ ที่คำนวณได้จากการทดสอบหัวข้อ 3.5.2 รวมถึงชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) โดยแต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ต่อมานำเซลล์เลี้ยงใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 และ 72 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ PC-3 เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเก่าเก็บในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการแยกเซลล์ออกจากกันโดยใช้ทริปซินและเก็บเซลล์ในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.5.4.2 การเตรียมเซลล์สำหรับวัดจำนวนประชากรเซลล์ที่เข้าสู่กลไกอะพอโทซิส

นำเซลล์ในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนบนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนเซลล์ ทำการล้างทริปซินออกด้วย 1X PBS ปริมาตร 1,000 μ l พร้อมกับย้ายเซลล์ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรพร้อมกับการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยง RCF 300g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 1X Binding Buffer Concentrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรพร้อมกับย้ายเซลล์ลง cell strainer flow tubes จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Annexin V- DY-634 PI Apoptosis Staining (Abcam, UK) อย่างละ 5 ไมโครลิตรบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

3.5.4.3 การศึกษาความสามารถในการชักนำเซลล์เข้าสู่กลไกอะพอโทซิส

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อจากหัวข้อ 3.5.4.2 หลังจากครบเวลาบ่มเซลล์ด้วย Annexin V และ PI Staining ทำการเติม 1X Binding Buffer Concentrate ปริมาตร 400 ไมโครลิตรก่อนนำไปวัดจำนวนประชากรเซลล์ในแต่ละระยะของกลไกอะพอโทซิส live early apoptosis late apoptosis และ necrosis ด้วยเครื่อง DxFLEX Flow cytometer ต่อมานำค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ในแต่ละระยะของกลไกอะพอโทซิสมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ของแต่ละระยะในกลไกอะพอโทซิสของชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด และชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent T-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 28

3.5.5 การทดสอบการแสดงออกของยีน

3.5.5.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 12 หลุมโดยควบคุมจำนวนเซลล์ 50,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์เลี้ยงในตู้ 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูอาหารเก่าทิ้งโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมรวมกับสารสกัดแต่ละสูตรใส่ลงในแต่ละหลุม โดยสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดเห็ดกระถินพิมานใช้ความเข้มข้นตามค่า IC₅₀ ที่คำนวณได้จากการทดสอบหัวข้อ 3.5.2 และชุดควบคุม โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำทั้งสิ้น 4 ซ้ำ ต่อมานำเซลล์เลี้ยงใน 5% CO₂ incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ PC-3 และ 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเก่าทิ้ง เติม TRIzol Reagent (Ambion, USA) หลุมละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำเพรทแซในตู้แช่ -4°C เป็นเวลา 5 นาที ต่อมานำเซลล์ที่อยู่ใน TRIzol แต่ละหลุมใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรนำเซลล์เก็บในตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลา 1 คืน (สามารถเก็บได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

3.5.5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เริ่มจากการนำเซลล์ออกจากตู้แช่แข็ง -20°C เมื่อเซลล์ละลายแล้วเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจากนั้นบ่มในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยง RCF 12,000g ควบคุมอุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนี้เตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแช่รอในกล่องน้ำแข็ง หลังปั่นเหวี่ยงเสร็จสารละลายในหลอดจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนทำการดูดส่วนใสชั้นบนสุดลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่แช่รอในกล่องน้ำแข็ง จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจากนั้นบ่มในกล่องน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ค่าแรงเหวี่ยง RCF 12,000g ควบคุมอุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม 75% Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงค่าแรงเหวี่ยง RCF 7,500g ควบคุมอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำให้หลอดแห้งโดยการคว่ำหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีหรือจนกว่าหลอดจะแห้งสนิท เมื่อหลอดแห้งสนิทเติมน้ำ type I ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดแช่ใน water bath อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (optical density; OD) ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA) เก็บตัวอย่างอาร์เอ็นเอของแต่ละชุดการทดลองไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80°C

3.5.5.3 การสกัด complementary DNA (cDNA)

เริ่มจากการนำค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่วัดได้มาคำนวณและเตรียมสารละลายอาร์เอ็นเอให้มีปริมาณความเข้มข้นเท่ากันในแต่ละชุดการทดลองโดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 500-2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ชุด kit cDNA Synthesis Kit (biotechrabbit, Germany) เพื่อสังเคราะห์ cDNA และเก็บ cDNA ของแต่ละชุดการทดลองไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR

3.5.5.4 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *IFNGR1* และยีน *KRAS*

ออกแบบไพรเมอร์ของยีน *IFNGR1* และยีน *KRAS* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/>) และใช้โปรแกรม Primer 3 (<https://www.primer3plus.com/>) สำหรับออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ของยีน glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) และยีน marker of proliferation Ki-67 (*MKI67*) โดยใช้เป็นยีนอ้างอิงซึ่งได้อ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษาของ Chalertpet et al., 2019 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และ *KRAS* โดยมียีน *GAPDH* และ *MKI67* เป็นยีนอ้างอิง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Tm (°C)	%CG content	อ้างอิง
Forward <i>IFNGR1</i> primer	AATTGGACCACCTAAACTGG	53	45%	-
Reverse <i>IFNGR1</i> primer	AGTTGTAACACCCACACAT	53	45%	-
Forward <i>KRAS</i> primer	GGATATTCTCGACACAGCAGGTC	57.1	52%	-
Reverse <i>KRAS</i> primer	GCTAAGTCCTGAGCCTGTTTTGTG	57.4	50%	-
Forward <i>MKI67</i> primer	CCACACTGTGTCGTCGTTTG	53.8	55%	(Chalertpet et al., 2019)
Reverse <i>MKI67</i> primer	CCGTGCGCTCATCCATTC	52.6	61%	Chalertpet et al. (2019)
Forward <i>GAPDH</i> primer	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCGA	57.1	52%	Chalertpet et al. (2019)
Reverse <i>GAPDH</i> primer	CCTGTTCGTGTAGCCAAATTCGT	55.3	48%	Chalertpet et al. (2019)

3.5.5.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อจากหัวข้อ 3.5.5.3 นำ cDNA ของแต่ละชุดการทดลองออกจากตู้แช่แข็ง -80°C ทำ real-time PCR โดยการศึกษาเลือกใช้สารฟลูออเรสเซนต์ SYBR Green ของชุด Capital™ qPCR green (Biotech rabbit, Germany) ในการตรวจวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำต่อหนึ่งยีน หลังจากได้ผลการวิเคราะห์ด้วย

เครื่อง QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่า CT ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองและแต่ละยีนมาคำนวณระดับการแสดงออกโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีการแสดงออกของยีน *GAPDH* เป็นชุดอ้างอิง ใช้วิธี $\Delta\Delta CT$ ในการคำนวณระดับการแสดงออกของแต่ละยีน และนำค่าร้อยละการแสดงออกของยีนของแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด และชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Independent T-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 28

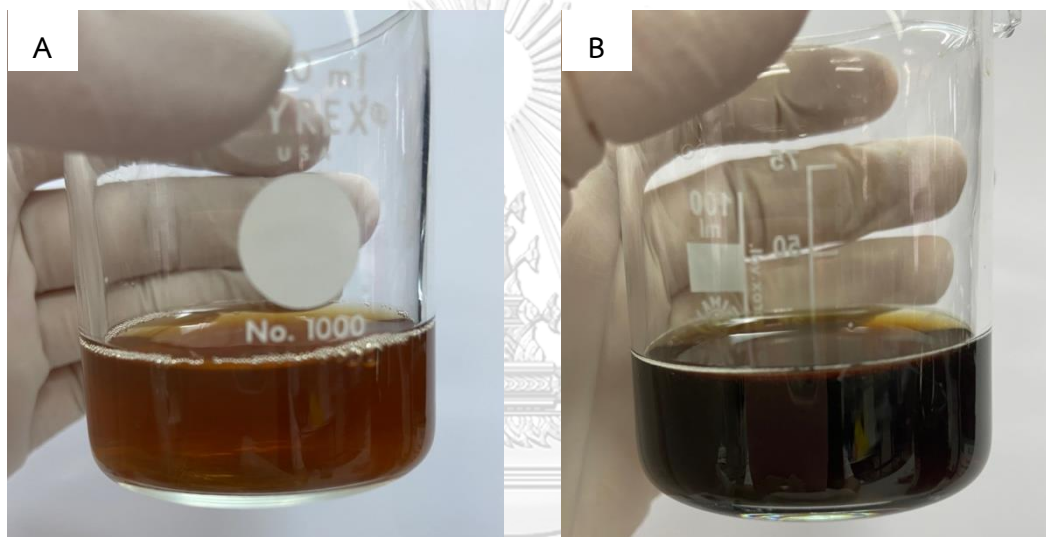


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดสารจากผงตัวอย่างทั้ง 2 สูตร และความเข้มข้นของสารสกัด

สารสกัดที่สกัดได้เป็นสารละลายใสสีน้ำตาลทั้ง 2 สูตรแต่สารสกัดให้ดกระถินพิมานมีสีน้ำตาลเข้มกว่าสารสกัดสูตรตำรับดังแสดงในรูปที่ 11 และเมื่อนำสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานมาวัดความเข้มข้นโดยการชั่งน้ำหนักตะกอนแห้งหลังจากระเหยน้ำออกจนหมด จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับเท่ากับ 16,300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานมีความเข้มข้น 42,700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 11 สารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน
(A) ตัวอย่างสูตรตำรับ (B) ตัวอย่างสูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน

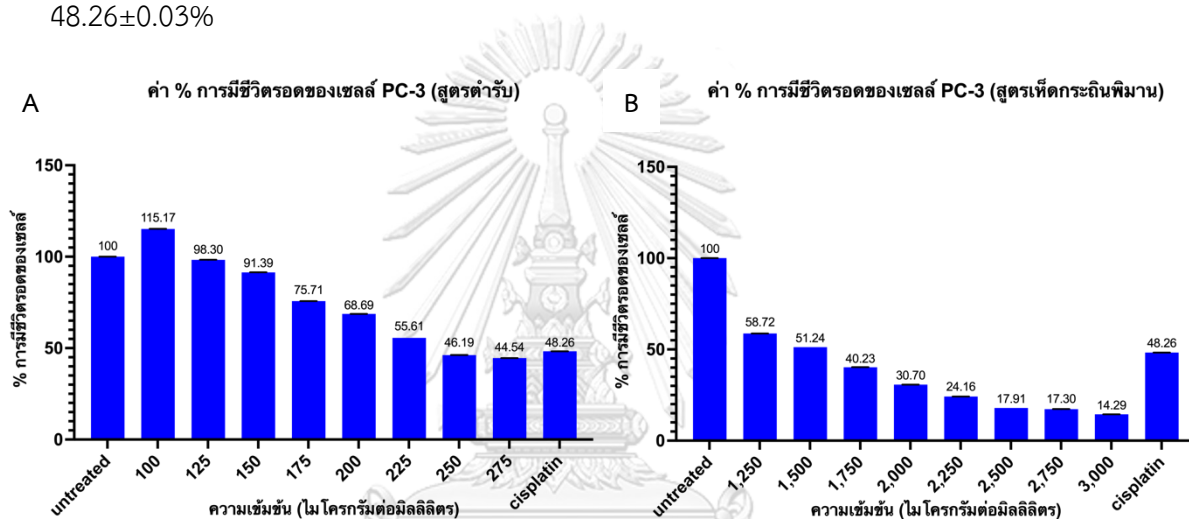
4.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 และ PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน ในหัวข้อนี้ได้ทำการคำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดทั้ง 2 สูตรข้างต้นโดยผลการทดสอบในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อย่อยตามชนิดของเซลล์ดังนี้

4.2.1 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน

เซลล์ PC-3 เมื่อได้รับสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้น 100 125 150 175 200 225 250 และ 275 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัด

สูตรตำรับที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 115.17 ± 0.11 98.30 ± 0.02 91.39 ± 0.09 75.71 ± 0.03 68.69 ± 0.04 55.61 ± 0.01 46.19 ± 0.06 และ $44.54 \pm 0.03\%$ ตามลำดับ และเซลล์ PC-3 เมื่อได้รับสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 1,250 1,500 1,750 2,000 2,250 2,500 2,750 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 58.72 ± 0.04 51.24 ± 0.02 40.23 ± 0.05 30.70 ± 0.04 24.16 ± 0.03 17.91 ± 0.03 17.30 ± 0.03 และ $14.29 \pm 0.03\%$ ตามลำดับดังแสดงในรูป 12 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ $48.26 \pm 0.03\%$

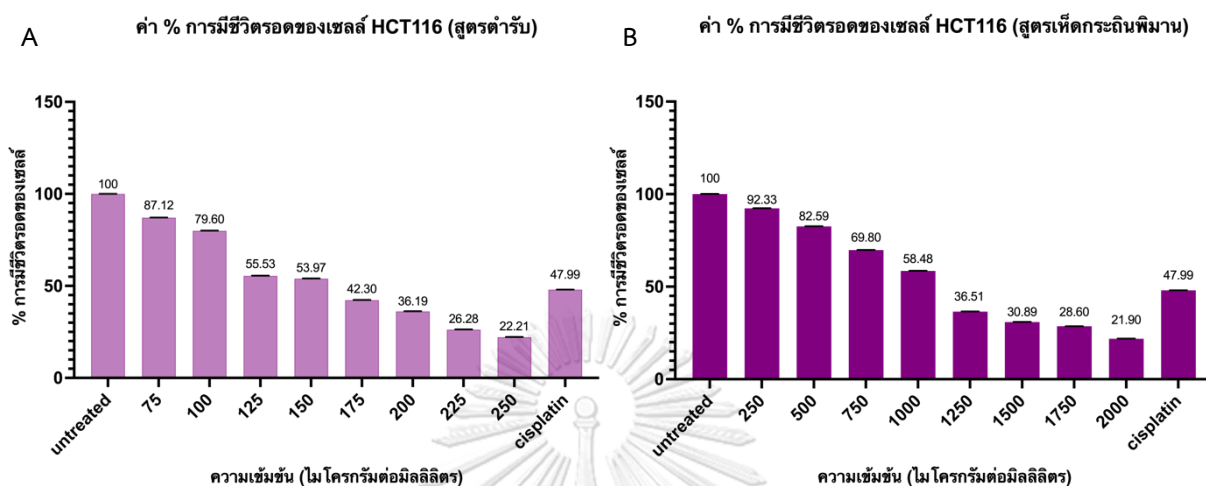


รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ PC-3 หลังจากได้รับ (A) สารสกัดสูตรตำรับและ (B) สูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน

เซลล์ HCT116 เมื่อได้รับสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้น 75 100 125 150 175 200 225 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 87.12 ± 0.04 79.60 ± 0.10 55.53 ± 0.08 53.97 ± 0.13 42.30 ± 0.07 36.19 ± 0.06 26.28 ± 0.07 และ $22.21 \pm 0.05\%$ ตามลำดับ และเซลล์ HCT116 เมื่อได้รับสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 250 500 750 1,000 1,250 1,500 1,750 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 92.33 ± 0.05 82.59 ± 0.05 69.80 ± 0.06 58.48 ± 0.08 36.51 ± 0.06 30.89 ± 0.05

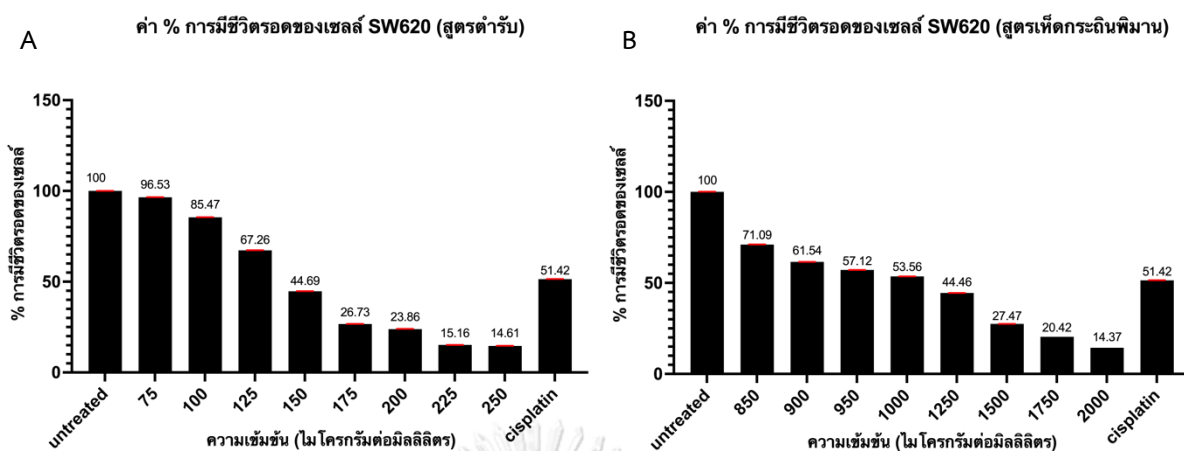
28.60±0.05 และ 21.90±0.05% ตามลำดับดังแสดงในรูป 13 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 1.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 47.99±0.04%



รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ HCT116 หลังจากได้รับ (A) สารสกัดสูตรตำรับและ (B) สูตร 100% เติดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.3 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เติดกระถินพิมาน

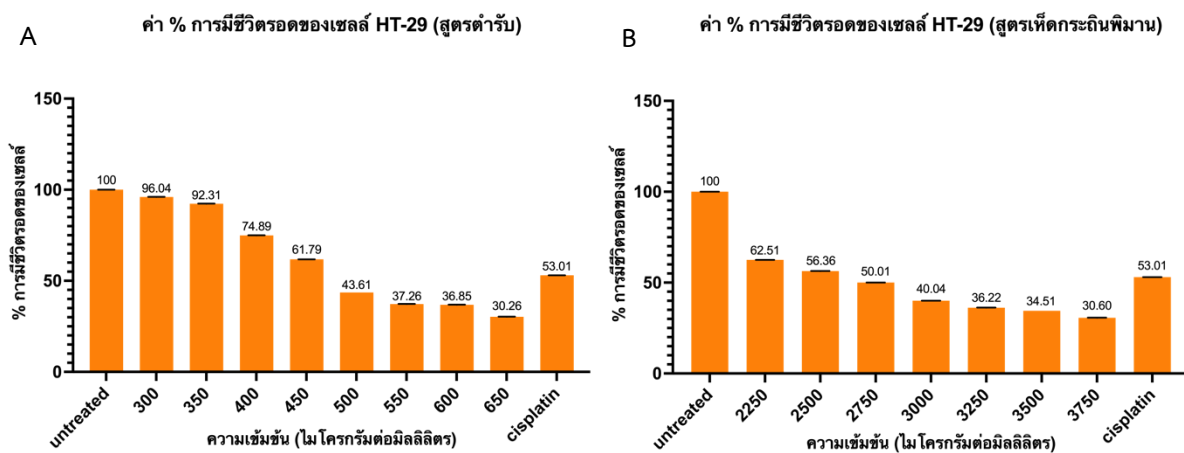
เซลล์ SW620 เมื่อได้รับสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้น 75 100 125 150 175 200 225 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 96.53±0.02 85.47±0.07 67.26±0.09 44.69±0.09 26.73±0.07 23.86±0.14 15.16±0.04 และ 14.61±0.05% ตามลำดับ และเซลล์ SW620 เมื่อได้รับสารสกัด 100% เติดกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 850 900 950 1,000 1,250 1,500 1,750 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสารสกัด 100% เติดกระถินพิมานที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 71.09±0.04 61.54±0.04 57.12±0.04 53.56±0.05 44.46±0.04 27.47±0.06 20.42±0.02 และ 14.37±0.02% ตามลำดับดังแสดงในรูป 14 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 51.42±0.04%



รูปที่ 14 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ SW620 หลังจากได้รับ (A) สารสกัดสูตรตำรับและ (B) สูตร 100% หีดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.4 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% หีดกระถินพิมาน

