

ผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน *Phellinus linteus* ต่อความเป็นพิษของเซลล์และการแสดงออก
ของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *Phellinus linteus* EXTRACTS ON CYTOTOXICITY AND GENE EXPRESSION IN
CERVICAL 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 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน <i>Phellinus linteus</i> ต่อ ความเป็นพิษของเซลล์และการแสดงออกของยีนใน เซลล์มะเร็งปากมดลูก
โดย	นายธนวิชญ์ แสงศิริพัฒน์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัสวดี อัครรัตน์)

ธนวิษญู แสงศิริพัฒน์ : ผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน *Phellinus linteus* ต่อความเป็นพิษของเซลล์และการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก. (EFFECTS OF *Phellinus linteus* EXTRACTS ON CYTOTOXICITY AND GENE EXPRESSION IN CERVICAL CANCER CELLS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต

มะเร็งปากมดลูกเป็นหนึ่งในมะเร็งที่มีจำนวนผู้ป่วยและอัตราการเสียชีวิตที่สูง ถึงแม้ว่าจะมีการฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัส human papilloma virus ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกแต่ประชากรบางกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ระดับน้อยถึงปานกลางนั้นไม่สามารถเข้าถึงได้ โดยปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาพบว่ามีสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการรักษาและป้องกันการเกิดมะเร็งได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดกระถินพิมาน ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสารสกัด 3 สูตรด้วยกันได้แก่ สารสกัดเห็ดกระถินพิมาน และสารสกัดสูตรตำรับอีก 2 สูตร (สูตรตำรับ A และ B) ที่มีองค์ประกอบของเห็ดกระถินพิมานและสมุนไพรอื่น ๆ ที่ต่างกัน จากการศึกษาพบว่าสารสกัดทั้ง 3 สูตรนั้นมีความสามารถในการลดอัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a SiHa และ HeLa ในระยะเวลา 2 วัน แต่ยังคงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนของมนุษย์ HEK293 ในระดับที่สูง ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าสารสกัดสูตรตำรับ B นั้นมีความสามารถในการลดการเจริญเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.005$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และส่งผลให้การแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทำนองเดียวกันสารสกัดเห็ดกระถินพิมานก็มีความสามารถในการลดการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.025$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และส่งผลให้การแสดงออกของยีนทั้งสองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6270046323 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: Phellinus linteus, Cell viability, Cell proliferation, CDK7 gene, MKI67 gene

Thanawitch Sangkheereput : EFFECTS OF *Phellinus linteus* EXTRACTS ON CYTOTOXICITY AND GENE EXPRESSION IN CERVICAL CANCER CELLS. Advisor: Assoc. Prof. PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D.

Cervical cancer is one of cancer which has high incidence and mortality rate. Although, there is vaccination to prevent human papilloma virus infection, which is a major cause of cervical cancer, in some countries, especially lower and middle-income countries, they can't access this vaccination. Nowadays, there are the new ways for healing and preventing tumorigenesis, especially the using of natural-product such as *Phellinus linteus*. The aim of this study is to study the antitumor ability of 3 extracts, *Phellinus linteus* extract, Mixture extracts (Mixture A and B) which contain *Phellinus linteus* and the other herbs as a component in cervical cancer cell lines. From the result, these 3 extracts can inhibit the cell viability level of C33a, SiHa and HeLa cell after 2 days of treatment, but there is high level of cytotoxicity in HEK293 cell. Moreover, Mixture B extract significantly decrease the level of cell proliferation of SiHa cell ($p = 0.005$), when compare with control group, resulting in significantly decreasing *CDK7* and *MKI67* gene expression. In the same way, the extract of *Phellinus linteus* significantly decrease the level of cell proliferation of C33a ($p = 0.025$), when compare with control group, and also leading to these two gene expression reductions significantly.

Field of Study: Genetics

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์ จิต ที่มีส่วนทำให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์นี้ขึ้น ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นตลอด การศึกษาในครั้งนี้ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง ครบถ้วนและสำเร็จลุล่วง ด้วยดี

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วิชาณี แบนศิริ ที่ให้การอนุญาตให้กระผมเข้าไปทำวิจัย ตลอดจนสละเวลาให้คำแนะนำ ชี้แนะกระผมตลอดการศึกษาในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนศิริ กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัสวดี อัศวรัตน์ กรรมการการสอบ วิทยานิพนธ์จากภายนอก ที่สละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการในการสอบ อีกทั้งยังให้คำแนะนำและ ชี้แนะในส่วนที่ต้องปรับปรุงแก้ไข ขอน้อมรับและนำไปแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่ให้การอนุญาตให้เข้าไปทำวิจัยที่ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะ แพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย

ขอขอบพระคุณบริษัท เฮอร์บ ฟอรั ยู จำกัด (Herb for you co., ltd) ที่ให้การสนับสนุนและ อนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ชี้แนะ ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือ ตลอดงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพ่อแม่และครอบครัวสำหรับการสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ธนวิชญ์ แสงศิริพัฒน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ญ	ญ
สารบัญรูปภาพ.....ฐ	ฐ
บทที่ 1.....1	1
บทนำ.....1	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....3	3
บทที่ 2.....4	4
ทบทวนเอกสาร.....4	4
2.1 มะเร็งปากมดลูก.....4	4
2.1.1 อุบัติการณ์มะเร็งปากมดลูก.....4	4
2.1.2 สาเหตุการเกิดมะเร็งปากมดลูก.....5	5
2.1.3 การวินิจฉัย การป้องกัน และการรักษามะเร็งปากมดลูก.....6	6
2.1.4 การรักษามะเร็งปากมดลูก.....7	7
2.2 เห็ดกระถินพิมาน.....8	8
2.2.1 ข้อมูลทั่วไปของเห็ดกระถินพิมาน.....8	8

2.2.2 คุณสมบัติในการรักษาโรคของเห็ดกระถินพิมาน.....	9
2.3 MTT assay.....	11
2.4 BrdU assay.....	12
2.5 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR).....	13
2.6 ยีน <i>CDK7</i>	14
2.7 ยีน <i>MKI67</i>	16
2.8 ยีน <i>IL1RN</i>	17
บทที่ 3.....	18
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ.....	18
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	18
3.2 สารเคมี.....	19
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	20
3.4 การเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
3.5 วิธีการทดลอง.....	22
3.5.1 การสกัดสารจากตัวอย่าง.....	22
3.5.2 การหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	22
3.5.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล.....	23
3.5.4 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability study).....	23
3.5.5 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation study).....	24
3.5.6 การศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression study).....	26
3.5.6.1 การเตรียมเซลล์และเก็บตัวอย่างเซลล์.....	26
3.5.6.2 การสกัด RNA เซลล์และการสังเคราะห์ cDNA.....	26
3.5.6.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน <i>CDK7</i> <i>MKI67</i> และ <i>IL1RN</i> สำหรับการทำ real-time PCR.....	27

3.5.6.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> <i>MKI67</i> และ <i>IL1RN</i> ด้วย real-time PCR	28
บทที่ 4	30
ผลการทดลอง.....	30
4.1 ผลการสกัดสารจากตัวอย่างทั้ง 3 สูตรและความเข้มข้นของสารสกัด.....	30
4.2 ผลการวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลในสารสกัด.....	30
4.3 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability Study).....	32
4.3.1 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.....	32
4.3.2 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B	34
4.3.3 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมาน	35
4.3.4 ผลการประเมินระดับความสามารถในการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัด...37	
4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation Study).....	40
4.3.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293	41
4.3.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a.....	42
4.3.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa	43
4.3.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa.....	45
4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> <i>MKI67</i> และ <i>IL1RN</i> (gene expression study).46	
4.4.1 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์ HEK293.....	47
4.4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์ C33a.....	48
4.4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์ SiHa	49
4.4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> และ <i>MKI67</i> ในเซลล์ HeLa	50
4.4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>IL1RN</i>	51
บทที่ 5	55
อภิปรายผลการทดลอง.....	55