เซลล์ HT-29 เมื่อได้รับสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้น 300 350 400 450 500 550 600 และ 650 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 96.04 ± 0.06 92.31 ± 0.10 74.89 ± 0.08 61.79 ± 0.04 43.61 ± 0.03 37.26 ± 0.03 36.85 ± 0.06 และ $30.26 \pm 0.08\%$ ตามลำดับ และเซลล์ HT-29 เมื่อได้รับสารสกัด 100% หีดกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 2,250 2,500 2,750 3,000 3,250 3,500 และ 3,750 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดสารสกัด 100% หีดกระถินพิมานที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 62.51 ± 0.05 56.36 ± 0.04 50.01 ± 0.04 40.04 ± 0.04 36.22 ± 0.05 34.51 ± 0.01 และ $30.60 \pm 0.09\%$ ตามลำดับดังแสดงในรูป 15 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 4.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ $53.01 \pm 0.01\%$

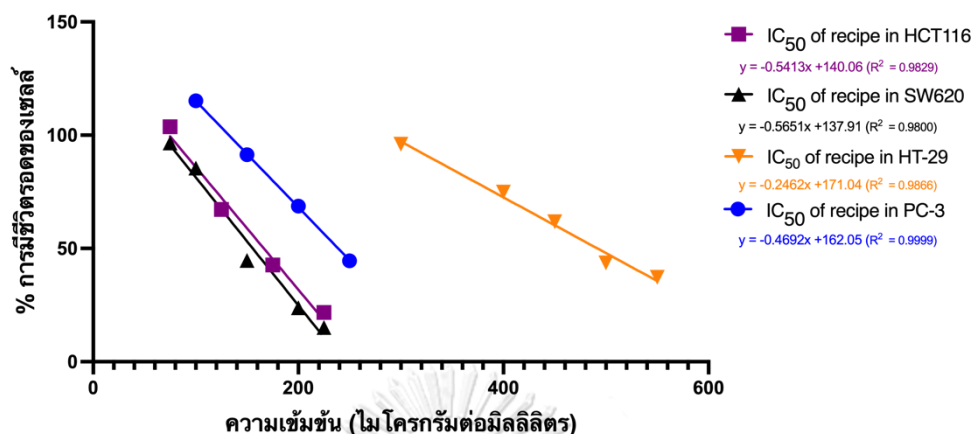


รูปที่ 15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตรอดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์ HT-29 หลังจากได้รับ (A) สารสกัดสูตรตำรับและ (B) สูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.5 ผลการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์

ผลการประเมินวิเคราะห์ที่ได้จากการนำค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 ในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารสกัดนำมาพล็อตกราฟการถดถอยเชิงเส้น (simple linear regression) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ ดังแสดงในรูป 16 ทำให้ได้สมการถดถอยอย่างง่ายใช้ในการคำนวณหาค่า IC_{50} เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับโดยพบว่าค่า IC_{50} ในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 เท่ากับ 239 167 156 และ 492 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรดังแสดงในตาราง 2 จากผลการทดสอบทำให้ทราบว่าสารสกัดสูตรตำรับมีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และมะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 มากที่สุดตามด้วยเซลล์ HCT116 และ HT-29 ตามลำดับ

ค่า IC₅₀ ของสารสกัดสูตรตำรับ



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับในเซลล์ HCT116 (สีม่วง) SW620 (สีดำ) HT-29 (สีส้ม) และ PC-3 (สีน้ำเงิน) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29

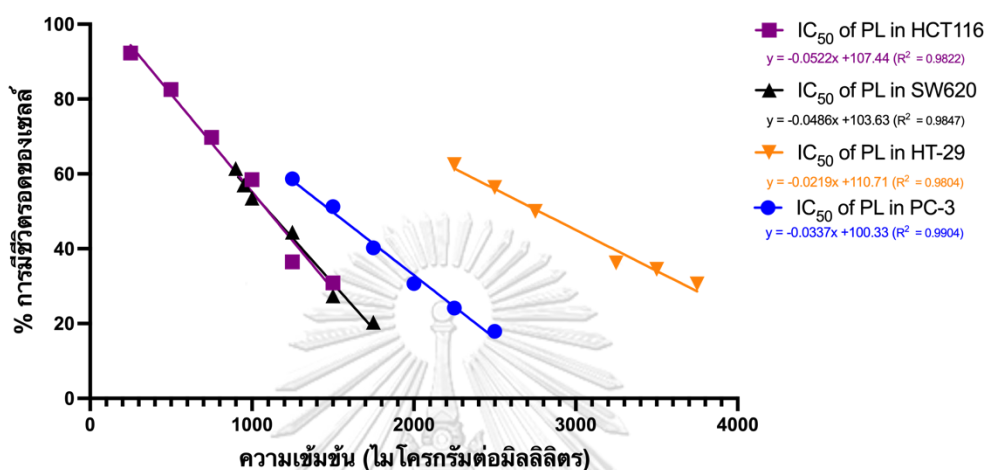
Cells	IC ₅₀ (µg/ml)	simple linear regression	R-squared
PC-3	239	$y = -0.4692x + 162.05$	0.9999
SW620	156	$y = -0.5651x + 137.91$	0.9800
HCT116	167	$y = -0.5413x + 140.06$	0.9829
HT-29	492	$y = -0.2462x + 171.04$	0.9866

4.2.6 ผลการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับ 100% ให้ตรวจประเมินปริมาณในการลดการมีชีวิตของเซลล์

ผลการประเมินวิเคราะห์ที่ได้จากการนำค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 ในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารสกัดนำมาพล็อตกราฟการถดถอยเชิงเส้น (simple linear regression) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ ดังแสดงในรูป 17 ทำให้ได้สมการถดถอยอย่างง่ายเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า IC₅₀ เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับโดยพบว่าค่า IC₅₀ ในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 เท่ากับ 1,494 1,100 1,104 และ 2,772 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรดังแสดงในตาราง 3 จากผลการทดสอบทำให้ทราบว่าสารสกัดสูตรตำรับมีความสามารถใน

การลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มากที่สุดตามด้วยเซลล์ SW620 และ HT-29 ตามลำดับ

ค่า IC₅₀ ของสารสกัดสูตรเห็ดกระถินพิมาน



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานในเซลล์ HCT116 (สีม่วง) SW620 (สีดำ) HT-29 (สีส้ม) และ PC-3 (สีน้ำเงิน) ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า IC₅₀ สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29

Cells	IC ₅₀ (µg/ml)	simple linear regression	R-squared
PC-3	1,492	$y = -0.0337x + 100.33$	0.9904
HCT116	1,100	$y = -0.0522x + 107.44$	0.9822
SW620	1,104	$y = -0.0486x + 103.63$	0.9847
HT-29	2,772	$y = -0.0219x + 110.71$	0.9804

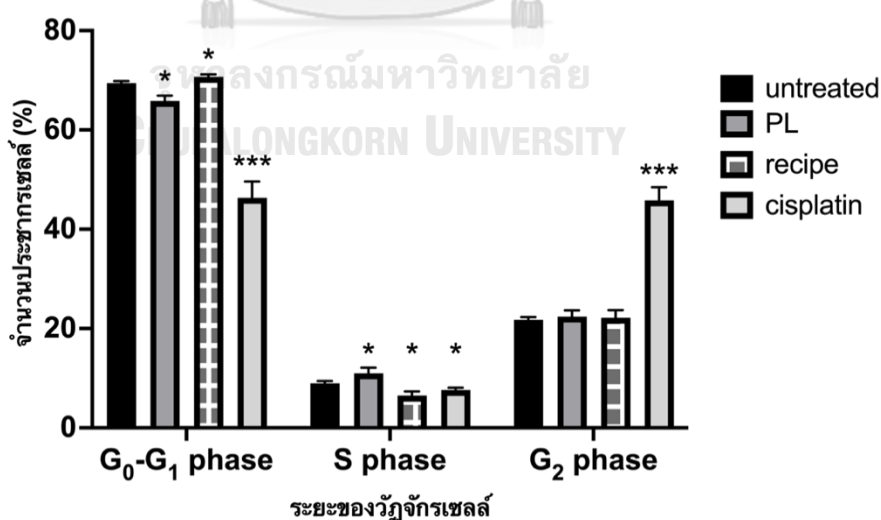
4.3 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์

ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 พบว่าหลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} มาทดสอบกับเซลล์แต่ละชนิด พบว่าสารสกัดทั้ง 2 สูตรสามารถชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะต่าง ๆ แตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์โดยผลการทดสอบในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อย่อยตามชนิดของเซลล์ดังนี้

4.3.1 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3

ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์ PC-3 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 239 และ 1,494 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $70.69 \pm 0.30\%$ สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ S ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 18 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ในระยะ S โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $11.00 \pm 0.65\%$ สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 18 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $45.81 \pm 1.54\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ของ PC-3

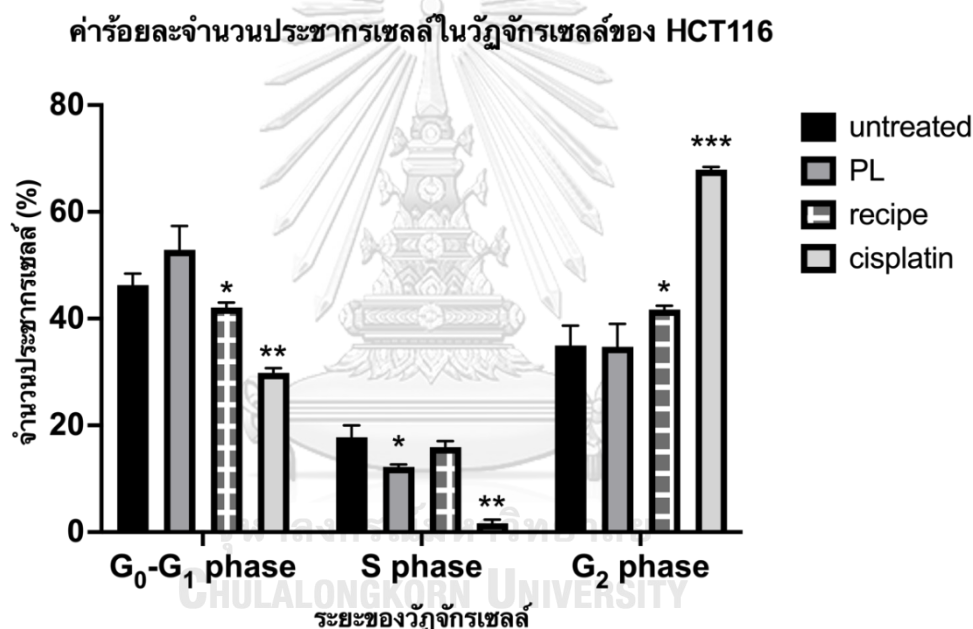


รูปที่ 18 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ PC-3 ในวัฏจักรเซลล์

หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

4.3.2 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์ HCT116 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 167 และ 1,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 1.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $41.72 \pm 0.40\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 19 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานไม่สามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ HCT116 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $67.93 \pm 0.29\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในรูปที่ 19



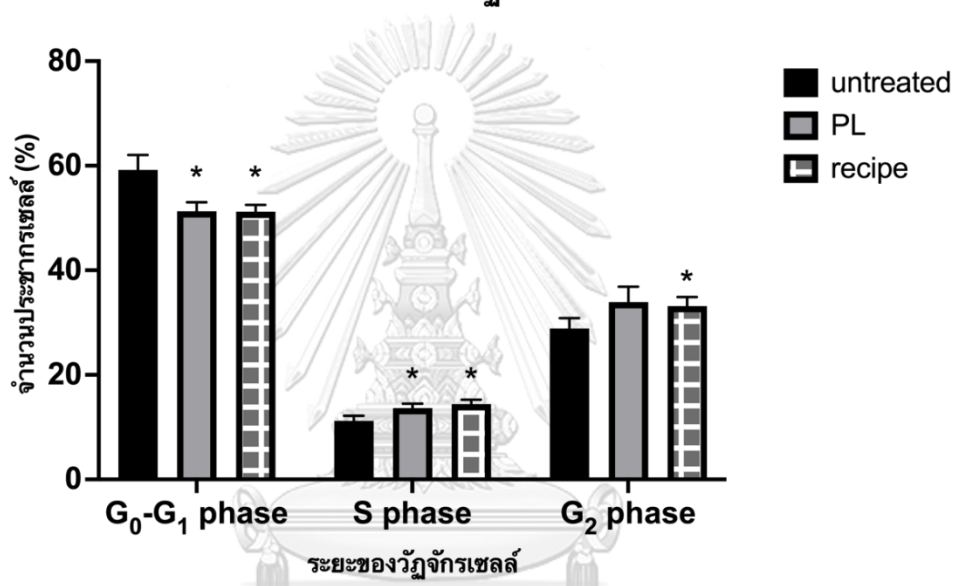
รูปที่ 19 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ HCT116 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

4.3.3 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620

ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์ SW620 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 156 และ 1,104 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ S และ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ

14.41±0.48 และ 33.18±0.98% ตามลำดับ สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 20 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพืมานสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ในระยะ S โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ 13.64±0.49% สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 20 ทั้งนี้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 หลังจากได้รับซิสพลาติน ไม่สามารถแสดงผลการทดสอบ เนื่องจากจำนวนเซลล์ SW620 เหลือไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง DxFLEX Flow cytometer

คำร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ของSW620



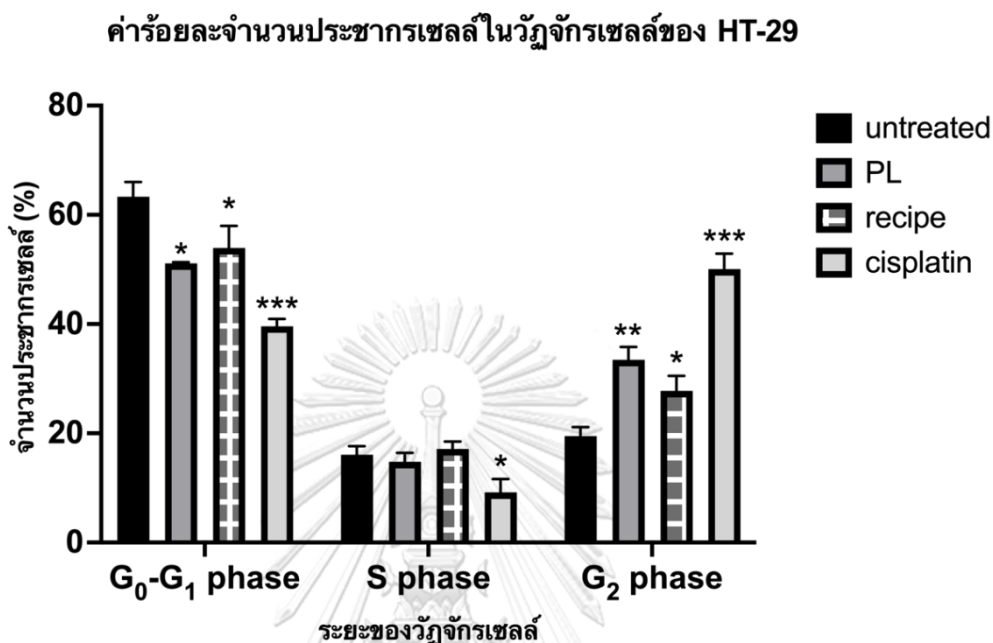
รูปที่ 20 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ SW620 ในวัฏจักรเซลล์

หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพืมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

4.3.4 ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29

ผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์ HT-29 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพืมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 492 และ 2,772 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 4.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ 27.77±1.58% สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 21 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพืมานสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ 33.48±1.35% สอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ที่ลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 21 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการหยุดของวัฏจักรเซลล์ ในระยะ G_2 โดยมีจำนวนประชากรเซลล์สะสมเท่ากับ $50.05 \pm 1.64\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 21 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์ HT-29 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็ดกระถินพินาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็น เวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

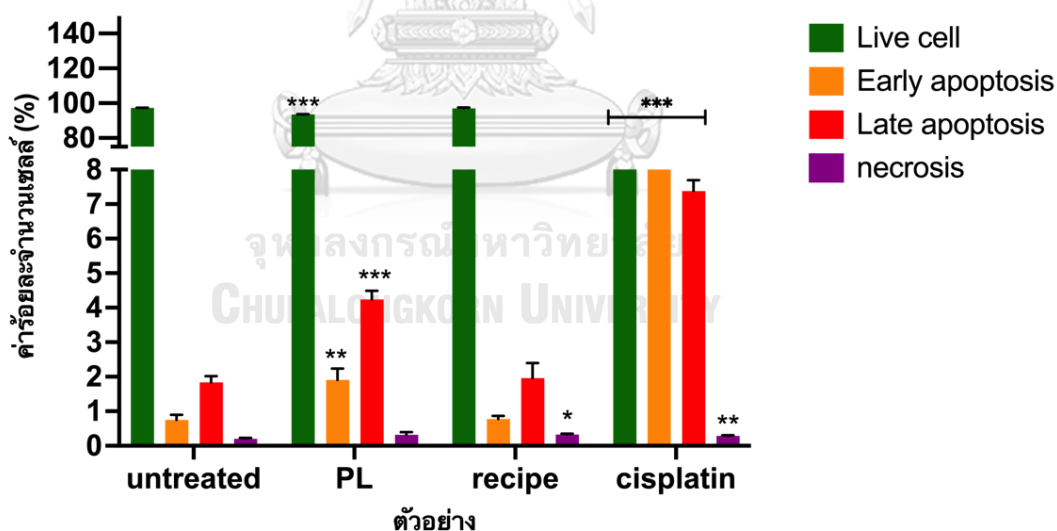
4.4 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสของเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 พบว่าหลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็ดกระถินพินานที่ ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} มาทดสอบกับเซลล์แต่ละชนิด พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการ ตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116, SW620 และ HT-29 และสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพินานสามารถชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสใน เซลล์ทุกชนิด โดยผลการทดสอบในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อย่อยตามชนิดของเซลล์ดังนี้

4.4.1 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

เมื่อเซลล์ PC-3 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 239 และ 1,494 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิเคราะห์ผลการทดสอบจากค่าร้อยละจำนวนเซลล์ที่สะสมในแต่ละของกระบวนการอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับไม่ได้ชักนำการตายของเซลล์ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส โดยค่าร้อยละจำนวนเซลล์สะสมในแต่ละของกระบวนการอะพอพโทซิสไม่แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 22 และสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานสามารถชักนำการตายของเซลล์ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early apoptosis และ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.91 ± 0.19 และ $4.24 \pm 0.15\%$ ตามลำดับ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 22 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการตายของเซลล์ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

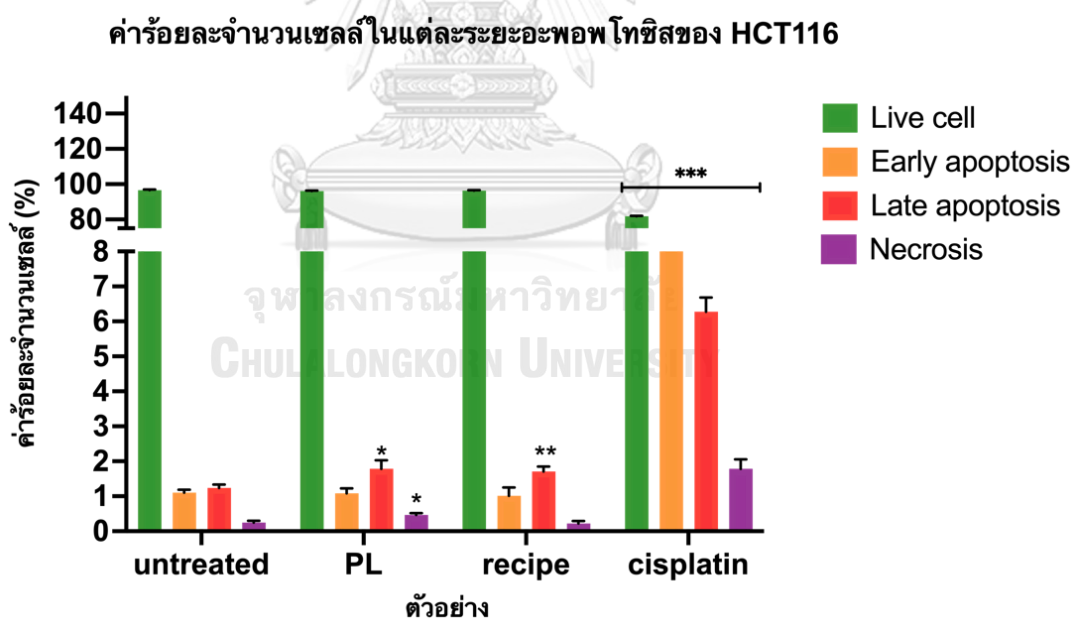
ค่าร้อยละจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะอะพอพโทซิสของ PC-3



รูปที่ 22 ร้อยละจำนวนเซลล์ PC-3 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอพโทซิส หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

4.4.2 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

เมื่อเซลล์ HCT116 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 167 และ 1,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 1.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิเคราะห์ผลการทดสอบจากค่าร้อยละจำนวนเซลล์ที่สะสมในระยะ live early apoptosis late apoptosis และ necrosis ของกระบวนการอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์ HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.71 \pm 0.08\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 23 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานสามารถชักนำการตายของเซลล์ HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ $1.78 \pm 0.14\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 23 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการตายของเซลล์ HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

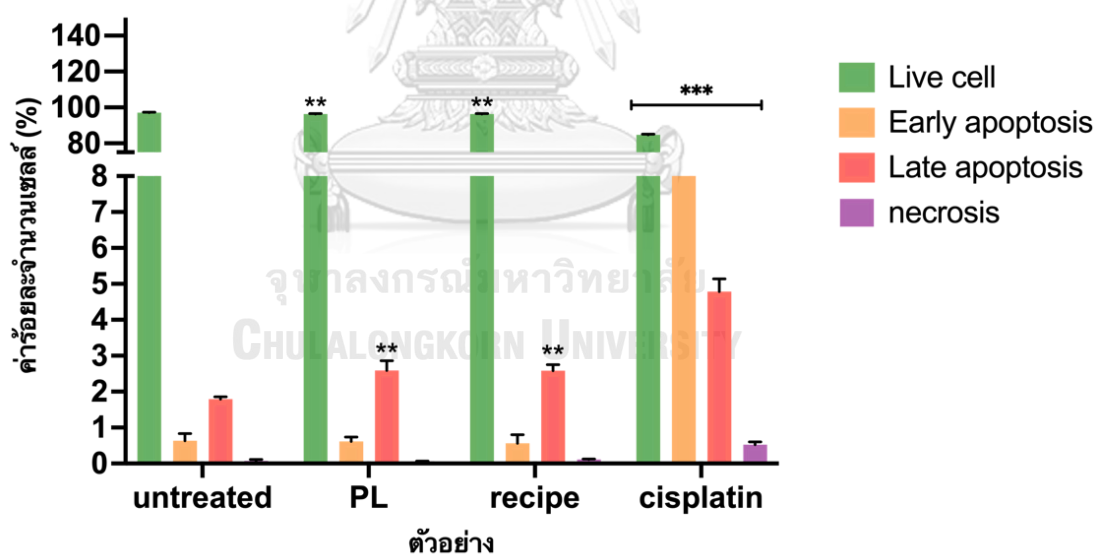


รูปที่ 23 ร้อยละจำนวนเซลล์ HCT116 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอพโทซิส หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

4.4.3 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

เมื่อเซลล์ SW620 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพินานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 156 และ 1,104 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยวิเคราะห์ผลการทดสอบจากค่าร้อยละจำนวนเซลล์ที่สะสมในแต่ละของกระบวนการอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์ SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ $2.58 \pm 0.10\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 24 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพินานสามารถชักนำการตายของเซลล์ SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ $2.59 \pm 0.16\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 24 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการตายของเซลล์ SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

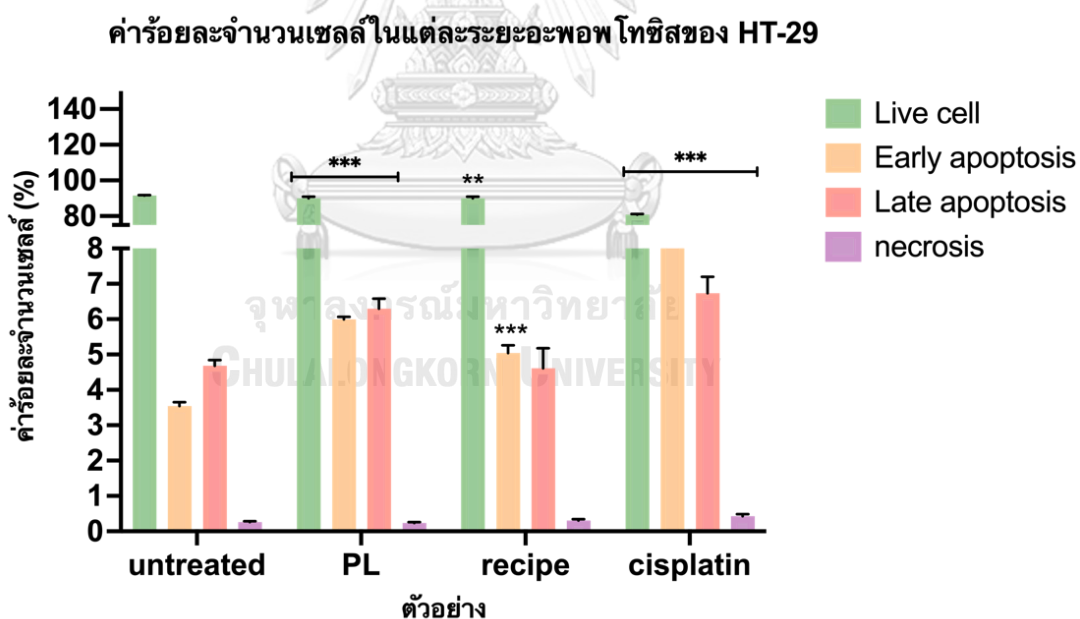
ค่าร้อยละจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะอะพอพโทซิสของ SW620



รูปที่ 24 ร้อยละจำนวนเซลล์ SW620 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอพโทซิส หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพินาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

4.4.4 ผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

เมื่อเซลล์ HT-29 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 492 และ 2,772 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินที่ความเข้มข้น 4.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิเคราะห์ผลการทดสอบจากค่าร้อยละจำนวนเซลล์ที่สะสมในแต่ละของกระบวนการอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ $5.04 \pm 0.13\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 25 และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานสามารถชักนำการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early apoptosis และ late apoptosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ 6.00 ± 0.04 และ $6.30 \pm 0.16\%$ ตามลำดับ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 25 และชุดควบคุมบวกซิสพลาตินชักนำการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสแตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 25 ร้อยละจำนวนเซลล์ HT-29 ในแต่ละระยะของกระบวนการอะพอพโทซิส หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และซิสพลาติน (ชุดควบคุมบวก) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (*, **, *** ค่า $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

4.5 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานในเซลล์ PC-3, HCT116, SW620 และ HT-29 พบว่าสกัดทั้ง 2 สูตรสามารถชักนำการแสดงออกของแต่ละยีนแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ โดยผลการทดสอบในหัวข้อนี้จะแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อย่อยตามชนิดของเซลล์ดังนี้

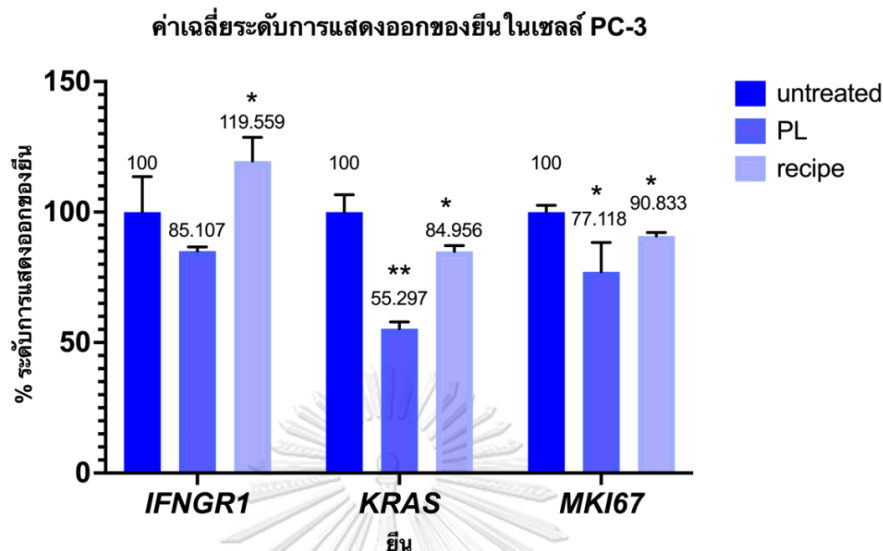
4.5.1 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3

เมื่อเซลล์ PC-3 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 239 และ 1,492 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $119.56 \pm 5.25\%$ และลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $84.96 \pm 1.26\%$ อีกทั้งยังสามารถลดการแสดงออกของยีน *MKI67* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $90.83 \pm 1.43\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 26 ในส่วนของสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานไม่สามารถเปลี่ยนระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 แต่สามารถลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $55.30 \pm 1.53\%$ อีกทั้งยังลดการแสดงออกของยีน *MKI67* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $77.12 \pm 6.47\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 26

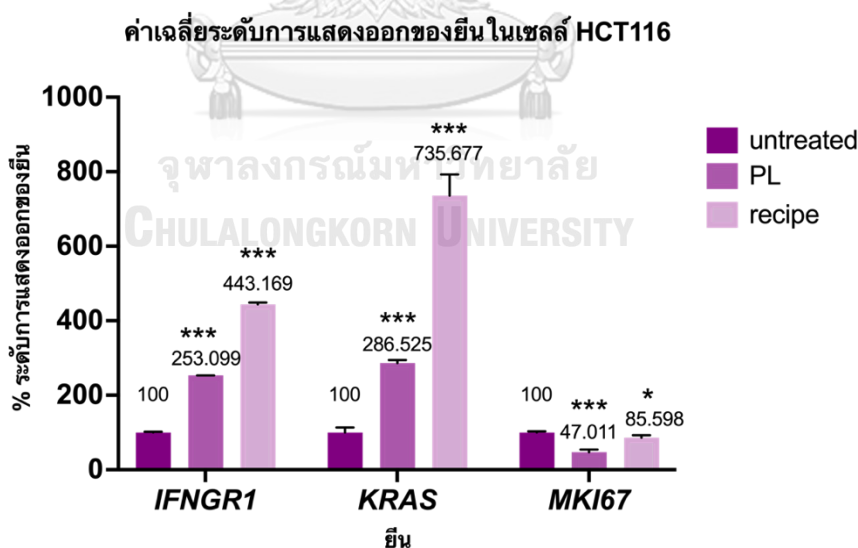
4.5.2 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

เมื่อเซลล์ HCT116 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 167 และ 1,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $443.17 \pm 4.01\%$ อีกทั้งยังเพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $735.68 \pm 32.52\%$ และลดการแสดงออกของยีน *MKI67* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $85.60 \pm 3.79\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 27 ในส่วนของสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $253.10 \pm 0.17\%$ เพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออก

เท่ากับ $286.53 \pm 4.43\%$ และลดการแสดงออกของยีน *MKI67* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $47.01 \pm 4.01\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 27



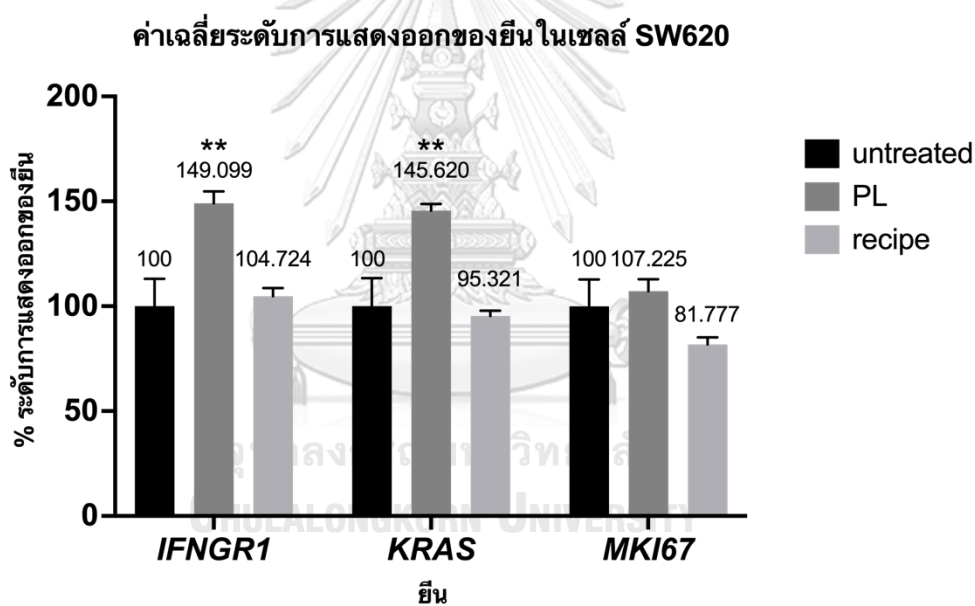
รูปที่ 26 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์ PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยแสดงระดับการแสดงออกของมียีน *MKI67* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ยืนยันระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยีน *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง



รูปที่ 27 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์ HCT116 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงระดับการแสดงออกของมียีน *MKI67* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ยืนยันระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยีน *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง

4.5.3 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620

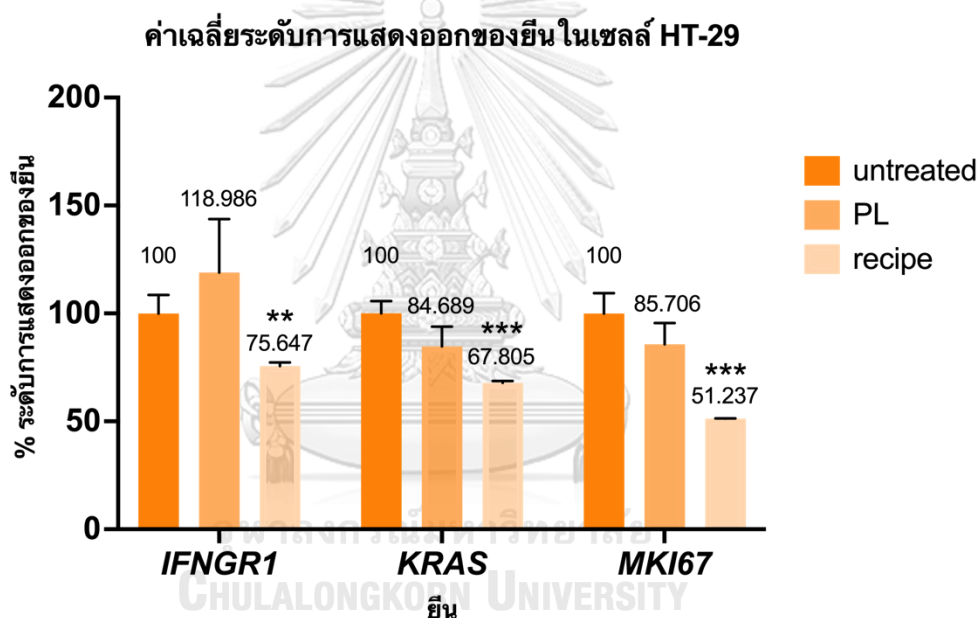
เมื่อเซลล์ SW620 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% ให้ตรวจประเมินปริมาณที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 156 และ 1,104 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ พบว่าสารสกัดสูตรตำรับไม่สามารถเปลี่ยนระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 28 ในส่วนของสารสกัด 100% ให้ตรวจประเมินปริมาณสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $149.10 \pm 3.28\%$ และเพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $145.62 \pm 1.80\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนระดับการแสดงออกของยีน *MKI67* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 28 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์ SW620 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% ให้ตรวจประเมินปริมาณเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงระดับการแสดงออกของยีน *MKI67* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ยืนยันระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยีน *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง

4.5.4 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29

เมื่อเซลล์ HT-29 ทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับและสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 492 และ 2,772 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $75.65 \pm 0.95\%$ ลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $67.81 \pm 0.48\%$ และลดการแสดงออกของยีน *MKI67* ที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกเท่ากับ $51.24 \pm 0.10\%$ แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 29 ในส่วนของสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานไม่สามารถเปลี่ยนระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 แสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 29 ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ในเซลล์ HT-29 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ และสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงระดับการแสดงออกของยีน *MKI67* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ยืนยันระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยีน *GAPDH* เป็นยีนอ้างอิง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การสกัดสารจากผงตัวอย่างทั้ง 2 สูตร และความเข้มข้นของสารสกัด

จากผลการสกัดสารสูตรตำรับและสารสกัด 100% เห็นกระถินพืมาพบว่ามีสารสกัดทั้ง 2 สูตรมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.30 และ 42.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองสูตรมีค่าแตกต่างกันมาก เนื่องมาจากปัจจัยทางด้านความละเอียดของผงตัวอย่างที่แตกต่างกันซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยพบว่าผงตัวอย่างของ 100% เห็นกระถินพืมาที่มีความละเอียดมากกว่าผงตัวอย่างสูตรตำรับที่มีลักษณะที่หยาบ ซึ่งขนาดของผงตัวอย่างนั้นมีความสำคัญต่อการสกัดด้วยเทคนิค Soxhlet extraction โดยหากผงตัวอย่างมีขนาดสม่ำเสมอจะทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพที่ดี เนื่องจากผงตัวอย่างที่ละเอียดจะมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสจากตัวทำละลายได้ทั่วถึง (Gopalsatheeskumar, 2018) เป็นผลทำให้เมื่อนำไปสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูงในเวลาที่เหมาะสม สารสกัด 100% เห็นกระถินพืมาจึงมีค่าความเข้มข้นที่สูงกว่าสารสกัดสูตรตำรับ

การศึกษาของ Peerapong Jeeno และคณะพบว่าเหง้าข้าวเย็นเหนือและเหง้าข้าวเย็นใต้ที่สกัดด้วยน้ำพบสารประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ สารประกอบฟีนอลิกปริมาณ 0.002 ± 0.001 mg GAE/g จากสารสกัดจากเหง้าข้าวเย็นเหนือและ 0.016 ± 0.001 mg GAE/g จากสารสกัดจากเหง้าข้าวเย็นใต้ อีกทั้งยังมีปริมาณ flavonoid จากสารสกัดจากเหง้าข้าวเย็นใต้ 0.006 ± 0.003 mg QE/g อีกทั้งพบว่าสารสกัดจากเหง้าข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และด้านการอักเสบ (Jeeno et al., 2022) (Chalertpet et al., 2023)

5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

จากการศึกษาของ Sensuke Konno และคณะได้ศึกษามะเร็ง 10 ชนิดได้แก่ PC-3 (มะเร็งต่อมลูกหมากแพร่กระจายไปยังกระดูก), DU-145 (มะเร็งต่อมลูกหมากแพร่กระจายไปยังสมอง) และ LNCaP (มะเร็งต่อมลูกหมากแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง) T24 (มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ) ACHN (มะเร็งไต) A549 (มะเร็งปอด) MCF-7 (มะเร็งเต้านม) AGS (มะเร็งกระเพาะอาหาร) HepG2 (มะเร็งตับ) และ U-87 (เซลล์มะเร็งสมอง) พบว่าเซลล์มะเร็ง 10 ชนิดมีระดับการมีชีวิตที่ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดเห็นกระถินพืมาที่เพิ่มขึ้น (Konno et al., 2015) สอดคล้องกับผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ในการศึกษาพบว่าสารสกัดสูตรตำรับมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 239 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 มากที่สุด โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} ต่ำสุด) เนื่องจากเซลล์ SW620 เป็นมะเร็งที่แพร่กระจายมาจาก เซลล์ SW480 โดยแพร่ผ่าน