5.1 ความเข้มข้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% หาระงันพิมาน.....	55
5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์.....	55
5.3 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์.....	56
5.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CDK7</i> <i>MKI67</i> และ <i>IL1RN</i>	60
บทที่ 6.....	63
สรุปผลการทดลอง.....	63
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก.....	72
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	72
ประวัติผู้เขียน.....	83



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของตัวอย่างแต่ละสูตรในงานวิจัย.....	21
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์สำหรับยีน CDK7 MKI67 IL1RN และ GAPDH	27
ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความเข้มข้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลในสารสกัด สูตรตำรับ A สารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน (n=3)	32
ตารางที่ 4 แสดงค่า IC ₅₀ สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	38
ตารางที่ 5 แสดงค่า IC ₅₀ สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับ B ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	39
ตารางที่ 6 แสดงค่า IC ₅₀ สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถิน พิมาน ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	40
ตารางที่ 7. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เห็ด กระถินพิมานเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม	72
ตารางที่ 8. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เห็ด กระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม	72
ตารางที่ 9. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความ เข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม	73
ตารางที่ 10. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานที่ความ เข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม	74

ตารางที่ 20. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ SiHa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม80

ตารางที่ 21. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน CDK7 ในเซลล์ HeLa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม81

ตารางที่ 22. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ HeLa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม81



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่พบในจำนวนประชากร 10,000 คน ในแต่ละกลุ่มประเทศโดยแบ่งจากลักษณะทางเศรษฐกิจ.....	4
รูปที่ 2 การแบ่งระยะของมะเร็งปากมดลูกโดย International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).....	8
รูปที่ 3 ลักษณะด้านหน้า ด้านหลังและขนาดของเม็ดกระถินพิมาน	9
รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงจาก MTT ไปเป็นผลึก formazan โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial reductase	11
รูปที่ 5 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของ Thymidine และ 5-bromo-2'-deoxyuridine ...	12
รูปที่ 6 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเรืองแสงและจำนวนรอบในการทำ PCR ในการทำ qPCR.....	13
รูปที่ 7 การเกิด T-loop phosphorylation โดยโปรตีน CDK7.....	15
รูปที่ 8 การเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน CDK7 ในกระบวนการ transcription.....	16
รูปที่ 9 หน้าที่การทำงานของยีน IL1RN ที่จะสร้างโปรตีน IL-1RA เพื่อแย่งจับกับ receptor ของโปรตีน IL-1 และทำให้ไม่เกิด immune respond.....	17
รูปที่ 10 ตัวอย่างสูตรตำรับ A B และ 100% เม็ดกระถินพิมาน.....	21
รูปที่ 11 การแบ่งชุดการทดลองในแต่ละชนิดเซลล์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน.....	29
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานและสมการใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัด (n=3)	31
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานและสมการใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัด (n=3).....	31
รูปที่ 14 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	33
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	33

รูปที่ 16 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ	35
รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ	35
รูปที่ 18 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เพื่อประเมินปริมาณที่ความเข้มข้นต่างๆ	36
รูปที่ 19 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เพื่อประเมินปริมาณที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
รูปที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดทอนระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	38
รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดทอนระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	39
รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดทอนระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% เพื่อประเมินปริมาณ ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa	40
รูปที่ 23 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HEK293 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เพื่อประเมินปริมาณเป็นเวลา 1 และ 2 วัน	42
รูปที่ 24 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เพื่อประเมินปริมาณเป็นเวลา 1 และ 2 วัน	43
รูปที่ 25 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ SiHa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เพื่อประเมินปริมาณเป็นเวลา 1 และ 2 วัน	44

รูปที่ 26 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa ที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (blank) เซลล์ HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน.....	45
รูปที่ 27 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa ที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (blank) เซลล์ HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B สูตร 100% เห็นกระถินพิมาน และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน.....	46
รูปที่ 28 เพลทขนาด 96-well ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa ด้วยวิธี BrdU assay .	46
รูปที่ 29 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน CDK7 และ MKI67 ของเซลล์ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน	47
รูปที่ 30 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน CDK7 และ MKI67 ของเซลล์ C33a เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน	48
รูปที่ 31 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน CDK7 และ MKI67 ของเซลล์ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน	49
รูปที่ 32 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน CDK7 และ MKI67 ของเซลล์ HeLa เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน.....	50
รูปที่ 33 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ HEK293 เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.....	51
รูปที่ 34 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ HEK293 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน.....	51
รูปที่ 35 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ C33a เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A	52
รูปที่ 36 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ C33a เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน	52

รูปที่ 37 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ SiHa เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A53

รูปที่ 38 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ SiHa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน53

รูปที่ 39 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ HeLa เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A54

รูปที่ 40 กราฟ melting curve ของยีน IL1RN ในเซลล์ HeLa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน54

รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ ค่าร้อยละของแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่าง59

รูปที่ 42 แผ่นเจล 1% agarose gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis จาก Real-time PCR product ของยีน IL1RN จากตัวอย่างเซลล์ HEK293.....62

รูปที่ 43 แผ่นเจล 8% acrylamide gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis จาก Real-time PCR product ของยีน IL1RN จากตัวอย่างเซลล์ HEK29362

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งชนิดที่พบได้ในเพศหญิง และจากการสำรวจในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงเป็นอันดับที่ 4 ในกลุ่มของมะเร็งที่พบในเพศหญิง (Bray et al., 2018) เพราะฉะนั้นการให้ความสำคัญกับการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการวินิจฉัย และการรักษาจึงได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (Peralta-Zaragoza et al., 2012) ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับการนำสมุนไพรจากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งเป็นหนึ่งในวิธีการที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก (Yuan et al., 2017) นอกจากนี้แล้วจากการสำรวจพบว่าประมาณครึ่งหนึ่งของยาที่ถูกใช้ในการรักษาโรคในปัจจุบันนั้นล้วนมีต้นกำเนิดมาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติทั้งสิ้น ด้วยเหตุนี้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงเป็นส่วนสำคัญอย่างมากในการศึกษาและพัฒนาใช้ในการรักษาโรค (Pillai et al., 2017) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งปากมดลูกจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของสมุนไพรจากธรรมชาติ และการสังเคราะห์ยาจากสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันการเกิดมะเร็งนั้นกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาคูณสมบัติของสารเคมีที่พบในสมุนไพร ซึ่งหนึ่งในสมุนไพรเหล่านั้นคือ เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus linteus*) จากการศึกษาพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Gao et al., 2017) โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นเกิดขึ้นโดยผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น การหยุดหรือชะลอกระบวนการแบ่งเซลล์ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดดังกล่าวมีฤทธิ์ทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งดับถูกหยุดอยู่ในระยะ S-phase ของกระบวนการแบ่งเซลล์ (Li et al., 2013) ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาฤทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานในเซลล์มะเร็งลำไส้พบว่า เซลล์มะเร็งลำไส้ นั้นถูกหยุดหรือชะลอกระบวนการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ S-phase เช่นเดียวกัน (Zhong et al., 2013) นอกจากนี้แล้วพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Wu et al., 2013) จากการศึกษาพบว่าการที่เซลล์ปกติพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้นั้น ในสภาวะปกติระบบภูมิคุ้มกันจะไม่สามารถตรวจจับและจัดการกับความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ (Blattman and Greenberg, 2004) เพราะฉะนั้นการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจในการใช้จัดการกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งการที่ระบบภูมิคุ้มกันถูก

กระตุ้นนั้นจะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งสามารถถูกตรวจจับ และจัดการได้ (Landskron et al., 2014) ยิ่งไปกว่านั้นแล้วในเห็นตระถินพิมานยังมีสารเคมีในกลุ่มของสารประกอบพินอลยกตัวอย่าง เช่น Hispolon ที่มีความสามารถในการยับยั้งการกระจายตัว (metastasis) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hsin et al., 2017)

การศึกษานี้ให้ความสนใจกับการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสารสกัดทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 สูตรตำรับ A ที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ เห็นตระถินพิมานที่ปริมาณ 30% ที่เป็นองค์ประกอบหลัก เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ และผลพลึงกาสา สูตรที่ 2 สูตรตำรับ B มีองค์ประกอบบางส่วนเหมือนกับสูตรตำรับ A ได้แก่ เห็นตระถินพิมานที่ปริมาณ 30% เหง้าข้าวเย็นเหนือ เหง้าข้าวเย็นใต้ แต่ไม่มีผลพลึงกาสา แต่จะมีการเพิ่มสมุนไพรบางชนิดเข้ามาแทน และสูตรที่ 3 สารสกัดของเห็นตระถินพิมานเพียงอย่างเดียว โดยสารสกัดทั้ง 3 สูตรนี้จะนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ทั้งนี้ในการศึกษานี้ได้มีการนำยา Cisplatin ที่เป็นยาสำหรับการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีการเคมีบำบัดมาใช้เป็นชุดการทดลองเปรียบเทียบ ทั้งนี้การศึกษานี้จะทำการทดสอบความเป็นพิษของสกัดต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดทั้ง 3 สูตรในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยจะเริ่มจากการนำตัวอย่างทั้ง 3 สูตรมาสกัดโดยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและสกัดที่อุณหภูมิสูงอย่างต่อเนื่อง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ และ ปริมาณสารประกอบพินอลก่อนจะนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งเซลล์มะเร็งปากมดลูกในการศึกษานี้จะประกอบไปด้วยเซลล์ 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ SiHa cell (เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV16), HeLa cell (เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV18) และ C33a cell (เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV) และเซลล์ปกติ ได้แก่ HEK293 ที่เป็นเซลล์ไตปกติของคน หลังจากนั้นทำการประเมินระดับการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ต่อมานำค่าการมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละช่วงความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 50% (50% Inhibitory concentration : IC_{50}) เพื่อใช้ประเมินระดับความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ ในส่วนของการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) จะนำเซลล์ทั้งหมดมาทำการทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละสูตรที่ค่าความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า IC_{50} ที่ได้จากการศึกษาในส่วนแรก และทำการประเมินระดับการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay และส่วนสุดท้ายคือการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* *MKI67* และยีน *IL1RN* เนื่องจากคุณสมบัติของสารสกัดจากเห็นตระถินพิมานที่มีความสามารถหยุดหรือชะลอกระบวนการแบ่งเซลล์ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งถูกหยุดอยู่ในระยะต่างๆ ของวัฏ

จักรเซลล์และมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จึงได้เลือกศึกษาการ แสดงออกของยีนในทั้ง 3 นี้ในเซลล์ที่ผ่านการทดสอบกับสารสกัด เพื่อคาดการณ์กลไกในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของสารสกัดทั้ง 3 สูตรในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งการศึกษาในส่วนนี้จะใช้วิธี Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) และใช้ การ วิเคราะห์ทางสถิติในการเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่าง

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิดด้วยสูตรสารสกัดที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถคาดการณ์กลไกที่สารสกัดใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากผล การศึกษาในที่นี้จึงสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดปรับปรุงสารสกัดให้มีความเหมาะสมกับการรักษา มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งชนิดอื่นต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและคาดการณ์กลไกที่มีความ เกี่ยวข้องของสารสกัดสูตรต่างๆ ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงระดับความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดแต่ละสูตร ทั้งระดับ การมีชีวิตของเซลล์ และระดับการเจริญเติบโตของเซลล์ของสารสกัดทั้ง 3 สูตร
2. ทราบถึงกลไกที่สารสกัดทั้ง 3 สูตรใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปาก มดลูก

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละสูตรที่ส่งผลในระดับการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดมี ค่าเท่ากับ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ผ่านการทดสอบกับสารสกัด
2. ทหาระดับการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ละชนิดหลังจากการทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละ สูตร
3. ทหาระดับการแสดงออกของยีน *CDK7* ยีน *MKI67* และ ยีน *IL1RN* ในเซลล์แต่ละชนิดที่ ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 3 สูตร

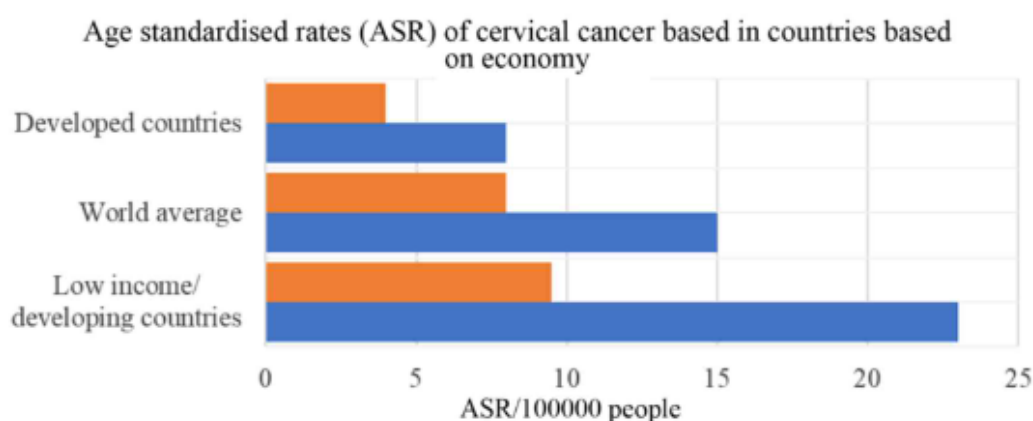
บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 มะเร็งปากมดลูก

2.1.1 อุบัติการณ์มะเร็งปากมดลูก

จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2562 พบว่าในแต่ละปีนั้นพบว่ามีผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูกมากกว่า 500,000 รายและมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 300,000 รายด้วยกัน โดยสาเหตุหลักนั้นเกิดจากการติดเชื้อ human papilloma virus (HPV) (Cohen et al., 2019) ร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดมาจากกลุ่มประเทศที่มีรายได้ระดับปานกลางและรายได้น้อยซึ่งเป็นผลมาจากการขาดการจัดการเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัย และการจัดการฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ซึ่งต่างจากกลุ่มประเทศที่มีรายได้มากที่อัตราการป่วยและการเสียชีวิตจากมะเร็งชนิดดังกล่าวได้มีการลดลงอย่างมากนับตั้งแต่มีการตรวจและจัดการวัคซีนขึ้น (Hull et al., 2020)



รูปที่ 1 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่พบในจำนวนประชากร 10,000 คน ในแต่ละกลุ่มประเทศโดยแบ่งจากลักษณะทางเศรษฐกิจ