ทางระบบน้ำเหลืองโดยพบการกลายพันธุ์ในเซลล์ SW620 บริเวณโคดอน 273 ของยีน *p53* (*p53Arg273*) ส่งผลให้ *p53* สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง (Lu, 2012) รองลงมาคือ HCT116 ค่า IC_{50} เท่ากับ 167 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 13 ของ RAS proto-oncogene (Schroy et al., 1995) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 น้อยที่สุด โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 492 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} สูงสุด) ซึ่งการกลายพันธุ์ของเซลล์ HT-29 นั้นมีการกลายพันธุ์บนโคดอน 273 ของยีน *p53* และการแสดงออกของ N-myc proto-oncogene ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ และการตายแบบอะพอโทซิสในปริมาณมากเกินไป (Chen et al., 1987) ในส่วนของสารสกัด 100% ให้ดรรชนีพืมนั้นความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 1,494 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 มากที่สุด โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 1,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} ต่ำสุด) รองลงมาคือ SW620 ค่า IC_{50} เท่ากับ 1,104 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 น้อยที่สุด โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 2,772 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า IC_{50} สูงสุด) ดังนั้นจากค่า IC_{50} ของสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัด 100% ให้ดรรชนีพืมนั้นในแต่ละเซลล์ที่กล่าวข้างต้น พบว่าสกัดสูตรตำรับใช้ความเข้มข้นที่ค่าน้อยกว่าสารสกัด 100% ให้ดรรชนีพืมนั้นในการทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด เนื่องมาจากสูตรตำรับมีส่วนประกอบร่วมของสมุนไพรหลายชนิด เช่น เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ จากการศึกษาของ Boonsong Wungsintaweekul และคณะได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเหง้าข้าวเย็นเหนือพบว่ามียังมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญเช่น resveratrol quercetin และ catechin สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ศึกษาแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wungsintaweekul et al., 2011) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถอนุมานได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดในสารสกัดสูตรตำรับที่มีให้ดรรชนีพืมนั้นเป็นองค์ประกอบร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นมีฤทธิ์ในการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีกว่าการมีเพียงองค์ประกอบทางเคมีจากให้ดรรชนีพืมนั้นเพียงอย่างเดียว

5.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์

การควบคุมวัฏจักรเซลล์ คือการหยุดการเจริญของวัฏจักรเซลล์ได้ที่ระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะ G_0 - G_1 S และ G_2 โดยปกติหากเซลล์ถูกหยุดในระยะ G_1 เนื่องจากการตรวจสอบพบความเสียหายของดีเอ็นเอและเพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายถูกส่งต่อไปยังระยะ S และหากเซลล์ถูกหยุดในระยะ S เกิดจากการตรวจพบความเสียหายของดีเอ็นเอในระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) จึงเกิดการหยุดกระบวนการและมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอเกิดขึ้น (DNA repair) (Pan et al., 2019) (Pan et al., 2020)

5.3.1 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

จากผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 (มะเร็งต่อมลูกหมากแพร่กระจายไปยังกระดูก) พบว่าสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 72 ชั่วโมงสามารถชักนำจำนวนประชากรเซลล์ให้สะสมในระยะ G_0-G_1 เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ S ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 โดยการที่เซลล์ถูกสะสมอยู่ในระยะ G_0-G_1 ถูกควบคุมผ่านการทำงานของ p53 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อความเสียหายของดีเอ็นเอโดยกระตุ้นการปลดปล่อยโปรตีนที่มีหน้าที่ยับยั้ง cyclin-CDK complex ซึ่งนำไปสู่หยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G_1 (Murad et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ting Zhu และคณะได้ศึกษากลไกในการชักนำกระบวนการอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 พบว่าความเข้มข้นของเม็ดกระถินพิมานในปริมาณต่ำสามารถชักนำการสะสมของประชากรเซลล์ในระยะ G_1 ของวัฏจักรเซลล์ผ่านการควบคุมการแสดงออกของ kinases CDK2, 4, and 6 (Zhu et al., 2007) (Sliva, 2010) (Guo et al., 2007) และสารสกัดสูตร 100% เม็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} สามารถชักนำการหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ S เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน ซึ่งการชักนำการหยุดของเซลล์ในระยะ S เกิดจากการพบความเสียหายของดีเอ็นเอในระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ ทำให้การจำลองดีเอ็นเอหยุดลงแล้วเกิดกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในเซลล์เกิดขึ้นส่งเสริมให้การทำงานของ CDK2/cyclin E complex ลดลงส่งผลให้ระยะ S ยาวนานขึ้นเพื่อให้มีเวลาในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Barkley et al., 2007) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีจากเม็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการชักนำการสะสมของจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ PC-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.3.2 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

จากผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 13 ของ RAS proto-oncogene จึงทำให้มีความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์ การเจริญเติบโตที่ไม่อาจควบคุมได้ ทั้งนี้พบว่าสารสกัดสูตรตำรับที่มีเม็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำจำนวนประชากรเซลล์ให้สะสมในระยะ G_2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 เนื่องจากอาจมีการตรวจสอบพบความเสียหายของดีเอ็นเออย่างร้ายแรงซึ่งยากต่อการซ่อมแซมในระหว่างการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงเกิดการ ทำงานของโปรตีนหลายชนิดนำไปสู่การลดการทำงานของ CDK1/cyclin B complex จึงส่งผลให้เซลล์สะสมอยู่ในระยะ G_2 เพิ่มมากขึ้น (Pan et al., 2019) และสารสกัดสูตร 100% เม็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ไม่สามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์ HCT116 ให้สะสมในระยะ G_1 ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมลอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังนั้นสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการหยุดวัฏจักรของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ในระยะ G_2

อาจเนื่องมาจากสูตรตำรับมีส่วนประกอบร่วมของของสมุนไพรหลายชนิด เช่น เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ เป็นต้น จากการศึกษาของ Fei Sa และคณะได้ศึกษาความฤทธิ์ต้านมะเร็งระดับและด้านการเจริญเติบโตของมะเร็งระดับของเหง้าข้าวเย็นใต้ (*Smilax glabra Roxb.*) ผลการศึกษาพบว่า เหง้าข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Hep3B อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวโดยทำให้เกิดการสะสมของจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ S/G₂ ของวัฏจักรเซลล์ (Sa et al., 2008) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดในสารสกัดสูตรตำรับมีฤทธิ์ในการชักนำการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ได้ดีกว่าองค์ประกอบทางเคมีจากเห็ดกระถินพิมานเพียงอย่างเดียว และสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการชักนำการหยุดวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ HCT116 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05

5.3.3 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620

จากผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 273 ของยีน p53 จึงทำให้โปรตีน p53 สูญเสียหน้าที่ทำให้ไม่สามารถหยุดการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอส่งผลให้เซลล์ที่มีความเสียหายไม่ถูกซ่อมแซมและเจริญเจริญเติบโตแบบควบคุมไม่ได้กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด พบว่าสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำจำนวนประชากรเซลล์ให้สะสมในระยะ S และ G₂ เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G₀-G₁ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ สามารถชักนำการหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ S เช่นเดียวกัน ฉะนั้นการชักนำการหยุดของเซลล์ในระยะ S เนื่องจากพบความเสียหายของดีเอ็นเอในระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ ทำให้การจำลองดีเอ็นเอหยุดลงแล้วเกิดกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอภายในเซลล์เกิดขึ้นส่งเสริมให้การทำงานของ CDK2/cyclin E complex ลดลงส่งผลให้ระยะ S ยาวนานขึ้นเพื่อให้มีเวลาในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Barkley et al., 2007) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการชักนำการสะสมของจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ SW620 ในระยะ S อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื่องจากผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 หลังจากได้รับซิสพลาตินจำนวนเซลล์ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ผล อาจเนื่องมาจากซิสพลาตินออกฤทธิ์ชักนำให้เซลล์ SW620 สะสมอยู่ในระยะ Sub G₁ ในวัฏจักรเซลล์ซึ่งเป็นระยะที่เกิดการชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส จึงทำให้จำนวนเซลล์ SW620 เหลือไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DxFLEX Flow cytometer สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Silvia Fernández de Mattos และคณะพบว่าเซลล์ SW620 หลังจากได้รับซิสพลาตินเปรียบเทียบกับระหว่าง 0 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ SW620 สะสมอยู่ในระยะ Sub G₁ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fernandez de Mattos et al.,

2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาควรมีชุดควบคุมบวกลดอย่างน้อย 2 ชุดคือ ซิสฟลาตินและ Cyclophosphamide (CTX) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานสามารถลดความเป็นพิษของ CTX และยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ SW620 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kato et al., 2016; Li et al., 2021)

5.3.4 การทดสอบวัฏจักรเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29

จากผลการทดสอบวัฏจักรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 พบการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน 273 ของยีน *p53* มีการแสดงออกของ N-myc proto-oncogene ส่งผลให้โปรตีน p53 เกิดความผิดพลาดในการทำหน้าที่ทำให้เซลล์ไม่เกิดการตรวจสอบความผิดปกติในระหว่างการแบ่งเซลล์ ร่วมกับการแสดงออกที่มากเกินไปของ N-myc proto-oncogene ซึ่งสอดคล้องกับการส่งเสริมให้เซลล์พัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำจำนวนประชากรเซลล์ให้สะสมในระยะ G_2 เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับจำนวนประชากรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากตรวจสอบพบความเสียหายอย่างมากของดีเอ็นเอซึ่งยากต่อการซ่อมแซมในระหว่างการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงเกิดการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิดนำไปสู่การลดการทำงานของ CDK1/cyclin B complex จึงส่งผลให้เซลล์สะสมอยู่ในระยะ G_2 เพิ่มมากขึ้น (Pan et al., 2019) สอดคล้องกับการศึกษาของ Shi Zhong และคณะได้ศึกษากลไกของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมาน (*P. linteus*) ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 โดยได้ศึกษาผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การกระจายตัวของประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ และการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กันของวัฏจักรเซลล์ในเซลล์ HT-29 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง อีกทั้งยังสามารถชักนำประชากรเซลล์ HT-29 สะสมในระยะ S ของวัฏจักรเซลล์แต่ไม่มีผลชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอโทซิส และสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1, cyclin E และ CDK2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงการเพิ่มการแสดงออกของ P27kip1 ในเซลล์ HT-29 ซึ่งให้เห็นถึงกลไกการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ในระยะ S ผ่านเส้นทาง P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 (Zhong et al., 2013) ฉะนั้นอาจกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการชักนำการสะสมของจำนวนประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ HT-29 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นจากการศึกษาวัฏจักรเซลล์พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ให้สะสมอยู่ในระยะ G_0-G_1 แต่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 SW620 และ HT-29 ชักนำประชากรเซลล์สะสมอยู่ในระยะ G_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวได้ว่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและลำไส้ใหญ่ที่ใช้ในการศึกษานี้มีการตอบสนองต่อองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญบางตัวในสารสกัดสูตรตำรับแตกต่างกัน และผลการศึกษาพบว่าชุดควบคุมบวกลดซิสฟลาตินชัก

นำประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและลำไส้ใหญ่ที่ใช้ในการศึกษานี้สะสมอยู่ในระยะ G₂ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ C M Sorenson และ A Eastman ต่อการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด L1210 พบว่าซิสพลาตินมีฤทธิ์หยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G₂ (Sorenson and Eastman, 1988)

5.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

5.4.1 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากผ่านกลไกอะพอพโทซิส

จากผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงไม่สามารถชักนำการตายของเซลล์ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส โดยค่าร้อยละจำนวนเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ฉะนั้นความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์ไม่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตามเนื่องจากค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดอะพอพโทซิสไม่สูง กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสอาจไม่ใช่กลไกหลักของสารสกัดสูตรตำรับในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ แต่จากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DxFLEx Flow cytometer พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์ PC-3 แบบ necrosis โดยมีค่าร้อยละจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.96±0.25% แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสมุนไพรอื่นที่เป็นองค์ประกอบรวมในสูตรตำรับเช่น เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ เป็นต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Myrtle Ira Thabrew ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถของเหง้าข้าวเย็นใต้ (*S. glabra*) ในการต้านมะเร็งตับชนิด HepG2 ผลการศึกษาพบว่าเหง้าข้าวเย็นใต้มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาณของเหง้าข้าวเย็นใต้ และมีผลชักนำการตายของเซลล์โดยค่าร้อยละจำนวนเซลล์ HepG2 ส่วนใหญ่สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis และ necrosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Thabrew et al., 2005) และสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ สามารถชักนำการตายของเซลล์ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส โดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early และ late apoptosis แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Danie Sliva ได้ศึกษาฤทธิ์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่แยกได้จากเห็ดกระถินพิมาน (*P. linteus*) เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ สารประกอบเชิงซ้อนเบต้ากลูแคน (Beta Glucan Complex) สารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide-protein complex) และสารประกอบเชิงซ้อนอื่น ๆ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือต้านมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าเห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด LNCaP และ PC-3 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส (Sliva, 2010) ดังนั้นความสามารถ

ขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรอื่นของสูตรตำรับมีส่วนชักนำการตายของเซลล์ PC-3 แบบ necrosis มากกว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานเพียงอย่างเดียว

5.4.2 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

จากผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำการตายของเซลล์ HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ji-Hun Kim Yu Chul Kim และ Byoungduck Park ได้ศึกษาความสามารถของ ฮิสโพลอน (Hispolon) จากเห็ดกระถินพิมาน (*P. linteus*) ในการช่วยลดการดื้อยาที่เหนี่ยวนำโดย The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่มีศักยภาพในการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็ง แต่เนื่องด้วยเซลล์มะเร็งบางชนิดสามารถต่อต้านการชักนำการตายที่เหนี่ยวนำโดย TRAIL ผลการศึกษาพบว่าฮิสโพลอนสามารถทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อ TRAIL อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส (Kim et al., 2016) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการตายของเซลล์ HCT116 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis

5.4.3 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

จากผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำการตายของเซลล์ SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hye-Jin Park และคณะได้ศึกษาศักยภาพการรักษาของเห็ดกระถินพิมาน (*P. linteus*) ในการช่วยเพิ่มการไวต่อการรักษาของยา cetuximab ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยใช้สารสกัดเห็ดกระถินพิมานร่วมกับยา cetuximab เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ SW480 ผลการศึกษาพบว่าการใช้สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานร่วมกับยา cetuximab สามารถยับยั้งการมีชีวิตและลดจำนวนของเซลล์ SW480 โดยการชักนำการตายของเซลล์ SW480 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส (Park et al., 2017) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการตายของเซลล์ SW620 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ late apoptosis

5.4.4 การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

จากผลการทดสอบการชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดสูตรตำรับที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถชักนำการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early apoptosis แตกต่างจากชุดควบคุมลอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} สามารถชักนำการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิสโดยชักนำเซลล์ให้สะสมอยู่ในระยะ early และ late apoptosis แตกต่างจากชุดควบคุมลอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสอดคล้องกับการศึกษาของ Shi Zhong และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ของ Protocatechualdehyde (PCA) ที่สกัดจากเห็ดกระถินพิมาน (*P. gilvus*) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการรักษาของเห็ดกระถินพิมานต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การกระจายตัวของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ การตายของเซลล์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ พบว่าปริมาณเห็ดกระถินพิมานที่เหมาะสมสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สะสมในระยะ S ของวัฏจักรเซลล์ และเพิ่มการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส และการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน p27^{KIP1} ผ่านเส้นทาง cyclin-A/D1-Cdk2 และเส้นทาง mitochondrial apoptotic (Zhong et al., 2015) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการตายของเซลล์ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส

ดังนั้นจากการศึกษาการชักนำการตายของเซลล์พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 SW620 และ HT-29 ผ่านกลไกอะพอพโทซิส แต่การตายของเซลล์ต่อมลูกหมาก PC-3 ไม่ได้ถูกชักนำผ่านกลไกอะพอพโทซิส อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบเคมีที่สำคัญในสมุนไพรวัดอื่นของสูตรตำรับส่งผลที่แตกต่างในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 และผลการศึกษาพบว่าการตายของเซลล์มะเร็งในชุดควบคุมบวกลูกผสมพลาตินถูกชักนำผ่านกลไกอะพอพโทซิสสอดคล้องกับผลการชักนำการสะสมของประชากรเซลล์ในระยะ G_2 ในหัวข้อ 5.3 กล่าวคือเซลล์ที่ถูกชักนำสะสมในระยะ G_2 เนื่องจากไม่สามารถเกิดการถอดรหัสดีเอ็นเอ (DNA transcription) ที่เสียหายและไม่สามารถซ่อมแซมได้ ฉะนั้นการตายของเซลล์จึงอาจเป็นผลมาจากการไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ (Sorenson and Eastman, 1988)

5.5 การทดสอบการแสดงออกของยีน

5.5.1 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

การทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* พบว่าสารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 (หัวข้อ 4.2.1) อาจเนื่องมาจากการควบคุมผ่านกลไกการส่งสัญญาณผ่านยีน *MKI67* เนื่องจากสารสกัดทั้ง 2 สูตรสามารถลดการแสดงออกของยีน *MKI67* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องด้วยโปรตีน Ki-67 สามารถตรวจพบได้ในกระบวนการแบ่งเซลล์ อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าการที่เซลล์มีโปรตีน Ki-67 ลดลงส่งผลทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการจำลองดีเอ็นเอได้ช้าลง (Sun et al., 2017) ดังนั้นฤทธิ์ของสารสกัดทั้ง 2 สูตรในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 อาจควบคุมผ่านการลดการแสดงออกของยีน *MKI67* และสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ในระยะ G_0-G_1 เนื่องจากการควบคุมผ่านกลไกของยีน *KRAS* พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถลดการแสดงออกของยีน *KRAS* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีน *KRAS* มีหน้าที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยับยั้งการตายของเซลล์ เปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์ผ่านเส้นทาง PI3K และ MAPK/ERK signaling (Ferreira et al., 2022; Kim et al., 2021) ซึ่ง ERK สามารถควบคุมการเพิ่มการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์ โดย *KRAS* ดังนั้นยีน *KRAS* จึงถูกจัดเป็นยีนก่อมะเร็ง (Jančík et al., 2010) และควบคุมผ่านกลไกของยีน *IFNGR1* โดยสารสกัดสูตรตำรับสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* (สร้างโปรตีน *IFNGR1* เป็นตัวรับจำเพาะกับ Interferon gamma ($IFN-\gamma$)) แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการศึกษาพบว่าโปรตีน $IFN-\gamma$ สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p21 และ p27 ส่งผลยับยั้งการทำงานของ cyclin E/CDK2 complex และ cyclin D/CDK4 complex ด้วยเหตุนี้จึงทำให้วัฏจักรของเซลล์มะเร็งถูกยับยั้งอยู่ในระยะ G_1 (Schroder et al., 2004) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอโทซิสแต่เนื่องด้วยผลการทดสอบอะพอโทซิสพบว่าสารสกัดสูตรตำรับชักนำการตายของเซลล์ PC-3 แบบ necrosis ดังนั้นความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์ไม่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอโทซิส อย่างไรก็ตามเนื่องจากค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดอะพอโทซิสที่วัดได้ไม่สูง กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสอาจไม่ใช่กลไกหลักของสารสกัดสูตรตำรับในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ โดย necrosis เป็นการตายของเซลล์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออกจาก lysosome เข้าสู่ไซโทพลาซึมจึงเกิดการย่อยสลายโปรตีนและส่วนต่างๆภายในเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายอาจเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ (inflammation) โดยอาจควบคุมผ่านเส้นทางของยีน tumor necrosis factor (TNF) ส่งสัญญาณผ่านโปรตีนหลายตัวในเส้นทางจนสุดท้ายจะกระตุ้นให้โปรตีน Mixed lineage kinase domain like

pseudokinase (MLKL) ซึ่งเป็น oligomerize จะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการซึมผ่านและชักนำการตายแบบ necrosis ในที่สุด (Lou et al., 2020)

สารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* แตกต่างจากชุดควบคุมลอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการศึกษาพบว่าบทบาทของ $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ในมะเร็งต่อมไทรอยด์ 3 ชนิดคือ TPC-1, BCPAP และ K1 ต่อการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของ epithelial-mesenchymal transition (EMT) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของก้อนมะเร็งและความสามารถของเซลล์มะเร็งในการหลบหลีกการตรวจจับของภูมิคุ้มกัน จากผลการศึกษาบ่งบอกว่า $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ มีผลไปเพิ่มการรุกราน เพิ่มการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้ง 3 ชนิดและ $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ไปมีผลส่งเสริมการแสดงออกของ EMT ทำให้เซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ทั้ง 3 ชนิดสามารถแพร่กระจาย และลุกลามไปยังบริเวณอื่นได้มากขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถในการหลบหลีกการตรวจจับของภูมิคุ้มกัน (Lv et al., 2015) ฉะนั้นเมื่อ $IFN-\gamma$ ทำงานร่วมกับ $TNF-\alpha$ จะส่งผลทำให้ไปมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* เสมือนกับลดการทำงานร่วมกันกับ $TNF-\alpha$ ลดความสามารถในการส่งเสริมเซลล์มะเร็งผ่านกลไกการยับยั้งนี้ในเซลล์มะเร็ง PC-3 และผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *KRAS* พบว่าสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานสามารถลดการแสดงออกของยีน *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 เนื่องจากยีน *KRAS* ถูกจัดเป็นยีนก่อมะเร็ง และฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *KRAS* จึงอาจสามารถลดการทำงานในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยับยั้งการตายของเซลล์ เพิ่มการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์ (Ferreira et al., 2022; Kim et al., 2021) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานเพียงอย่างเดียวมีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งลดการส่งสัญญาณการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ส่งผลยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

5.5.2 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116

การทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* พบว่าผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 สารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์และการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิส สอดคล้องกับผลการชักนำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการทำงานของยีน *IFNGR1* มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยเป็นตัวรับสัญญาณตั้งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะจับจำเพาะกับไซโตไคน์ชนิด $IFN-\gamma$ ซึ่งจะเกิดการถ่ายทอดสัญญาณผ่านเส้นทาง JAK-STAT1-caspase signaling ส่งผลทำให้มีการสังเคราะห์ caspase 3 และ caspase 7 เพิ่มขึ้นซึ่งจะชักนำให้เกิดการ

เริ่มต้นกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Song et al., 2019) (Tau and Rothman, 1999) อีกทั้งการศึกษาของ Chao Ni และคณะ พบว่า IFN- γ สามารถกระตุ้นอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านเส้นทาง JAK-STAT1-IRF1 signaling (Ni, 2013) ด้วยเหตุนี้จึงกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งชักนำการส่งสัญญาณอะพอพโทซิสภายในเซลล์มะเร็ง และผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 สารสกัดสูตรตำรับและสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานชักนำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 โดยยีน *KRAS* มีหน้าที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยับยั้งการตายของเซลล์ เปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์ ผ่านเส้นทาง PI3K และ MAPK/ERK signaling (Ferreira et al., 2022; Kim et al., 2021) ซึ่ง ERK สามารถควบคุมการเพิ่มการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์จึง *KRAS* ถูกจัดเป็นยีนก่อมะเร็ง (Jančík et al., 2010) แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 เป็นเซลล์มะเร็งที่เกิดการกลายพันธุ์ในโคดอน 13 ของ RAS proto-oncogene ดังนั้นผลการเพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* หลังได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารสกัดหรือองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีปริมาณไม่มากพอที่จะลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ที่กลายพันธุ์ในเซลล์ HCT116 หรือผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (หัวข้อ 4.2.2) และการยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (หัวข้อ 4.3.2) อาจไม่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณผ่านยีน *KRAS* แต่ผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (หัวข้อ 4.2.2) ของสารสกัดทั้ง 2 สูตรอาจมาจากกลไกการควบคุมการส่งสัญญาณผ่านยีน *MKI67* เนื่องจากผลการทดสอบของสารสกัดทั้ง 2 สูตรสามารถชักนำการลดการแสดงออกของยีน *MKI67* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 เนื่องด้วยยีน *MKI67* จะสร้างโปรตีน Ki-67 ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าเซลล์ที่มีโปรตีน Ki-67 ลดลงส่งผลทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการจำลองดีเอ็นเอได้ช้าลง (Sun et al., 2017) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันผลของสารสกัดทั้ง 2 สูตรในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 (หัวข้อ 4.2.2) ผ่านกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน *MKI67*

5.5.3 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620

การทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 พบว่าสารสกัดสูตรตำรับไม่สามารถชักนำการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังนั้นผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ การชักนำเซลล์สะสมในวัฏจักรเซลล์ และการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสจึงไม่ได้เกิดจากการควบคุมผ่านเส้นทางของยีน *IFNGR1* แต่อาจเกิดจากการควบคุมผ่านเส้นทางอื่นเช่น ควบคุมผ่านเส้นทางของ p53 โดยเป็นเส้นทางการส่งสัญญาณตอบสนอง

ต่อความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างการแบ่งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์และส่งสัญญาณกระตุ้นการชักนำของโปรตีน p21 เพื่อควบคุมการหยุดวัฏจักรเซลล์เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหาย หรือหากความเสียหายของดีเอ็นเอมีความรุนแรงจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ p53 จะชักนำการเกิดอะพอพโทซิสผ่านเส้นทาง Bax เป็นต้น (Shen and White, 2001) ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางในการศึกษากลไกการควบคุมของสารสกัดสูตรตำรับผ่านการทำงานของยีนในเส้นทาง p53 ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *KRAS* พบว่าสารสกัดสูตรตำรับไม่สามารถลดการแสดงออกของยีน *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังนั้นความสามารถของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการลดการส่งสัญญาณผ่านยีน *KRAS* จึงไม่ใช่กลไกหลักของสารสกัดสูตรตำรับ (Ferreira et al., 2022) (Kim et al., 2021) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรอื่นร่วมกับเห็ดกระถินพิมานในสูตรตำรับมีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งชักนำการส่งสัญญาณอะพอพโทซิสภายในเซลล์มะเร็ง SW620 และลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ส่งผลยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

สารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์และการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสที่สอดคล้องกับผลการชักนำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีน *IFNGR1* สร้างโปรตีนที่มีหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณบนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะจับจำเพาะกับไซโตไคน์ชนิด IFN- γ เกิดการถ่ายทอดสัญญาณผ่านเส้นทาง JAK-STAT1-caspase signaling ส่งผลทำให้มีการสังเคราะห์ caspase 3 และ caspase 7 เพิ่มขึ้นส่งผลชักนำให้เกิดการเริ่มต้นกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Song et al., 2019) (Tau and Rothman, 1999) และ IFN- γ สามารถกระตุ้นอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านเส้นทาง JAK-STAT1-IRF1 signaling (Ni et al., 2013) ด้วยเหตุนี้จึงกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งชักนำการส่งสัญญาณอะพอพโทซิสภายในเซลล์มะเร็ง แต่ในทางตรงกันข้ามผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 สารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานชักนำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 เป็นเซลล์มะเร็งที่พบการกลายพันธุ์ในโคดอน 273 ของยีน *p53* และการแสดงออกของยีน *c-myc* *K-ras* *H-ras* *N-ras* และ *Myb* เป็นต้น ดังนั้นองค์ประกอบที่สำคัญจากเห็ดกระถินพิมานเพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถลดการแสดงออกของ K-RAS และผลการทดสอบการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (หัวข้อ 4.2.3) และการยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ (หัวข้อ 4.3.3) อาจไม่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณผ่านยีน *KRAS* และยีน *MKI67* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.5.4 การทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29

การทดสอบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* *KRAS* และ *MKI67* ผลการทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 พบว่าสารสกัดสูตรตำรับมีผลการแสดงออกของยีน *IFNGR1* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการศึกษาพบว่าบทบาทของ $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ทำงานร่วมกันในเซลล์มะเร็งมีอิทธิพลในการชักนำการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของ EMT (Lv et al., 2015) ฉะนั้นเมื่อ $IFN-\gamma$ ทำงานร่วมกับ $TNF-\alpha$ จะส่งผลทำให้ไปมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรอื่นร่วมกับเห็ดกระถินพิมานในสูตรตำรับมีฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* เสมือนกับลดการทำงานร่วมกันกับ $TNF-\alpha$ ลดความสามารถในการส่งเสริมเซลล์มะเร็งผ่านกลไกการยับยั้งนี้ในเซลล์มะเร็ง HT-29 และผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ (หัวข้อ 4.2.4) ของสารสกัดสูตรตำรับอาจมาจากการควบคุมผ่านกลไกการส่งสัญญาณผ่านยีน *MKI67* เนื่องจากสารสกัดสูตรตำรับสามารถลดการแสดงออกของยีน *MKI67* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องด้วยโปรตีน Ki-67 สามารถตรวจพบได้ในกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยแสดงออกมากในช่วงที่เซลล์กำลังแบ่งตัว (Sun et al., 2017) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันผลของสารสกัดสูตรตำรับในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 (หัวข้อ 4.2.2) ผ่านกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน *MKI67* อีกทั้งจากผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *KRAS* พบว่าสารสกัดสูตรตำรับสามารถลดการแสดงออกของยีน *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 เนื่องจากยีน *KRAS* ถูกจัดเป็นยีนก่อมะเร็ง และฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของยีน *KRAS* จึงอาจสามารถลดการทำงานในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ยับยั้งการตายของเซลล์ เพิ่มการแบ่งเซลล์ผ่านวัฏจักรเซลล์ (Ferreira et al., 2022; Kim et al., 2021) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรอื่นร่วมกับเห็ดกระถินพิมานในสูตรตำรับมีฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งชักนำการส่งสัญญาณอะพอพโทซิสภายในเซลล์มะเร็ง HT-29 และลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ส่งผลยับยั้งเซลล์ในวัฏจักรเซลล์

สารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานไม่สามารถชักนำการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* และ *KRAS* ในเซลล์ HT-29 แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 อีกทั้งผลการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ HT-29 ไม่ถูกควบคุมผ่านกลไกของยีน *MKI67* เนื่องจากผลการทดสอบสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานไม่สามารถลดการแสดงออกของยีน *MKI67* แตกต่างจากชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 แต่อาจควบคุมผ่านกลไกของยีนและเส้นทางการส่งสัญญาณอื่นเช่น เส้นทาง PI3K/Akt เส้นทาง Ras/MAPK หรือเส้นทาง JAK/STAT (Tang and Xue, 2018) ผลการยับยั้งเซลล์ในระยะ G_2 ของวัฏจักรเซลล์อาจเป็นผลมาจากมาจากองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการ

แสดงออกของยีน Cyclin Dependent Kinase 1 (CDK1) โปรตีน CDK1 ถูกยับยั้งจึงทำให้เซลล์ถูกสะสมในระยะ G₂ (Wijnen et al., 2021) และผลการชักนำการตายผ่านกลไกอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ไม่เกี่ยวข้องกับยีน *IFNGR1* และ *KRAS* แต่อาจชักนำผ่านกลไกการทำงานของยีน *Tumor Necrosis Factor (TNF) Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน TNF และ TRAIL โดยจัดเป็นปัจจัยภายนอกที่ชักนำการส่งสัญญาณอะพอพโทซิส (Ndebele et al., 2008) ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางในการศึกษาการควบคุมของสารสกัดสูตร 100% เติบโตกระถินพิมานในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผ่านการทำงานของยีนในเส้นทางข้างต้นต่อไปในอนาคต

ดังนั้นจากผลการศึกษาในระดับโมเลกุล พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดสูตรตำรับมีผลต่อการเพิ่มและลดแสดงออกของยีนที่ศึกษา โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของโปรตีนฮิสโตน (Histone) ในการควบคุมการดัดหมู่อะเซทิล (acetyl group) (Deacetylation) ออกจากโปรตีนฮิสโตน หรือเติมหมู่อะเซทิล (Acetylation) ให้กับโปรตีนฮิสโตน ส่งผลต่อการจับแน่นหรือคลายตัวของสายดีเอ็นเอ การศึกษาของ Mark B. Lucera และคณะพบว่า Vorinostat (SAHA) ควบคุมการเพิ่มการแสดงออกของ CD4⁺ โดยการไปเติมหมู่อะเซทิลให้กับไลซีน (lysine) ส่งผลทำให้ความเป็นบวกของโปรตีนฮิสโตนลดลง (เป็นกลางมากขึ้น) จึงเกิดการคลายตัวของสายดีเอ็นเอทำให้ transcription factors สามารถมาจับและเกิดการถอดรหัสของสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้ CD4⁺ มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นไวต่อการกำจัดเชื้อ HIV (Lucera et al., 2014) และการศึกษาของ Francine Foss และคณะ พบว่า Belinostat (PXD101) ถูกจัดเป็น Histone deacetylases (HDACs) ที่มีฤทธิ์ในการควบคุม epigenetic ของการแสดงออกของยีนโดยการป้องกันการเข้ามาจับของหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮิสโตน ทำให้ฮิสโตนมีประจุเป็นบวกและจับกับดีเอ็นเอแน่นขึ้น ส่งผลกระตุ้นให้เกิดการหยุดวัฏจักรของเซลล์ การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และการลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลง (Foss et al., 2015) จากการศึกษาข้างต้นจึงอาจกล่าวได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดสูตรตำรับมีฤทธิ์เพิ่มและลดการแสดงออกของยีนในกลไกของการควบคุมการเติมหรือยับยั้งการจับของหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮิสโตน ส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการเป็นแนวทางศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดสูตรตำรับมีความสามารถในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 SW620 และ HT-29 หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรอื่นที่เป็นองค์ประกอบร่วมในสูตรตำรับสามารถช่วยส่งเสริมความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ศึกษา อีกทั้งยังสามารถยับยั้งวัฏจักรเซลล์ของดังกล่าว สอดคล้องกับความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน *KRAS* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ SW620 HT-29 และ PC-3 ดังนั้นการชักนำการสะสมของประชากรเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ของสารสกัดสูตรตำรับอาจเกี่ยวข้องกับการลดการทำงานในเส้นทางการส่งสัญญาณของยีน *KRAS* ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ผลการสะสมของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมเส้นทางการส่งสัญญาณผ่านเส้นทางอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการ *KRAS* อีกทั้งสารสกัดสูตรตำรับสามารถชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการเพิ่มการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ HCT116 แต่ในเซลล์ HT29 สารสกัดสูตรตำรับสามารถลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* เนื่องจากหาก $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ทำงานร่วมกันจะไปส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้นในเซลล์มะเร็งดังกล่าวสารสกัดสูตรตำรับจึงมีฤทธิ์ชักนำการลดการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณจำเพาะของ $IFN-\gamma$ แต่เนื่องด้วยสารสกัดสูตรตำรับส่งเสริมการชักนำการตายของเซลล์ PC-3 แบบ necrosis ฉะนั้นกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสอาจไม่ใช่กลไกหลักของสารสกัดสูตรตำรับในการชักนำการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก จากผลการทดสอบในการศึกษานี้จึงมีความน่าสนใจในการนำผลการศึกษาไปเป็นแนวทางในการพัฒนานำยาสมุนไพรใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ไตและตับปกติหลังจากได้รับสารสกัดสูตร อีกทั้งยังเป็นแนวทางในอนาคตต่อการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกชักนำการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ การชักนำการตายของมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งต่อมลูกหมากผ่านกลไกอะพอพโทซิส รวมถึงการแสดงออกของยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องในกลไกดังกล่าว เพื่อใช้ในการพัฒนายาสมุนไพรให้มีความเหมาะสม ปลอดภัย และดีขึ้นในการใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- Alvarez, C. S., Virani, S., Meza, R., Rozek, L. S., Sriplung, H., and Mondul, A. M. 2018. Current and future burden of prostate cancer in Songkhla, Thailand: analysis of incidence and mortality trends from 1990 to 2030. Journal of Global Oncology, 4, 1-11.
- Barkley, L. R., Ohmori, H., and Vaziri, C. 2007. Integrating S-phase checkpoint signaling with trans-lesion synthesis of bulky DNA adducts. Cell Biochemistry and Biophysics, 47, 392-408.
- Bernabei, P., Coccia, E. M., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Forni, G., Pestka, S., Krause, C. D., Battistini, A., and Novelli, F. 2001. Interferon- γ receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. Journal of Leukocyte Biology, 70(6), 950-960.
- Bogaert, J., and Prenen, H. 2014. Molecular genetics of colorectal cancer. Annals of Gastroenterology, 27(1), 9-14.
- Brandt, A., Sundquist, J., and Hemminki, K. 2012. Risk for incident and fatal prostate cancer in men with a family history of any incident and fatal cancer. Annals of Oncology, 23(1), 251-256.
- Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., and Bray, F. (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. European Urology, 61(6), 1079-1092.
- Chalertpet, K., Pin-On, P., Aporntewan, C., Patchsung, M., Ingrungruaglert, P., Israsena, N., and Mutirangura, A. 2019. Argonaute 4 as an effector protein in RNA-directed DNA methylation in human cells. Frontiers in Genetics, 10, 645.
- Chalertpet, K., Sangkheereput, T., Somjit, P., Bankeeree, W., and Yanatatsaneejit, P. 2023. Effect of Smilax spp. and Phellinus linteus combination on cytotoxicity and cell proliferation of breast cancer cells. BMC Complementary Medicine and Therapies, 23(1), 1-20.
- Chan, J. M., Stampfer, M. J., Ma, J., Gann, P. H., Gaziano, J. M., and Giovannucci, E. L. 2001. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health

- Study. The American Journal of Clinical Nutrition, 74(4), 549-554.
- Chan, L. L., Zhong, X., Qiu, J., Li, P. Y., and Lin, B. 2011. Cellometer vision as an alternative to flow cytometry for cell cycle analysis, mitochondrial potential, and immunophenotyping. Cytometry Part A, 79(7), 507-517.
- Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R. J., Macy, M., and Peterson, W., Jr. 1987. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. Cancer Genet Cytogenet, 27(1), 125-134.
- Chen, W., Tan, H., Liu, Q., Zheng, X., Zhang, H., Liu, Y., and Xu, L. 2019. A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*. Molecules, 24(10), 1888.
- Collaboration, C. f. C. C. M.-A. 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, 26(35), 5802-5812.
- Cornelissen, M., Philippé, J., De Sitter, S., and De Ridder, L. 2002. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. Apoptosis, 7(1), 41-47.
- Crawford, E. D. 2003. Epidemiology of prostate cancer. Urology, 62(6), 3-12.
- Culp, M. B., Soerjomataram, I., Efstathiou, J. A., Bray, F., and Jemal, A. 2020. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates. European Urology, 77(1), 38-52.
- Darzynkiewicz, Z. 2011. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. Current Protocols in Cytometry, Chapter 7, 7.2.1-7.2.8.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology, 35(4), 495-516.
- Ferguson, T. A., Choi, J., and Green, D. R. 2011. Armed response: how dying cells influence T-cell functions. Immunological Reviews, 241(1), 77-88.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., and Bray, F. 2018. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 3(20), 2019.
- Fernandez de Mattos, S., Villalonga, P., Clardy, J., and Lam, E. W. 2008. FOXO3a

- mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, 7(10), 3237-3246.
- Ferreira, A., Pereira, F., Reis, C., Oliveira, M. J., Sousa, M. J., and Preto, A. 2022. Crucial Role of Oncogenic KRAS Mutations in Apoptosis and Autophagy Regulation: Therapeutic Implications. Cells, 11(14).
- Foss, F., Advani, R., Duvic, M., Hymes, K. B., Intragumtornchai, T., Lekhakula, A., Shpilberg, O., Lerner, A., Belt, R. J., and Jacobsen, E. D. 2015. A Phase II trial of Belinostat (PXD 101) in patients with relapsed or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma. British journal of haematology, 168(6), 811-819.
- Gopalsatheeskumar, K. 2018. Significant role of soxhlet extraction process in phytochemical research. Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences, 7(1), 43-47.
- Greene, F. L., Balch, C. M., Fleming, I. D., Fritz, A., Haller, D. G., Morrow, M., and Page, D. L. 2002. AJCC Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors. Springer Science & Business Media.
- Gu, G. 1955. Shen Nong's herbal classic. Peking, China: People's Medical Publishing House.
- Guo, J., Zhu, T., Collins, L., Xiao, Z. X. J., Kim, S. H., and Chen, C. Y. 2007. Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by Phellinus linteus. Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 46(2), 144-154.
- Haggar, F. A., and Boushey, R. P. 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clinics in colon and rectal surgery, 22(04), 191-197.
- Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K.-H., and Kim, H. M. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from Phellinus linteus on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology, 41(2), 157-164.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S., Kosary, C., Ruhl, J., Tatalovich, Z., and Cho, H. 2012. SEER cancer statistics review, 1975–2009 (vintage 2009 populations). Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1975-

2009.

- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. Gan, 59(2), 155-157.
- Inayat-Hussain, S., Rajab, N., and Siew, E. 2009. In vitro testing of biomaterials toxicity and biocompatibility. In Cellular Response to Biomaterials (pp. 508-537). Elsevier.
- Israels, E., and Israels, L. 2000. The cell cycle. The Oncologist, 5(6), 510-513.
- Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., and Hajdúch, M. 2010. Clinical relevance of KRAS in human cancers. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010.
- Jeen, P., Tongban, S., Yana, P., Wongta, A., Sutan, K., Yadoung, S., and Hongsihong, S. 2022. Tentative Identification of Phytochemicals from *Smilax glabra* and *Smilax corbularia* Extracts by LC-QTOF/MS and Their Bioactive Potential. Plants, 11(16), 2089.
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., and Berry, D. A. 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. Cancer Causes & Control, 24(6), 1207-1222.
- Jullumstrø, E., Wibe, A., Lydersen, S., and Edna, T. H. 2011. Colon cancer incidence, presentation, treatment and outcomes over 25 years. Colorectal Disease, 13(5), 512-518.
- Karanikas, M., and Esebidis, A. 2016. Increasing incidence of colon cancer in patients < 50 years old: a new entity? Annals of Translational Medicine, 4(9).
- Kato, J., Futamura, M., Kanematsu, M., Gaowa, S., Mori, R., Tanahashi, T., Matsuhashi, N., and Yoshida, K. 2016. Combination therapy with zoledronic acid and cetuximab effectively suppresses growth of colorectal cancer cells regardless of KRAS status. International journal of cancer, 138(6), 1516-1527.
- Kim, H. G., Yoon, D. H., Lee, W. H., Han, S. K., Shrestha, B., Kim, C. H., Lim, M. H., Chang, W., Lim, S., and Choi, S. 2007. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. Journal of ethnopharmacology, 114(3), 307-315.

- Kim, H. J., Lee, H. N., Jeong, M. S., and Jang, S. B. 2021. Oncogenic KRAS: Signaling and Drug Resistance. Cancers (Basel), 13(22).
- Klm, J. H., Kim, Y. C., and Park, B. 2016. Hispolon from *Phellinus linteus* induces apoptosis and sensitizes human cancer cells to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through upregulation of death receptors. Oncology Reports, 35(2), 1020-1026.
- Konno, S., Chu, K., Feuer, N., Phillips, J., and Choudhury, M. 2015. Potent anticancer effects of bioactive mushroom extracts (*Phellinus linteus*) on a variety of human cancer cells. Journal of Clinical Medicine Research, 7(2), 76.
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., and Sivas, H. 2017. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In V. Kuete (Ed.), Medicinal Spices and Vegetables from Africa (pp. 271-297). Academic Press.
- Kukongviriyapan, V., and Buranrat, B. 2009. New strategy of cancer targeting chemotherapy. Srinagarind Medical Journal, 24(1), 78-90.
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., and Gatta, G. 2010. Colon cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 74(2), 106-133.
- Lee, M. M., Wang, R.-T., Hsing, A. W., Gu, F.-L., Wang, T., and Spitz, M. 1998. Case-control study of diet and prostate cancer in China. Cancer Causes & Control, 9(6), 545-552.
- Lemieszek, M., and Rzeski, W. 2012. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia, 16(4), 285-289.
- Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Smith, R. A., Brooks, D., Andrews, K. S., Dash, C., Giardiello, F. M., Glick, S., Levin, T. R., Pickhardt, P., Rex, D. K., Thorson, A., and Winawer, S. J. 2008. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 58(3), 130-160.
- Li, G., Kim, D.-H., Kim, T.-D., Park, B.-J., Park, H.-D., Park, J.-I., Na, M.-K., Kim, H.-C., Hong,

- N.-D., and Lim, K. 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G₂/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. Cancer Letters, 216(2), 175-181.
- Li, N., Wang, C., Georgiev, M. I., Bajpai, V. K., Tundis, R., Simal-Gandara, J., Lu, X., Xiao, J., Tang, X., and Qiao, X. 2021. Advances in dietary polysaccharides as anticancer agents: Structure-activity relationship. Trends in Food Science & Technology, 111, 360-377.
- Li, Y.-G., Ji, D.-F., Zhong, S., Zhu, J.-X., Chen, S., and Hu, G.-Y. 2011. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma. International journal of biological macromolecules, 48(3), 511-517.
- Lou, J., Zhou, Y., Feng, Z., Ma, M., Yao, Y., Wang, Y., Deng, Y., and Wu, Y. 2020. Caspase-Independent Regulated Necrosis Pathways as Potential Targets in Cancer Management. Frontiers in Oncology, 10, 616952.
- Lu, X. 2012. 9 - p53: A Target and a Biomarker of Cancer Therapy? In X.-Y. Liu, S. Pestka, and Y.-F. Shi (Eds.), Recent Advances in Cancer Research and Therapy (pp. 197-213).
- Lucera, M. B., Tilton, C. A., Mao, H., Dobrowolski, C., Tabler, C. O., Haqqani, A. A., Karn, J., and Tilton, J. C. 2014. The histone deacetylase inhibitor vorinostat (SAHA) increases the susceptibility of uninfected CD4⁺ T cells to HIV by increasing the kinetics and efficiency of postentry viral events. Journal of virology, 88(18), 10803-10812.
- Lukka, H., Hirte, H., Fyles, A., Thomas, G., Elit, L., Johnston, M., Fung, M. F. K., and Browman, G. 2002. Concurrent cisplatin-based chemotherapy plus radiotherapy for cervical cancer—a meta-analysis. Clinical Oncology, 14(3), 203-212.
- Lv, N., Gao, Y., Guan, H., Wu, D., Ding, S., Teng, W., and Shan, Z. 2015. Inflammatory mediators, tumor necrosis factor- α and interferon- γ , induce EMT in human PTC cell lines. Oncology Letters, 10(4), 2591-2597.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30(6), 1292-1305.

- Majoros, A., Platanitis, E., Kernbauer-Hölzl, E., Rosebrock, F., Müller, M., and Decker, T. 2017. Canonical and non-canonical aspects of JAK–STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses. Frontiers in immunology, 8, 29.
- Markowitz, S. D., Dawson, D. M., Willis, J., and Willson, J. K. 2002. Focus on colon cancer. Cancer Cell, 1(3), 233-236.
- Monroe, K. R., Yu, M. C., Kolonel, L. N., Coetzee, G. A., Wilkens, L. R., Ross, R. K., and Henderson, B. E. 1995. Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. Nature Medicine, 1(8), 827-829.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65(1-2), 55-63.
- Mucci, L. A., Hjelmborg, J. B., Harris, J. R., Czene, K., Havelick, D. J., Scheike, T., Graff, R. E., Holst, K., Möller, S., and Unger, R. H. 2016. Familial risk and heritability of cancer among twins in Nordic countries. JAMA, 315(1), 68-76.
- Murad, H., Hawat, M., Ekhtiar, A., AUapawe, A., Abbas, A., Darwish, H., Sbenati, O., and Ghannam, A. 2016. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. Cancer Cell International 16, 39.
- Ndebele, K., Gona, P., Jin, T. G., Benhaga, N., Chalah, A., Degli-Esposti, M., and Khosravi-Far, R. 2008. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipid scramblase-3. Apoptosis, 13(7), 845-856.
- Ni, C., Wu, P., Zhu, X., Ye, J., Zhang, Z., Chen, Z., Zhang, T., Zhang, T., Wang, K., Wu, D., Qiu, F., and Huang, J. 2013. IFN- γ selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells. Cancer Letters, 336(1), 174-184.
- Organization, W. H. 2008. WHO mortality database: tables. Geneva: World Health Organization.
- Pan, Z., Luo, Y., Xia, Y., Zhang, X., Qin, Y., Liu, W., Li, M., Liu, X., Zheng, Q., and Li, D. 2020. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the S phase and promotes

- apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 122, 109763.
- Pan, Z., Zhang, X., Yu, P., Chen, X., Lu, P., Li, M., Liu, X., Li, Z., Wei, F., and Wang, K. 2019. Cinobufagin induces cell cycle arrest at the G₂/M phase and promotes apoptosis in malignant melanoma cells. Frontiers in Oncology, 9, 853.
- Park, H.-J., Park, J.-B., Lee, S.-J., and Song, M. 2017. Phellinus linteus grown on germinated brown rice increases cetuximab sensitivity of KRAS-mutated colon cancer. International Journal of Molecular Sciences, 18(8), 1746.
- Parkin, D. M., Bray, F., and Devesa, S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. European Journal of Cancer, 37, 4-66.
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., and Mucci, L. A. 2018. The epidemiology of prostate cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8(12), a030361.
- Pleninger, D., and Volk, T. 2005. *Phellinus igniarius*, *lqmik*, used by native Americans with tobacco.
- Quinn, M., and Babb, P. 2002. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. BJU international, 90(2), 162-173.
- Races, A., and Sexes, B. 2002. Seer cancer statistics review 1973-1999. Bethesda: National Cancer Institute.
- Rajha, H. N., El Darra, N., Louka, N., Maroun, R. G., Ziegler, W., and Böchzelt, H. 2012. Valorization of industrial waste using energy saving procedures. Phenolic compounds purification from grape by-products by Accelerated Solvent Extraction (ASE). 2012 International Conference on Renewable Energies for Developing Countries (REDEC),
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. 2013. An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath, 3(3), 71-85.
- Sa, F., Gao, J.-L., Fung, K.-P., Zheng, Y., Lee, S. M.-Y., and Wang, Y.-T. 2008. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines. Chemico-biological interactions, 171(1), 1-14.
- Sakr, W., Haas, G., Cassin, B., Pontes, J., and Crissman, J. 1993. The frequency of

- carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. The Journal of Urology, 150(2), 379-385.
- Santarpia, L., Lippman, S. M., and El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 16(1), 103-119.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Leukocyte Biology, 75(2), 163-189.
- Schroy, P. C., 3rd, Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K. A., Murnane, M. J., Yang, S., O'Brien, M. J., Carney, W. P., and Kupchik, H. Z. 1995. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. Cancer, 76(2), 201-209.
- Schwab, M. 2001. Encyclopedic reference of cancer. Springer Science and Business Media.
- Shen, Y., and White, E. 2001. p53-dependent apoptosis pathways. Advances in Cancer Research, 82, 55-84.
- Sliva, D. 2010. Medicinal mushroom *Phellinus linteus* as an alternative cancer therapy. Experimental and Therapeutic Medicine, 1(3), 407-411.
- Soheili, Z., and Samiei, S. 2005. Real time PCR: principles and application. Hepatitis Monthly, 5(3), 83-87.
- Sohn, H.-Y., Shin, Y.-K., and Kim, J.-S. 2010. Anti-proliferative activities of solid-state fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* against human colorectal HCT116 cell. Journal of Life Science, 20(8), 1268-1275.
- Song, M., Ping, Y., Zhang, K., Yang, L., Li, F., Zhang, C., Cheng, S., Yue, D., Maimela, N. R., Qu, J., Liu, S., Sun, T., Li, Z., Xia, J., Zhang, B., Wang, L., and Zhang, Y. 2019. Low-Dose IFN γ Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Research, 79(14), 3737-3748.
- Sorenson, C. M., and Eastman, A. 1988. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. Cancer Research, 48(16), 4484-4488.

- Strickler, H. D., and Goedert, J. J. 2001. Sexual behavior and evidence for an infectious cause of prostate cancer. Epidemiologic Reviews, 23(1), 144-151.
- Sun, X., Bizhanova, A., Matheson, T. D., Yu, J., Zhu, L. J., and Kaufman, P. D. 2017. Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. Journal of Molecular Cell Biology, 37(17).
- Sylvester, P. W. 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In Drug Design and Discovery (pp. 157-168). Springer.
- Tang, H., and Xue, G. 2018. Major Physiological Signaling Pathways in the Regulation of Cell Proliferation and Survival. Handbook of Experimental Pharmacology, 249, 13-30.
- Tau, G., and Rothman, P. 1999. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. Allergy, 54(12), 1233-1251.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. 2010. Inflammation and colon cancer. Gastroenterology, 138(6), 2101-2114. e2105.
- Thabrew, M. I., Mitry, R. R., Morsy, M. A., and Hughes, R. D. 2005. Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. Life sciences, 77(12), 1319-1330.
- Tiankanon, K., Aniwan, S., and Rerknimitr, R. 2021. Current status of colorectal cancer and its public health burden in Thailand. Clinical Endoscopy, 54(4), 499-504.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. Journal of Immunological Methods, 184(1), 39-51.
- Virani, S., Bilheem, S., Chansaard, W., Chitapanarux, I., Daoprasert, K., Khuanchana, S., Leklob, A., Pongnikorn, D., Rozek, L. S., Siritarechakul, S., Suwanrungruang, K., Tassanasunthornwong, S., Vatanasapt, P., and Sriplung, H. 2017. National and Subnational Population-Based Incidence of Cancer in Thailand: Assessing Cancers with the Highest Burdens. Cancers (Basel), 9(8).
- 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. Biomed Pharmacother, 102, 18-25.
- Wijnen, R., Pecoraro, C., Carbone, D., Fuji, H., Avan, A., Peters, G. J., Giovannetti, E., and Diana, P. 2021. Cyclin Dependent Kinase-1 (CDK-1) Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). Cancers (Basel), 13(17).
- Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., and Noguchi, H. 2011. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, Smilax corbularia (Smilacaceae). Phytochemistry, 72(6), 495-502.
- Zapora, E., Wolkowycki, M., Bakier, S., and Zjawiony, J. K. 2016. Phellinus igniarius: A pharmacologically active polypore mushroom. Natural product communications, 11(7), 1934578X1601100741.
- Zhong, S., Ji, D.-F., Li, Y.-G., Lin, T.-B., Lv, Z.-Q., and Chen, H.-P. 2013. Activation of P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 pathway by polysaccharide from Phellinus linteus leads to S-phase arrest in HT-29 cells. Chemico-biological interactions, 206(2), 222-229.
- Zhong, S., Li, Y., Lin, T., Lyu, Z., and Ji, D. 2015. Effect of polysaccharide P1 from Phellinus linteus on cell cycle and calcium/calmodulin-dependent protein signal pathway in HepG2 cells. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 29(3), 417-423.
- Zhu, T., Guo, J., Collins, L., Kelly, J., Xiao, Z., Kim, S., and Chen, C. 2007. Phellinus linteus activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. British Journal of Cancer, 96(4), 583-590.
- Zhu, T., Kim, S.-H., and Chen, C.-Y. 2008. A medicinal mushroom: Phellinus linteus. Current Medicinal Chemistry, 15(13), 1330-1335.

ภาคผนวก

ผลการคำนวณความเข้มข้นของสารสกัด

ตารางที่ 4 ข้อมูลน้ำหนักของสารสกัดสูตรตำรับก่อนและหลังการอบแห้ง

ปีกเกอร์	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักก่อนอบ - น้ำหนักหลังอบ
1	28.788	28.948	0.160
2	32.885	32.720	0.165
3	29.494	29.331	0.163
ค่าเฉลี่ย			0.163

คำนวณความเข้มข้น

ปริมาตรสารสกัดสูตรตำรับก่อนอบ	10	มิลลิลิตร
ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ	$0.163 / 10 \times 10^{-6}$	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ	16,300	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ข้อมูลน้ำหนักของสารสกัดสูตร 100% เติดกระถินพืมาณก่อนและหลังการอบแห้ง

ปีกเกอร์	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักก่อนอบ - น้ำหนักหลังอบ
1	29.982	30.408	0.426
2	32.722	33.149	0.427
3	29.333	29.760	0.427
ค่าเฉลี่ย			0.427

คำนวณความเข้มข้น

ปริมาตรสารสกัดสูตรตำรับก่อนอบ	10	มิลลิลิตร
ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ	$0.427 / 10 \times 10^{-6}$	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ	42,700	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สูตรคำนวณหาค่า % cell viability

$$\% \text{ cell viability}_x = \frac{(\text{Abs}_x - \text{Mean of Abs}_{cc})}{(\text{Mean of Abs}_b - \text{mean of Abs}_{cc})} \times 100$$

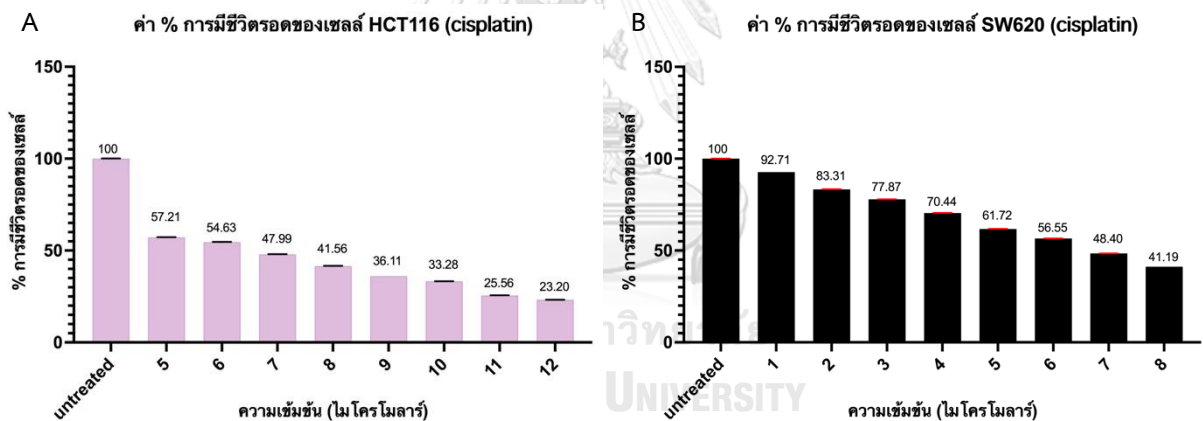
%cell viability_x : ค่า % การมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น X

Abs_x : ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น X

Mean of Abs_{cc} : ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงชุดการทดลองที่ไม่มีเซลล์

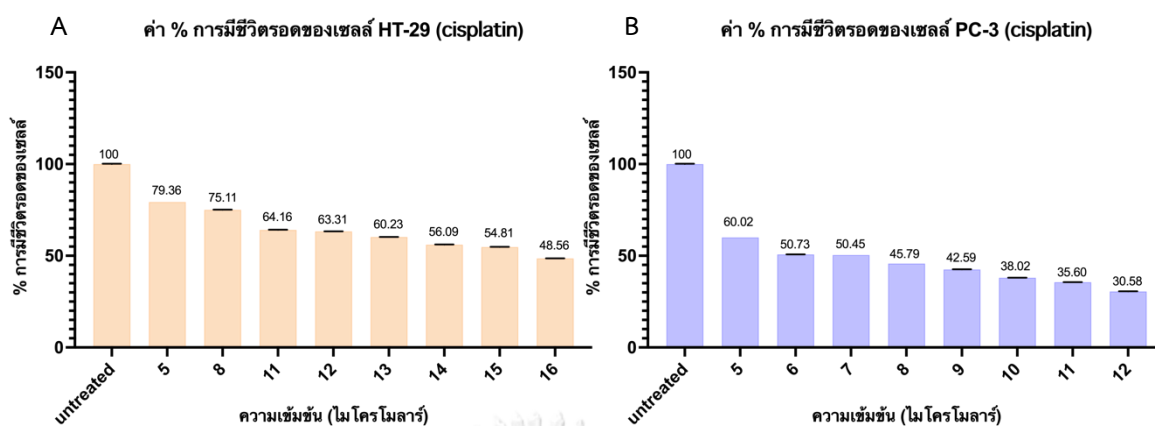
Mean of Abs_b : ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุม

ผลทดสอบการมีชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับซิสพลาติน



รูปที่ 30 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์มะเร็งลำไส้

(A) HCT116 และ (B) SW620 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ



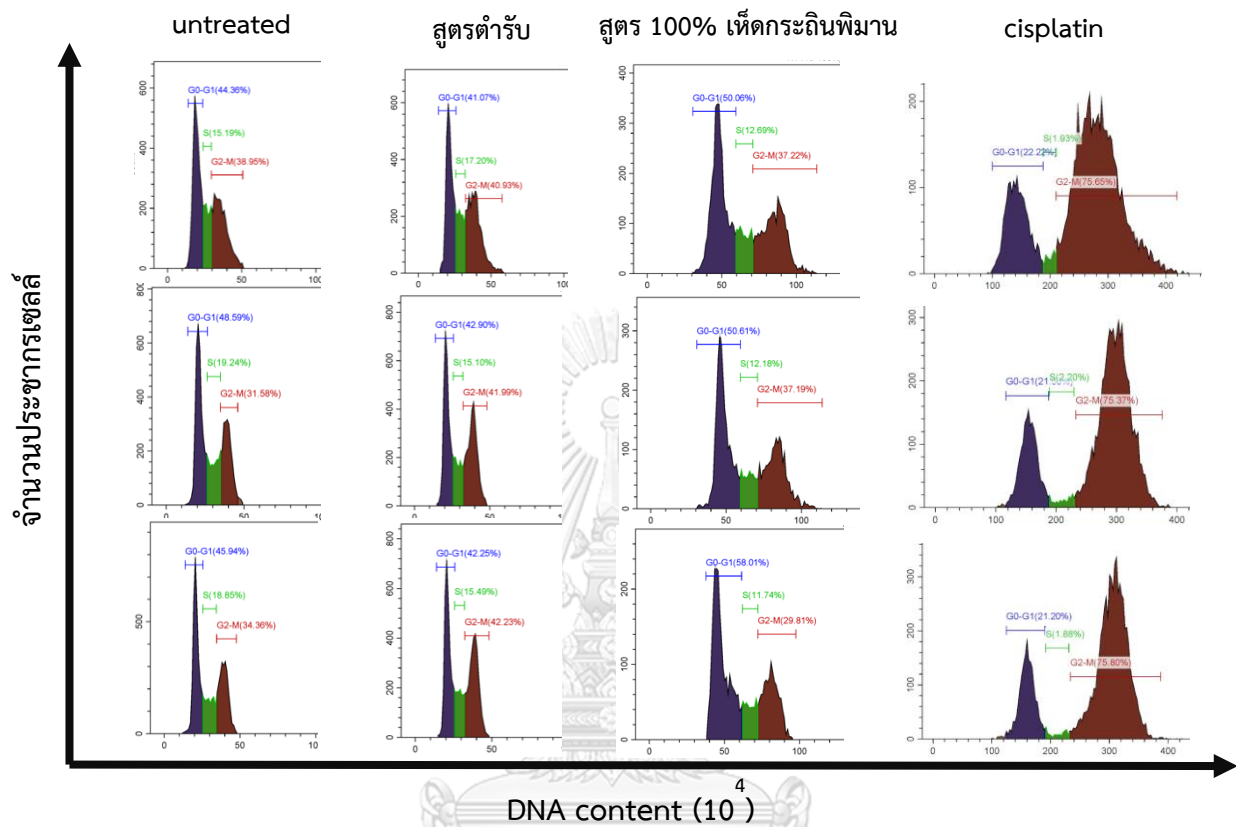
รูปที่ 31 ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งต่อมลูกหมาก

(A) HT-29 และ (B) PC-3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ค่า IC_{50} สมการถดถอยอย่างง่าย และค่า R-squared ของชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) ในเซลล์ HCT116, SW620, HT-29 และ PC-3

Cells	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	simple linear regression	R-squared
HCT116	1.98	$y = -5.1545x + 83.755$	0.9898
SW620	2.04	$y = -7.2362x + 99.088$	0.9966
HT-29	4.80	$y = -3.1115x + 99.883$	0.9803
PC-3	2.16	$y = -4.1032x + 79.675$	0.9941

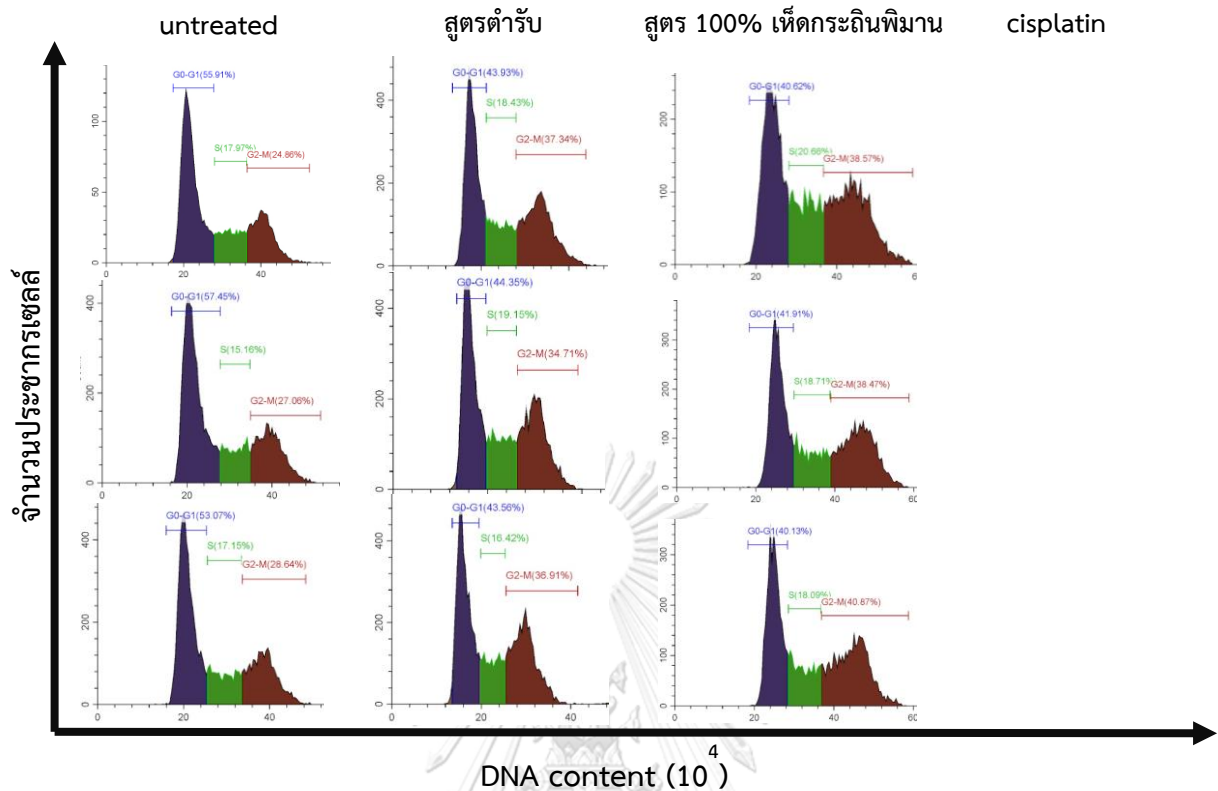
ผลการวิเคราะห์การทดสอบวัฏจักรเซลล์วัดผลโดยเครื่อง Dx FLEX Flow cytometer



รูปที่ 32 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% หาระงินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

ตารางที่ 7 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 สะสมในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เกิดกระถินพิมาน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก ซิสพลาติน

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116					
Phases of Cell cycle					
ตัวอย่าง	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	G_0 - G_1	S	G_2	
untreated		Replicate 1	44.36	15.19	38.95
		Replicate 2	48.59	19.24	31.58
		Replicate 3	45.94	18.85	34.36
		ค่าเฉลี่ย	46.297	17.760	34.963
		SD	1.234	1.290	2.149
recipe	167	Replicate 1	41.07	17.2	40.93
		Replicate 2	42.9	15.1	41.99
		Replicate 3	42.25	15.49	42.23
		ค่าเฉลี่ย	42.073	15.930	41.717
		SD	0.536	0.645	0.399
100% <i>P.linteus</i>	1,100	Replicate 1	50.06	12.69	37.22
		Replicate 2	50.61	12.18	37.19
		Replicate 3	58.01	11.74	29.81
		ค่าเฉลี่ย	52.893	12.203	34.740
		SD	2.563	0.274	2.465
cisplatin	1.98	Replicate 1	22.22	1.93	75.65
		Replicate 2	21.53	2.2	75.37
		Replicate 3	21.2	1.88	75.8
		ค่าเฉลี่ย	21.650	2.003	75.607
		SD	0.300	0.099	0.126



รูปที่ 33 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ และสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมาน ชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

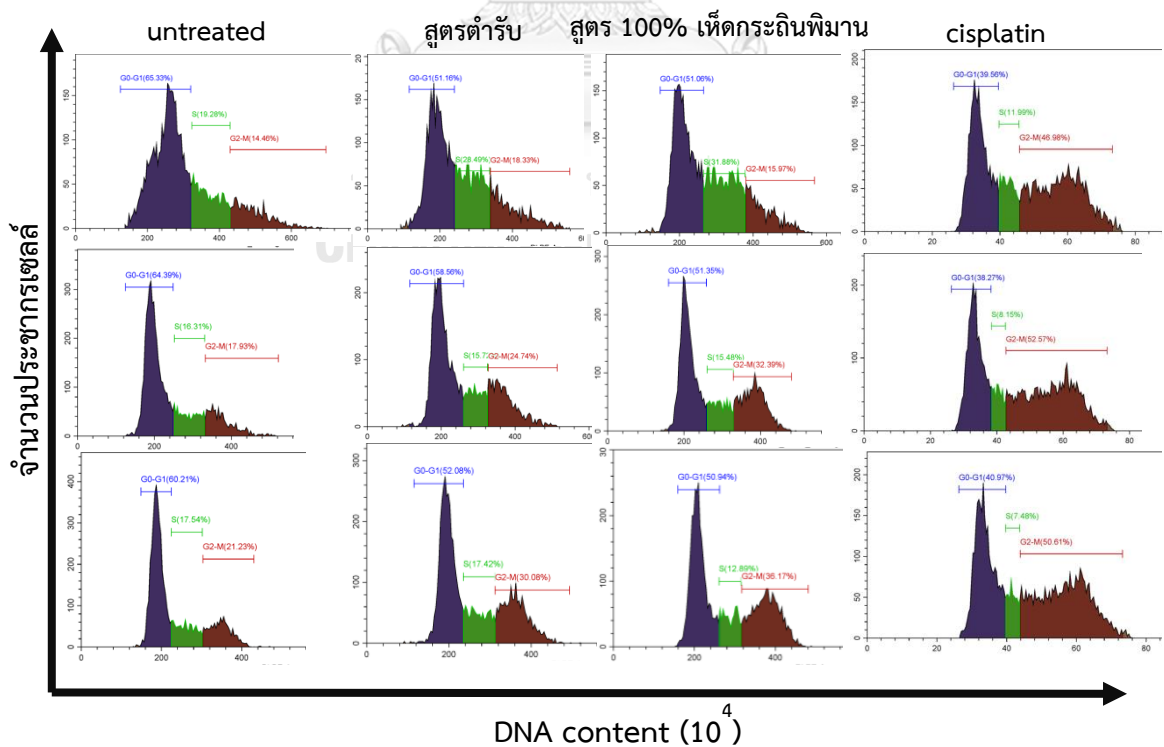
ตารางที่ 8 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 สะสมในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก ซิสพลาติน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620

ตัวอย่าง	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Phases of Cell cycle		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂
untreated	Replicate 1	62.44	10.18	26.66
	Replicate 2	58.05	11.41	29.62
	Replicate 3	57.17	12.04	30.4
	ค่าเฉลี่ย	59.220	11.210	28.893
	SD	1.630	0.546	1.139

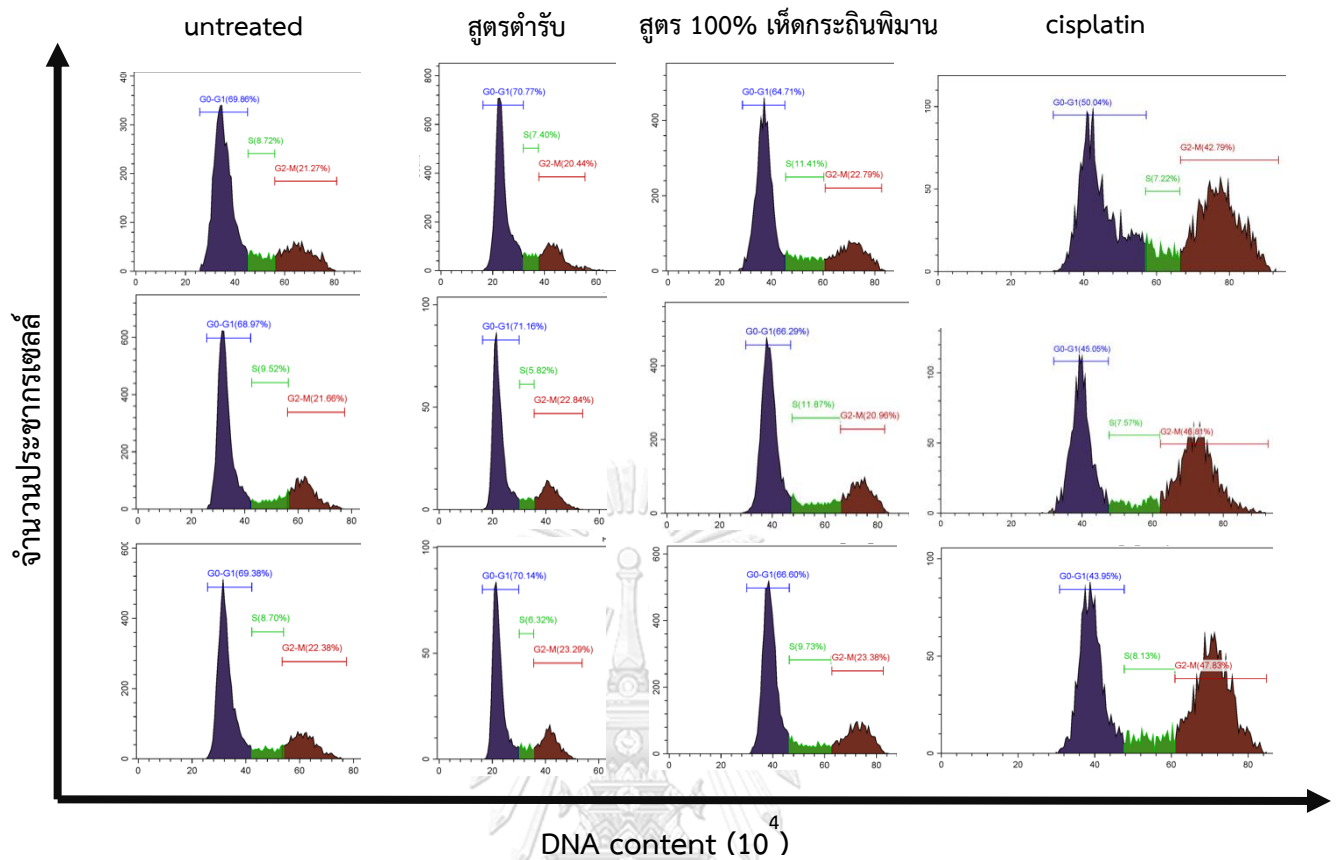
		Replicate 1	50.62	15.15	33.41
		Replicate 2	50.32	13.51	34.75
recipe	156	Replicate 3	52.69	14.57	31.39
		ค่าเฉลี่ย	51.210	14.410	33.183
		SD	0.745	0.480	0.977
		Replicate 1	53.2	14.58	30.75
		Replicate 2	49.86	13.4	36.63
100%	1,104	Replicate 3	50.77	12.95	34.36
<i>P.linteus</i>		ค่าเฉลี่ย	51.277	13.643	33.913
		SD	0.997	0.486	1.712
		Replicate 1	-	-	-
		Replicate 2	-	-	-
cisplatin	2.04	Replicate 3	-	-	-
		ค่าเฉลี่ย	-	-	-
		SD	-	-	-



รูปที่ 34 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% เห็ดกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งรังไข่ใหญ่ชนิด HT-29 สะสมในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เกิดกระตุ้นปริมาณ ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก ซิสพลาติน

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งรังไข่ใหญ่ชนิด HT-29					
ตัวอย่าง	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Phases of Cell cycle			
		G ₀ -G ₁	S	G ₂	
untreated		Replicate 1	65.33	14.46	19.28
		Replicate 2	64.39	16.31	17.93
		Replicate 3	60.21	17.54	21.23
		ค่าเฉลี่ย	63.310	16.103	19.480
		SD	1.574	0.895	0.958
		recipe	492	Replicate 1	51.16
Replicate 2	58.56			15.72	24.74
Replicate 3	52.08			17.42	30.08
ค่าเฉลี่ย	53.933			17.157	27.770
SD	2.329			0.765	1.583
100% <i>P.linteus</i>	2,772			Replicate 1	51.06
		Replicate 2	51.35	15.48	32.39
		Replicate 3	50.94	12.89	36.17
		ค่าเฉลี่ย	51.117	14.780	33.480
		SD	0.122	0.956	1.353
		cisplatin	4.80	Replicate 1	39.56
Replicate 2	38.27			8.15	52.57
Replicate 3	40.97			7.48	50.61
ค่าเฉลี่ย	39.600			9.207	50.053
SD	0.780			1.405	1.638



รูปที่ 35 ฮิสโตแกรมร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 ในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% เห็ดกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

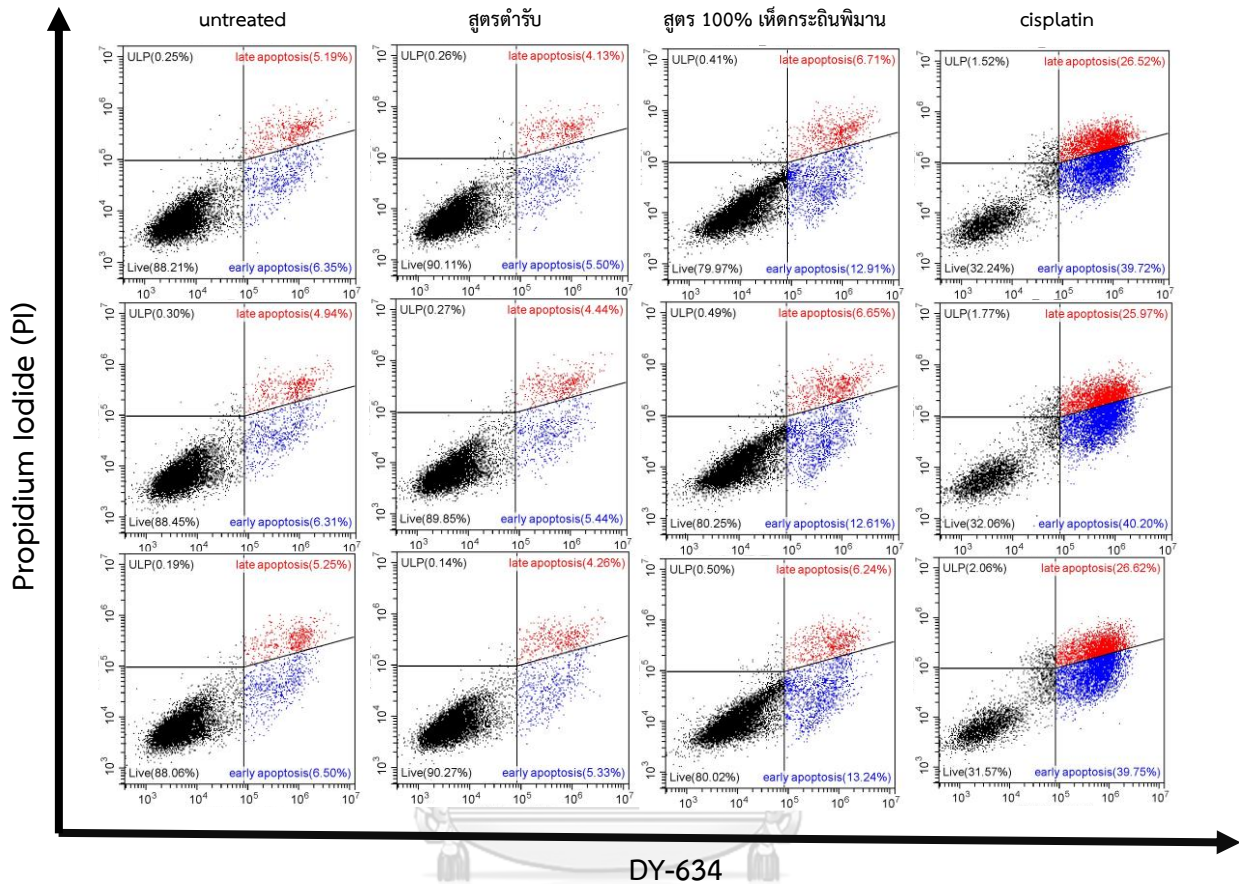
ตารางที่ 10 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 สะสมในวัฏจักรเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวก ซิสพลาติน