ซึ่งในปีพ.ศ. 2563 ประเทศไทยนั้นยังคงมีแนวโน้มการเกิดมะเร็งที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อคิดเป็นรายวันแล้วจะสามารถตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกได้วันละ 27 ราย และมีผู้เสียชีวิตสูงถึง 14 รายด้วยกัน (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2564) โดยปกติแล้วมะเร็งปากมดลูกนั้นสามารถที่จะทำการรักษาให้ได้หากตรวจพบในระยะแรก แต่ปัญหาคือส่วนมากแล้วผู้ป่วยราว 50% มักจะมาพบแพทย์ในระยะที่มะเร็งนั้นลุกลามซึ่งรักษายากและนำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด (ภวนรินทร์ สีกุด, มะลิวัลย์ บางนันทน์ และชวลินี มานะยิ่ง, 2564)

2.1.2 สาเหตุการเกิดมะเร็งปากมดลูก

สาเหตุหลักที่พบมากที่สุดของการเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นเกิดจากการติดเชื้อไวรัส HPV ซึ่งสามารถติดต่อได้ทางเพศสัมพันธ์ (Golfetto et al., 2018) ร้อยละ 90-100 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกนั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มอายุน้อยกว่า 35 ปี ล้วนเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัส HPV (Bruni et al., 2010) โดยประเภทของไวรัส HPV นั้นจะจำแนกออกเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อไวรัส HPV และระยะของมะเร็งปากมดลูก (Kocjan et al., 2015) อ้างอิงจากหน่วยงาน The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้มีการจัดกลุ่มให้เชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 16 18 31 33 35 45 51 52 56 58 59 และ 66 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง และชนิด 6 11 40 42 43 44 53 54 61 72 และ 81 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ (Steben and Duarte-Franco, 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 16 และ 18 พบว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกนั้นเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดดังกล่าว อีกทั้งยังพบว่าเชื้อไวรัส HPV ทั้ง 2 ชนิดนั้นยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกชนิดที่สามารถแพร่กระจายได้มากกว่าเชื้อไวรัส HPV ชนิดอื่น จึงสามารถบอกได้ว่าเชื้อไวรัส HPV ทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการก่อมะเร็งได้มากกว่าชนิดอื่น (Ahmed et al., 2017)

นอกจากนี้แล้วยังมีปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกอีกไม่ว่าจะเป็นตัวของไวรัส HPV ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือแม้กระทั่งปริมาณของเชื้อไวรัส HPV ที่ผู้ป่วยได้รับก็มีผลกับการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้เช่นกัน (Bowden et al., 2019) ในส่วนของพฤติกรรมของผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมก็มีผลต่อการสัมผัสหรือได้รับเชื้อไวรัส HPV หรือแม้กระทั่งส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันและอาจนำไปสู่การติดเชื้อไวรัสได้นั่นเอง ยกตัวอย่างเช่นการสูบบุหรี่ (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer et al., 2006) ฮอรัโมนคุมกำเนิด ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคม และพฤติกรรมทางเพศ (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2006) อย่างไรก็ตามก็ยังมีผู้หญิงจำนวนมากที่มีการติดเชื้อไวรัส HPV แต่ก็ไม่ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูกและจากการศึกษาพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมอาจมีผลต่อความสามารถในการติดเชื้อไวรัส HPV ตลอดจนการเกิดมะเร็งปากมดลูก (Magnusson, Lichtenstein and Gyllenstein, 2000) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่ามีการศึกษาพบตำแหน่งของ single-nucleotide polymorphisms (SNPs) ในยีน *PAX8* *CLPTM1L* และ *HLA* นั้นมีความสัมพันธ์ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ได้จากการศึกษาด้วย Genome-wide association studies (GWASs) ที่

เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเร็งปากมดลูก ผู้ป่วยที่มีภาวะปากมดลูกเจริญผิดปกติระยะที่ 3 (Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 3) กับกลุ่มคนปกติ (Bowden et al., 2021)

2.1.3 การวินิจฉัย การป้องกัน และการรักษามะเร็งปากมดลูก

การตรวจวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกมีด้วยกันหลายขั้นตอนประกอบไปด้วย การสอบถามประวัติผู้ป่วยและผลการตรวจร่างกายตามด้วย pelvic examination, cervical cytology (pap smear: papanicolaou test), HPV test, endocervical curettage, colposcopy และ biopsy ตามลำดับ ในที่นี้จะขออธิบายเพิ่มเติมสำหรับ 2 ขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างมากในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูก ได้แก่การตรวจ pap smear ที่เป็นการตรวจสอบการพัฒนาการเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งหรือระยะก่อนของมะเร็งปากมดลูก และการตรวจ HPV test เป็นการตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV โดยจะทำการตรวจหาการติดเชื้อของไวรัส HPV ชนิดที่สามารถนำไปสู่การเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ ส่วนมากแล้วการติดเชื้อไวรัส HPV นั้นสามารถหายหรือรักษาเองได้จึงทำให้ไม่เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ในบางกรณีที่มีการติดเชื้อเรื้อรังหรือรุนแรงจากเชื้อไวรัส HPV บางชนิดอาจนำไปสู่การเกิดความผิดปกติขึ้นกับเซลล์ปากมดลูก และหากเซลล์ดังกล่าวนี้ไม่ได้รับการรักษาแล้วในเวลาหลายปีต่อมาอาจจะมีการพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ในที่สุด (Tsikouras et al., 2016) การตรวจการติดเชื้อไวรัส HPV นั้นสามารถตรวจได้ทั้งการตรวจ DNA และ RNA ยกตัวอย่างเทคนิคที่ใช้กับการตรวจ DNA เช่น Southern transfer hybridization (STH) Dot blot hybridization (DB) และ polymerase chain reaction (PCR) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีตรวจโดยใช้ PCR นั้นจะมีความจำเพาะ (specificity) และ ความไว (sensitivity) ที่สูงมาก นอกจากนี้แล้วยังมีวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) ที่สามารถใช้ในการตรวจ mRNA ของยีน E6 และ E7 หรือ ยีนอื่นที่มีความเกี่ยวข้องของการเกิดมะเร็งปากมดลูกของเชื้อไวรัส HPV (Lie and Kristensen, 2008) ข้อแนะนำในการตรวจและวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกนั้นหลักๆ จะถูกแบ่งเป็น 2 ช่วงอายุด้วยกันได้แก่ กลุ่มแรกเพศหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 21-29 ปี ควรตรวจด้วยวิธีการ pap smear ทุกๆ 3 ปี และควรมีการตรวจด้วยวิธี HPV test หากพบความผิดปกติขึ้น กลุ่มที่สองเพศหญิงที่มีอายุระหว่าง 30-65 ปี ควรตรวจทั้ง 2 วิธีทุกๆ 5 ปี หรือใช้เกณฑ์การตรวจแบบกลุ่มแรกทุกๆ 3 ปีก็ได้เช่นเดียวกัน (Saslow et al., 2012)

วิธีการป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกทำได้โดยการหมั่นตรวจวินิจฉัยและฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการแนะนำให้มีการฉีดวัคซีนในเพศหญิงที่มีอายุ

ตั้งแต่ 9-26 ปี และเพศชายตั้งแต่ 9-21 ปี และสามารถฉีดได้จนถึงอายุ 26 ปี ตัวอย่างวัคซีนของจีนที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ Gardasil ที่มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 6 11 16 และ 18 Gardasil 9 ป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 6 11 16 18 31 33 45 52 และ 58 ซึ่งต้องฉีดด้วยกัน 3 เข็ม (0 2 และ 6 เดือน) และในเด็กผู้หญิงที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปี ฉีดเพียง 2 เข็ม (0 และ 6 เดือน) Cervarix ป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 16 และ 18 ซึ่งต้องฉีดด้วยกันทั้งสิ้น 3 เข็ม (0 1 และ 6 เดือน) โดยวัคซีนเหล่านี้จะประกอบด้วย L1 capsid protein ที่จะรวมตัวกันเป็นอนุภาคที่คล้ายคลึงกับไวรัส (Virus like particles: VLPs) ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของแอนติบอดีส่งผลให้ไวรัส HPV ไม่สามารถที่จะทำให้เซลล์เยื่อบุปากมดลูกเกิดการติดเชื้อได้ (Mckee, Bergot and Leggatt., 2015)

2.1.4 การรักษามะเร็งปากมดลูก

การรักษามะเร็งปากมดลูกสามารถทำได้โดยการผ่าตัด การฉายรังสี การทำเคมีบำบัด หรืออาจจะใช้วิธีทั้ง 3 นี้ร่วมกัน ซึ่งการพิจารณาเลือกวิธีการรักษานั้นจะพิจารณาจากระยะของมะเร็งแบ่ง 5 ระยะโดย International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (Freeman et al., 2012) ได้แก่ ระยะที่ 0 เริ่มมีเซลล์มะเร็งที่บริเวณผิวของปากมดลูก ระยะที่ 1 เซลล์มะเร็งเริ่มขยายตัวลงไปปากมดลูกแต่ยังไม่กระจายตัวไปยังส่วนอื่น ระยะที่ 2 เริ่มขยายตัวไปที่มดลูกแต่ยังไม่ถึงผนังของเชิงกรานหรือต่ำกว่า 1 ใน 3 ของช่องคลอด ระยะที่ 3 มีการขยายตัวไปถึงผนังเชิงกราน มีอาการไตบวมและไตไม่สามารถทำงานได้ และระยะที่ 4 มีการขยายตัวของเซลล์มะเร็งไปที่กระดูกเชิงกราน หรือที่บริเวณกระเพาะปัสสาวะ หรือบริเวณเยื่อของลำไส้ใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 2 การแพร่กระจายตัวของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph node involvement) โรคประจำตัวของผู้ป่วย และผลข้างเคียงที่จะได้รับ โดยในระยะเริ่มต้นหากมะเร็งมีการแพร่กระจายไม่มากนักสามารถรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดเพียงอย่างเดียวในกรณีที่ผ่าตัดแล้วมะเร็งมีขนาดลดลงและไม่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง และหากมะเร็งมีระดับ หรือระยะที่สูงสามารถพิจารณารับการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดและฉายรังสี เพราะฉะนั้นแล้วระยะของมะเร็งและการแพร่กระจายตัวของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการพิจารณาเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสม นอกจากนี้ควรพิจารณาในเรื่องของการตั้งครรร่วมด้วยเพื่อที่จะได้รับการรักษาที่เหมาะสม หลังจากได้รับการรักษาแล้วควรมีการพบแพทย์เป็นระยะ เพื่อรับการตรวจภายใน (pelvic examination) ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับอวัยวะเชิงกรานเพื่อป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำอีก (Wipperman, Neil and Williams, 2018)

Stage	Description
0	Tumor confined to the surface layer (the cell lining) of the cervix; also called carcinoma in situ
I	Extension deeper into the cervix with no spread beyond (extension to the corpus is disregarded)
IA	Invasive carcinoma; may only be diagnosed at microscopy
IA1	Stromal invasion ≤ 3.0 mm deep and extension ≤ 7.0 mm
IA2	Stromal invasion >3.0 mm and ≤ 5.0 mm with extension ≤ 7.0 mm
IB	Clinically visible lesions limited to the cervix uteri or preclinical cancers higher than stage IA
IB1	Clinically visible lesion ≤ 4.0 cm in greatest dimension
IB2	Clinically visible lesion >4.0 cm in greatest dimension
II	Cervical carcinoma extends beyond the uterus but not to the pelvic wall or the lower one-third of the vagina
IIA	No parametrial invasion
IIA1	Clinically visible lesion ≤ 4.0 cm in greatest dimension
IIA2	Clinically visible lesion >4.0 cm in greatest dimension
IIB	With obvious parametrial invasion
III	Extension to the pelvic wall, involvement of lower one-third of the vagina, or hydronephrosis or nonfunctioning kidney
IIIA	Involvement of lower one-third of the vagina with no extension to the pelvic wall
IIIB	Extension to the pelvic wall, hydronephrosis, or nonfunctioning kidney
IV	Extension beyond the true pelvis or involvement of the bladder or rectal mucosa (biopsy proved); bullous edema does not convey stage IV disease
IVA	Spread to adjacent organs
IVB	Spread to distant organs

รูปที่ 2 การแบ่งระยะของมะเร็งปากมดลูกโดย International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)

2.2 เห็ดกระถินพิมาน

2.2.1 ข้อมูลทั่วไปของเห็ดกระถินพิมาน

เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus* sp.) เป็นสportunไพรที่มีคุณสมบัติในการใช้รักษาโรคมะเร็งยาวนานมากกว่า 2,000 ปี สามารถพบได้ในแถบทวีปอเมริกาในเขตร้อน แอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี เห็ดดังกล่าวมีชื่อเรียกด้วยกันหลากหลายชื่อ เช่น Sanghuang ในประเทศจีน Sangwhang ในเกาหลี และ Meshimakobu ในญี่ปุ่น (Zhu, Kim and Chen, 2008) เห็ดกระถินพิมานนั้นเป็นเห็ดที่จัดอยู่ในจำพวก basidiocarps ที่เจริญเติบโตบนไม้ยืนต้น หรือบนขอนไม้ที่ผุพัง มีอายุยืน ไม้มีก้าน และมีลักษณะคล้ายรูปเกือกม้าสีน้ำตาล (Chen et al., 2019) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะด้านหน้า ด้านหลังและขนาดของเห็ดกระถินพิมาน

2.2.2 คุณสมบัติในการรักษาโรคของเห็ดกระถินพิมาน

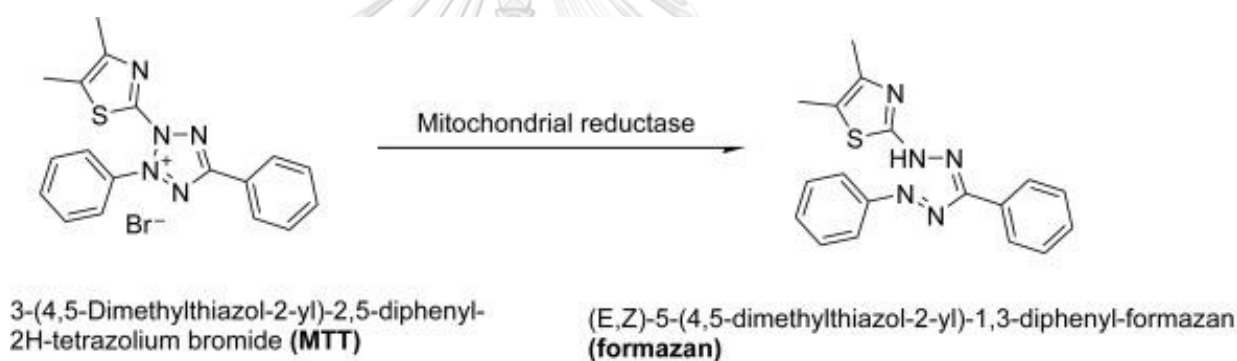
อ้างอิงจากตำราแพทย์แผนจีนโบราณได้มีความเชื่อว่าเห็ดกระถินพิมานนั้นสามารถใช้รักษาอาการป่วยได้หลากหลาย เช่น การปรับสมดุลร่างกาย รักษาอาการปวดท้อง และท้องเสียเป็นต้น (Dai and Xu, 1998) ในปัจจุบันเห็ดชนิดนี้ได้รับความนิยมอย่างมากในทางการแพทย์ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคไม่ว่าจะเป็น พอลิแซ็กคาไรด์ ไตรเทอร์ปีนอยด์ สารประกอบฟีนอล และไฟแรน ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีความสามารถทั้งการป้องกันการอักเสบ เช่น มีการศึกษาพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานมีความสามารถลดการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ pro-inflammatory cytokines อย่างยีน *TNF- α* *IL-1 β* *IL-2* *IL-6* และ *IL-12* และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ anti-inflammatory cytokines อย่าง *IL-4* และ *IL-10* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophages อย่าง RAW264.7 (Xie et al., 2019) การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน T-cell (Lin et al., 2016) การต่อต้านอนุมูลอิสระ (Kong et al., 2018) ความสามารถในการต้านไวรัส เช่นมีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเส้นใย (mycelia) ของเห็ดกระถินพิมานเมื่อใช้ร่วมกับวัคซีนแล้วมีความสามารถในการป้องกันเชื้อไวรัส H5N1 (Ichinohe et al., 2010) ความสามารถในการต้านมะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานนั้นเมื่อนำมาใช้