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3

ตัวอย่าง	IC50 (µg/ml)	Phases of Cell cycle		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂
untreated	Replicate 1	69.86	8.72	21.27
	Replicate 2	69.38	8.7	22.38
	Replicate 3	68.97	9.52	21.66

		ค่าเฉลี่ย	69.403	8.980	21.770
		SD	0.257	0.270	0.325
recipe	239	Replicate 1	70.77	7.4	20.44
		Replicate 2	71.16	5.82	22.84
		Replicate 3	70.14	6.32	23.29
		ค่าเฉลี่ย	70.690	6.513	22.190
		SD	0.297	0.466	0.885
100% <i>P.linteus</i>	1,494	Replicate 1	64.71	11.41	22.79
		Replicate 2	66.29	11.87	20.96
		Replicate 3	66.6	9.73	23.38
		ค่าเฉลี่ย	65.867	11.003	22.377
		SD	0.585	0.650	0.729
cisplatin	2.16	Replicate 1	50.04	7.22	42.79
		Replicate 2	45.05	7.57	46.81
		Replicate 3	43.95	8.13	47.83
		ค่าเฉลี่ย	46.347	7.640	45.810
		SD	1.874	0.265	1.538

ผลการวิเคราะห์การทดสอบการชักนำการตายของเซลล์ผ่านกลไกอะพอพโทซิสวัดผลโดยเครื่อง
DxFLEX Flow cytometer

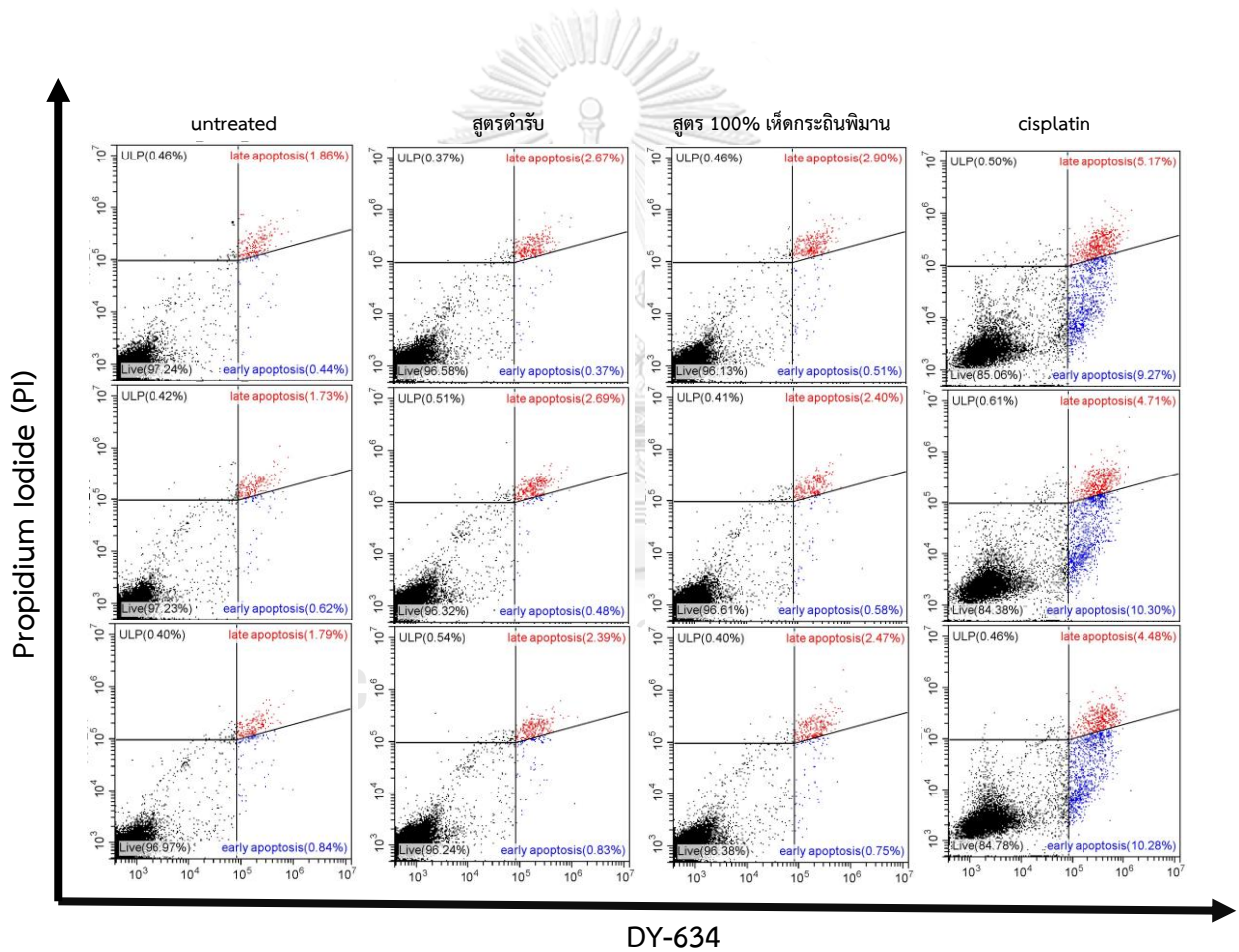


รูปที่ 36 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งรังลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116
หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% เติดกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน)
แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin V/PI standings

ตารางที่ 11 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เกิดกรณีพิษาน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติส

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116					
ตัวอย่าง	IC ₅₀ (µg/ml)	Live cells	Early apoptosis	Late apoptosis	necrosis
untreated	Replicate 1	96.33	1.06	1.35	
	Replicate 2	96.87	1.06	1.20	
	Replicate 3	96.82	1.20	1.17	
	ค่าเฉลี่ย	96.67	1.11	1.24	
	SD	0.172	0.047	0.056	
recipe	167	Replicate 1	96.4	0.77	1.86
	Replicate 2	96.1	1.25	1.69	
	Replicate 3	96.53	1.02	1.57	
	ค่าเฉลี่ย	96.343	1.013	1.707	
	SD	0.127	0.139	0.084	
100% <i>P.linteus</i>	1,100	Replicate 1	95.8	1.02	2.03
	Replicate 2	96	0.99	1.78	
	Replicate 3	96.37	1.25	1.54	
	ค่าเฉลี่ย	96.057	1.087	1.783	
	SD	0.167	0.082	0.141	

		Replicate	82.05	10.81	6.62
		1			
cisplatin	1.98	Replicate	81.83	11.13	6.39
		2			
		Replicate	81.71	11.63	5.83
		3			
		ค่าเฉลี่ย	81.863	11.190	6.280
		SD	0.100	0.239	0.235

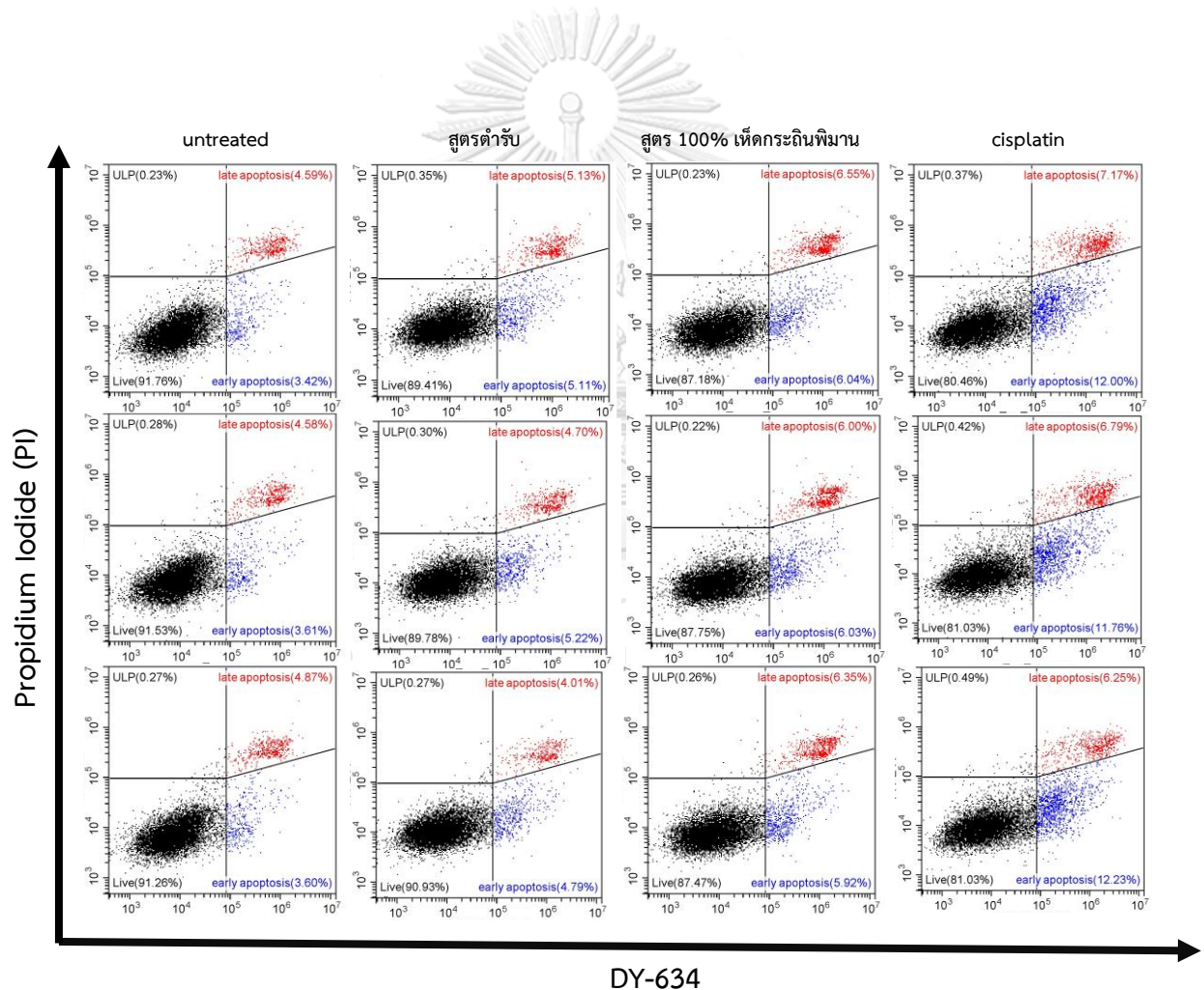


รูปที่ 37 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% เติดกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin V/PI standings

ตารางที่ 12 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 หลังจากได้รับสารสกัดสูตร
ตำรับ สูตร 100% เกิดกระถินพินาน ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติส

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620					
ตัวอย่าง	IC ₅₀ (µg/ml)	Live cells	Early apoptosis	Late apoptosis	necrosis
untreated		Replicate			
		1	97.24	0.44	1.86
		Replicate			
		2	97.23	0.62	1.73
		Replicate			
		3	96.97	0.84	1.79
		ค่าเฉลี่ย	97.147	0.633	1.793
		SD	0.088	0.116	0.038
recipe	156	Replicate			
		1	96.58	0.37	2.67
		Replicate			
		2	96.32	0.48	2.69
		Replicate			
		3	96.24	0.83	2.39
		ค่าเฉลี่ย	96.380	0.560	2.583
		SD	0.103	0.139	0.097
100% <i>P.linteus</i>	1,104	Replicate			
		1	96.13	0.51	2.90
		Replicate			
		2	96.61	0.58	2.40
		Replicate			
		3	96.38	0.75	2.47
		ค่าเฉลี่ย	96.373	0.613	2.590
		SD	0.139	0.071	0.156

		Replicate				
cisplatin	2.04	1	85.06	9.27	5.17	
		Replicate				
		2	84.38	10.3	4.71	
			Replicate			
			3	84.78	10.28	4.48
			ค่าเฉลี่ย	84.740	9.950	4.787
			SD	0.197	0.340	0.203

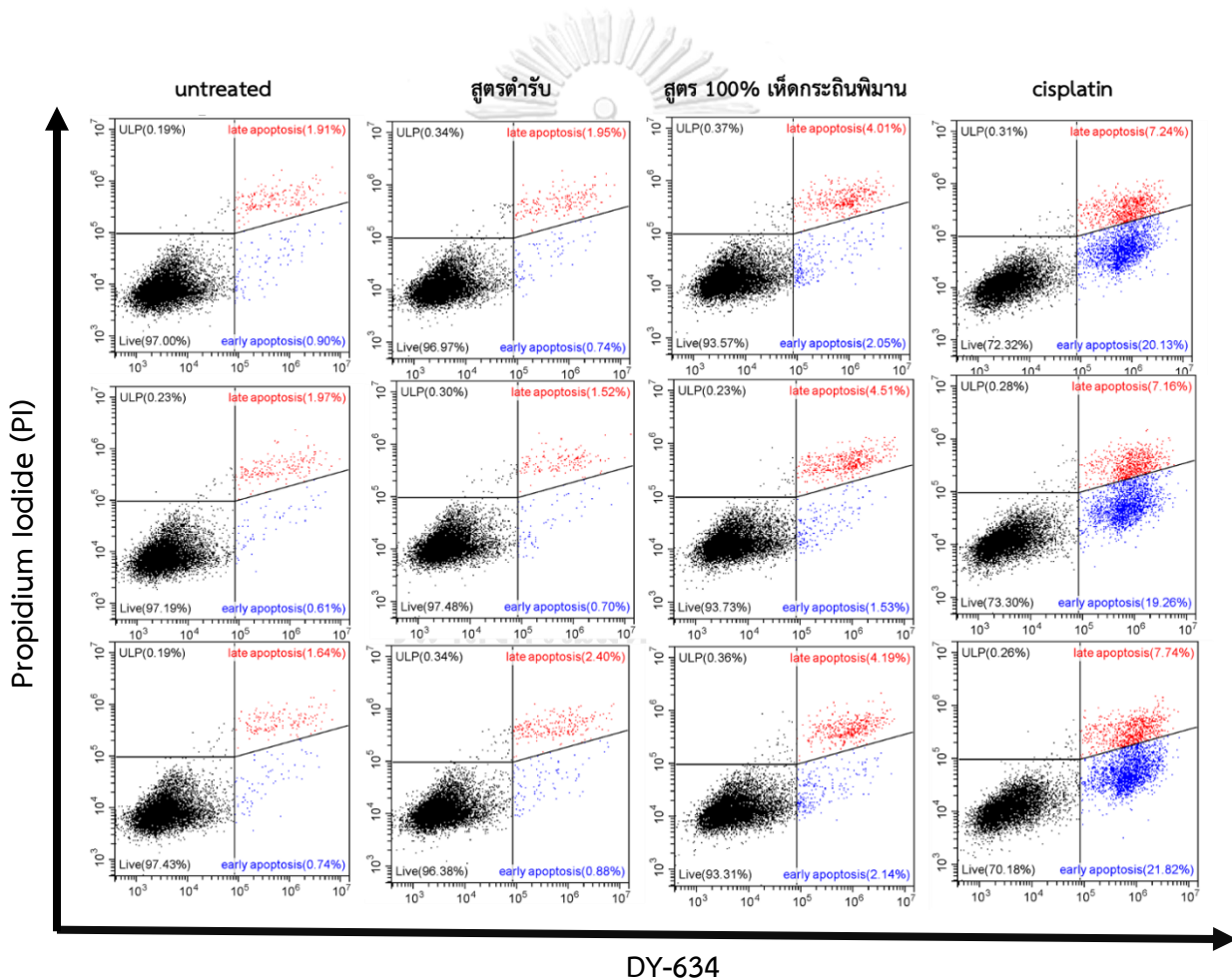


รูปที่ 38 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งรังไข่ใหญ่ชนิด HT-29 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับสารสกัด 100% เห็ดกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin V/PI standings

ตารางที่ 13 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นการถดถอยของเซลล์และจุดควบคุมรอบและจุดควบคุมบวกลบซิสพลาติส

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29					
ตัวอย่าง	IC ₅₀ (µg/ml)	Live cells	Early apoptosis	Late apoptosis	necrosis
untreated		Replicate			
		1	91.76	3.42	4.59
		Replicate			
		2	91.53	3.61	4.58
		Replicate			
		3	91.26	3.6	4.87
		ค่าเฉลี่ย	91.517	3.543	4.680
		SD	0.144	0.062	0.095
recipe	492	Replicate			
		1	89.41	5.11	5.13
		Replicate			
		2	89.78	5.22	4.7
		Replicate			
		3	90.93	4.79	4.01
		ค่าเฉลี่ย	90.040	5.040	4.613
		SD	0.458	0.129	0.326
100% <i>P.linteus</i>	2,772	Replicate			
		1	87.18	6.04	6.55
		Replicate			
		2	87.75	6.03	6
		Replicate			
		3	87.47	5.92	6.35
		ค่าเฉลี่ย	87.467	6.00	6.300
		SD	0.165	0.038	0.161

		Replicate		
		1	80.46	12
cisplatin	4.80	Replicate		
		2	81.03	11.76
		3	81.03	12.23
		ค่าเฉลี่ย	80.840	11.997
		SD	0.190	0.136



รูปที่ 39 ฮิสโตแกรมร้อยละของจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สารสกัด 100% เห็นกระถินพิมาน และชุดควบคุมบวก (ซิสพลาติน) แต่ละชุดทดลองจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ย้อมสีเซลล์ด้วย Annexin V/PI standings

ตารางที่ 14 ร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 หลังจากได้รับสารสกัดสูตรตำรับ สูตร 100% เห็นการถดถอยปริมาณ ชุดควบคุมลบและชุดควบคุมบวกซิสพลาติส

ค่าร้อยละจำนวนประชากรเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3					
ตัวอย่าง	IC ₅₀ (µg/ml)	Live cells	Early apoptosis	Late apoptosis	necrosis
untreated		Replicate			
		1	97	0.9	1.91
		Replicate			
		2	97.19	0.61	1.97
		Replicate			
		3	97.43	0.74	1.64
		ค่าเฉลี่ย	97.207	0.750	1.840
		SD	0.124	0.084	0.101
recipe	239	Replicate			
		1	97.48	0.7	1.52
		Replicate			
		2	96.97	0.74	1.95
		Replicate			
		3	96.38	0.88	2.4
		ค่าเฉลี่ย	96.943	0.773	1.957
		SD	0.318	0.055	0.254
100% <i>P.linteus</i>	1,494	Replicate			
		1	93.31	2.14	4.19
		Replicate			
		2	93.57	2.05	4.01
		Replicate			
		3	93.73	1.53	4.51
		ค่าเฉลี่ย	93.537	1.907	4.237
		SD	0.122	0.190	0.146

		Replicate			
		1	70.18	21.82	7.74
cisplatin	2.16	Replicate			
		2	73.3	19.26	7.16
		Replicate			
		3	72.32	20.13	7.24
		ค่าเฉลี่ย	71.933	20.403	7.380
		SD	0.921	0.752	0.181



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ประกายทิพย์ สมจิตต์
วัน เดือน ปี เกิด	13 พฤศจิกายน 2541
สถานที่เกิด	จังหวัดแพร่
วุฒิการศึกษา	วท.บ. พันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	150 หมู่ 2 ตำบลสบสาย อำเภอสูงเม่น จังหวัดแพร่ 54130
ผลงานตีพิมพ์	ประกายทิพย์ สมจิตต์ และ ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. 2566. ผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบต่อการมีชีวิตของเซลล์ วัฏจักรเซลล์ อะพอพโทซิส และการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 2 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปี พ.ศ. 2566: 913-924.
รางวัลที่ได้รับ	การนำเสนอระดับดีเด่น