ในการรักษาร่วมกับ Camptothecin 11 (CPT11) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้อย่าง HCT116 และ HT-29 ยิ่งไปกว่านั้นการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกระถินพิมานมาใช้ร่วมกับยา CPT11 ยังสามารถลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยา CPT11 ในการรักษามะเร็งลำไส้เพียงอย่างเดียว (Yu et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคเบาหวาน (Liu et al., 2019) การป้องกันโรคตับ (Huang et al., 2018) และ การป้องกันระบบประสาทอีกด้วย (Choi et al., 2016)

ในบรรดาองค์ประกอบที่พบในเห็ดกระถินพิมานพอลิแซ็กคาไรด์ถือเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีเบต้ากลูแคนโพลีเมอร์ อีกทั้งยังเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาและพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งจากสมุนไพรธรรมชาติ (Lemieszek and Rzeski, 2012) ซึ่งกลไกหลักๆ ที่พอลิแซ็กคาไรด์ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นประกอบไปด้วย การควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยตรง (Zhang et al., 2007) ซึ่งมีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดด้วยกันทั้งในรูปแบบของ *in vitro* และ *in vivo* ยกตัวอย่างเช่น มีการศึกษาพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเส้นใยของเห็ดกระถินพิมานที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอย่าง 180 sarcoma (S180) โดยชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการ apoptosis ขึ้น (Mei et al., 2015) นอกจากพอลิแซ็กคาไรด์แล้วยังมีสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลอีกตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งนั่นคือ Hispolon ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากบริเวณดอกเห็ด (fruit body) ในปี พ.ศ. 2556 มีการศึกษาพบว่า Hispolon มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาว NB4 โดยส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน p53 p21 และ p27 มีการแสดงออกมากขึ้น และลดการแสดงออกของโปรตีน cyclin D1 cyclin E CDK2 และ CDK4 ส่งผลให้เซลล์ถูกหยุดการกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G_0/G_1 ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า Hispolon นั้นยังกระตุ้นให้เซลล์ NB4 เกิดการ apoptosis ขึ้นโดยผ่านทั้ง 2 กลไกทั้ง extrinsic pathway ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ intrinsic pathway ที่มีอัตราส่วนการแสดงออกระหว่าง Bax และ Bcl-2 (Bax/Bcl-2) เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (Chen et al., 2013)

2.3 MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay เป็นวิธีการศึกษามีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ที่มีการพัฒนาวิธีการศึกษาใน 96-well plate โดย MTT assay นั้นมีความเหมาะสมอย่างมากที่จะใช้ในการศึกษาในรูปแบบ high throughput screening (HTS) (Mosmann, 1983) สารละลาย MTT นั้นมีวิธีการใช้งานโดยการผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ระหว่าง 0.2-0.5 mg/ml และใช้เวลาในการบ่มระหว่าง 1-4 ชั่วโมง หลักการทำงานของ MTT คือ MTT จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลึกของ formazan สีม่วงที่ไม่ละลายน้ำโดยอาศัย เอนไซม์ dehydrogenases ที่สร้างขึ้นในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต (Lu et al., 2012) ดังแสดงในรูปที่ 4 เพราะฉะนั้นแล้วปริมาณของผลึก formazan จะเป็นตัวบ่งบอกได้ถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เนื่องจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตนั้นจะไม่สามารถทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงจาก MTT ไปเป็นผลึก formazan โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial reductase

จากที่กล่าวมาข้างต้นผลึกของ formazan นั้นไม่สามารถละลายน้ำได้ เพราะฉะนั้นแล้วจึงต้องทำการละลายด้วยตัวทำละลายอื่นก่อนที่จะอ่านค่าการดูดกลืนแสง และนำไปคำนวณระดับการมีชีวิตของเซลล์ การเลือกตัวทำละลาย formazan นั้นควรพิจารณาจาก ความคงที่ของสารละลายเมื่อละลาย formazan แล้ว ควรหลีกเลี่ยงตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่าย และสามารถลดการรบกวนจากองค์ประกอบที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เช่น phenol red ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้กันได้แก่ isopropanol, DMSO และ dimethylformamide เป็นต้น (Denizot and Lang, 1986) ตัวทำละลายที่กล่าวมานั้นมีคุณสมบัติเมื่อละลายผลึกของ formazan แล้วทำให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดส่งผลให้ phenol red เปลี่ยนสีจากแดงเป็นสีเหลือง และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นจะมีการรบกวนจาก phenol red ที่น้อยลง โดยสารละลาย formazan นี้จะถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร ปัจจัยหลักที่จะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายได้แก่ ความเข้มข้นของ MTT ระยะเวลาในการบ่ม จำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต และ metabolic activity ซึ่งควรพิจารณาปัจจัยดังต่อไปนี้เพื่อที่จะสามารถแปลผลค่าการดูดกลืนแสงเป็นปริมาณหรือระดับการมีชีวิตของเซลล์ในการทดลองได้ อย่างไรก็ตามก็ตีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ MTT นั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการมีชีวิตของเซลล์ แต่ไม่ได้บ่งบอกถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) (Riss et al., 2013)

2.4 BrdU assay

BrdU หรือ 5-Bromo-2'-deoxyuridine เป็นอนุพันธ์ของ Thymidine ที่สังเคราะห์ขึ้น (Pérez-Zamorano and Valverde-Garduno, 2015) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 5 โดยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวของ BrdU จึงมีความสามารถเข้าจับกับ DNA เช่นเดียวกันและเมื่อผสม BrdU ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ BrdU จะเข้าจับกับ DNA ของเซลล์แทนที่ของ Thymidine ทำให้เมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัวนั้นเซลล์ที่แบ่งตัวได้จะมี BrdU อยู่บนสาย DNA ส่งผลให้ปริมาณของ BrdU ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะค่อยๆลดลง ทุกรอบการแบ่งตัวของเซลล์ การตรวจหา BrdU นั้นต้องอาศัย Anti-BrdU ที่มีความจำเพาะกับ BrdU ซึ่งการตรวจและวัดปริมาณของ Anti-BrdU นี้สามารถทำให้ทราบถึง ปริมาณ BrdU ที่อยู่บนสาย DNA และทราบถึงระดับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยวิธีที่ใช้ในการตรวจ Anti-BrdU นั้นมีด้วยกันหลากหลายวิธีไม่ว่าจะเป็นการใช้แอนติบอดีเข้าจับโดยตรง การใช้สารเรืองแสง (fluorescence) แม้กระทั่งการใช้แอนติบอดีอีกตัวหนึ่งก็สามารถทำได้ ข้อเสียหลักของ BrdU คือ จำเป็นที่จะต้องทำให้แอนติบอดีสามารถเข้าถึง BrdU ที่แทรกตัวอยู่ใน genomic DNA ซึ่งมีผลทำให้เกิดการย่อยหรือทำให้เนื้อเยื่อและ DNA เสียสภาพไป อีกทั้ง BrdU assay นั้นยังมีขั้นตอนที่ยุ่งยากหลายขั้นตอน และยากที่จะใช้รวมกันกับวิธีการย้อม (staining assay) แบบอื่น (Mead and Lefebvre, 2014)

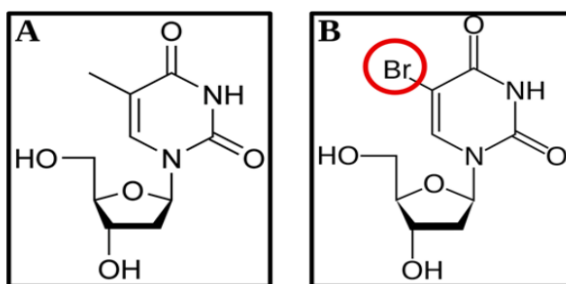
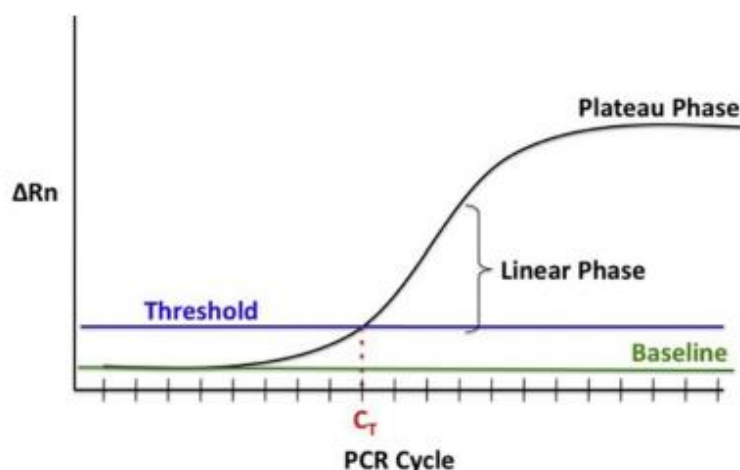


Fig 1: (A) Thymidine and (B) 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

รูปที่ 5 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของ Thymidine และ 5-bromo-2'-deoxyuridine (A) Thymidine และ (B) 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

2.5 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

เทคนิค quantitative polymerase chain reaction (qPCR) หรือ real-time PCR หรือ quantitative real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิค PCR ที่มีการเพิ่มจำนวนของ DNA และการวัดปริมาณของ DNA ไปพร้อมกันอีกทั้งเมื่อมีการนำเทคนิค reverse-transcription มาใช้รวมกันกับ qPCR แล้วยังสามารถที่จะวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ได้อีกด้วย ซึ่งการวิเคราะห์ผลนั้นจะอาศัย threshold ของค่าการเรืองแสง และจำนวนรอบในการทำ PCR (CT) ซึ่งเป็นจำนวนรอบในการทำ PCR ที่ทำให้ระดับการเรืองแสงถึงระดับ threshold ของค่าการเรืองแสง (Peirson and Butler, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 6

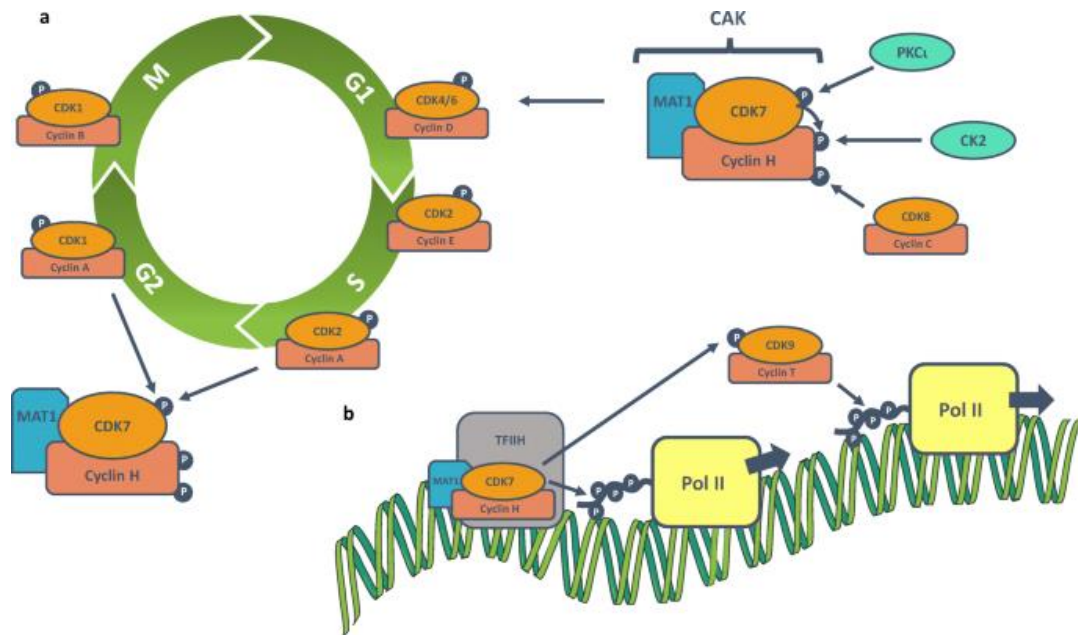


รูปที่ 6 รูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเรืองแสงและจำนวนรอบในการทำ PCR ในการทำ qPCR การศึกษาด้วยวิธี qPCR มีข้อควรพิจารณาทั้งหมด 4 ข้อ ได้แก่ การออกแบบไพรเมอร์ การเลือกยีนสำหรับใช้เป็น internal control การเลือกวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบและวัดปริมาณ DNA และวิธีการวิเคราะห์ผล ในส่วนของการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ qPCR มีข้อควรพิจารณาคำคล้ายคลึงกับการทำ PCR แบบปกติไม่ว่าจะเป็นการที่ไพรเมอร์มี self-complementarity ที่น้อยและมีความจำเพาะต่อบริเวณที่ต้องการมาก โดยขนาดของ PCR product ควรมีขนาดที่ 50-150 เบส นอกจากนี้แล้วในการศึกษาการแสดงออกของ mRNA นั้นควรออกแบบให้ไพรเมอร์ทั้ง 2 อยู่คนละเอ็กซอนกันเพื่อลดการเพิ่มจำนวนของส่วนที่ปนมาจาก genomic DNA หรือ splice variants อื่นที่ไม่ต้องการ โดยค่า melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ควรอยู่ในช่วง 58-60 °C มีขนาดตั้งแต่ 18-30 เบส และมีค่า G-C content อยู่ในช่วง 40-60% นอกจากนี้แล้วเพื่อเป็นการเพิ่มความจำเพาะของไพรเมอร์ควรหลีกเลี่ยงการใช้เบสอย่าง Adenine และ Thymine ที่บริเวณด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์ การเลือกยีนที่ใช้เป็น internal control เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบใน

การศึกษาด้วยวิธี qPCR นั้น ยีนที่ถูกเลือกมาใช้สำหรับส่วนนี้จะเป็น housekeeping gene ยกตัวอย่างเช่น β -actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) และ ribosomal RNA ซึ่งยีนเหล่านี้มีการศึกษาแล้วว่ามี การแสดงออกตลอดเวลา และมีการแสดงออกที่ไม่มีความแตกต่างมากเมื่อทำการศึกษาภายใต้การทดลองที่แตกต่างกัน การเลือกวิธีที่ตรวจจับ DNA หรือ PCR product ในการศึกษาด้วย qPCR ทำได้หลายวิธีซึ่งจะอาศัยสารเรืองแสงเป็นหลัก ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมได้แก่ SYBR Green ที่อาศัยการจับกับบริเวณ minor groove ของ DNA หรือจะเป็น ในส่วนของ TaqMan probes ที่อาศัยหลักการการถ่ายโอนพลังงานของสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับไพรเมอร์ การวิเคราะห์ผลของการศึกษาด้วยวิธี qPCR มีด้วยกัน 2 วิธีคือการวิเคราะห์แบบ absolute quantification ซึ่งเป็นการหาปริมาณตัวอย่าง DNA ที่ใช้ในการทดลอง และ relative quantification หรือ fold-change ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเปรียบเทียบระดับของ DNA ตั้งต้นในการทำ qPCR ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือ $\Delta\Delta CT$ (Dymond, 2013)

2.6 ยีน *CDK7*

ยีน Cyclin Dependent Kinase 7 (*CDK7*) มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีน *CDK7* เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ transcription ด้วยเอนไซม์ RNA polymerase II โดยมีความเกี่ยวข้องกับการ Transcription initiation factor อย่าง TFIIH โดยรวมตัวกับโปรตีน cyclin H และ Mat1 ซึ่งเป็นหนึ่งใน CDK-activating kinase (CAK) ที่พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนดังกล่าวนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) (Fisher, 2005) โดยอาศัยกระบวนการ T-loop phosphorylation ที่ *CDK1* ที่ตำแหน่งของ Thr161 *CDK2* ที่ตำแหน่งของ Thr160 *CDK4* ที่ตำแหน่งของ Thr172 และ *CDK6* ที่ตำแหน่งของ Thr177 ซึ่งส่งผลทำให้วัฏจักรของเซลล์นั้นสามารถดำเนินต่อไป (Patel et al., 2018) ดังแสดงในรูปที่ 7(a)

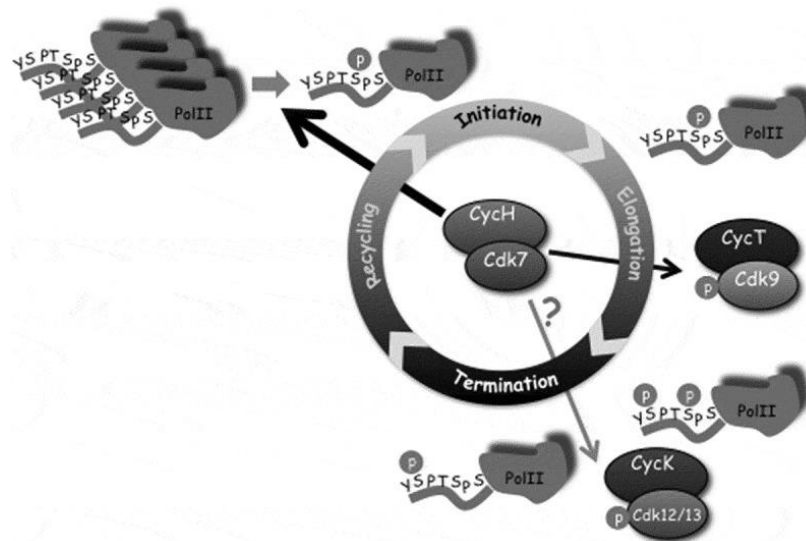


รูปที่ 7 การเกิด T-loop phosphorylation โดยโปรตีน CDK7

(a) การเกิด T-loop phosphorylation ของ CAK ที่มี CDK7 เป็นองค์ประกอบในการควบคุมให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินต่อไปได้ และ (b) ควบคุมกระบวนการ transcription

อีกหนึ่งหน้าที่ของโปรตีน CDK7 คือการควบคุมกระบวนการ transcription ดังแสดงในรูปที่ 7(b) และ รูปที่ 8 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ โปรตีน CDK7 นั้นจะกระตุ้นการทำงานของโปรตีน CDK9 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ Positive transcription elongation factor b (P-TEFb) โดยผ่านกระบวนการ T-loop phosphorylation (Kwiatkowski et al., 2014) ที่กล่าวมาข้างต้น CDK7 นั้นมีความเกี่ยวข้องกับ TFIID ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้มีหน้าที่ในการควบคุมการเกิด transcription ได้โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าที่บริเวณด้าน Carboxy-terminal domain (CTD) ของโปรตีน Rpb1 ซึ่งเป็นหน่วยที่ใหญ่ที่สุดของ RNA polymerase II เนื่องจากบริเวณดังกล่าวนี้มีลำดับโปรตีนที่ซ้ำกัน 7 โปรตีน ($Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$) ซึ่ง CDK7 นั้นจะทำการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปที่ตำแหน่งของ Ser5 และ Ser7 (Akhtar et al., 2009) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวชักนำให้เกิดการ transcription ขึ้นที่บริเวณของโปรโมเตอร์ และบริเวณ upstream ของยีน (Bataille et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน CDK12 และ CDK13/cyclin K ซึ่งล้วนแล้วแต่มีความเกี่ยวข้องกับการ transcription ทั้งสิ้น จึงได้มีการเรียกโปรตีน CDK7 ว่าเป็น “Master regulator role in transcription” (Rimel et al., 2020) และเนื่องจากฟังก์ชันการทำงานของยีน *CDK7* ทั้งการ

ควบคุมวัฏจักรของเซลล์และการ transcription ยีน *CDK7* จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาและพัฒนาายาต้านมะเร็งในปัจจุบัน



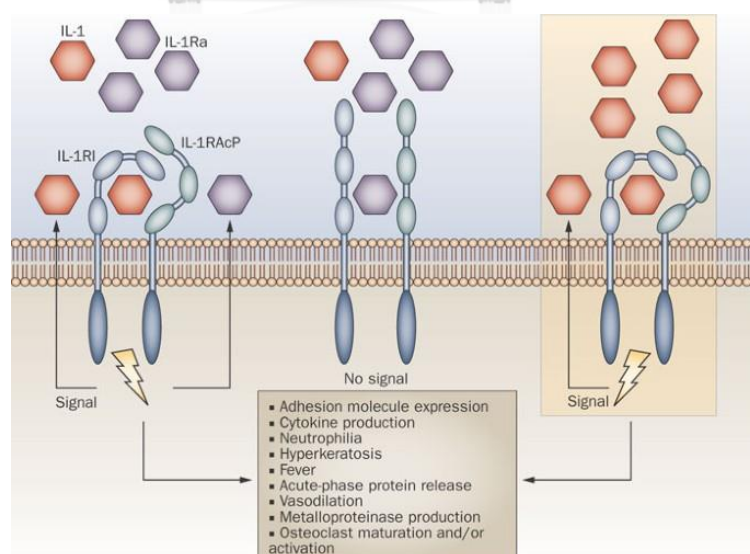
รูปที่ 8 การเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน CDK7 ในกระบวนการ transcription

2.7 ยีน *MKI67*

ยีน Marker of proliferation Ki-67 (*MKI67*) มีหน้าที่สร้างโปรตีน Ki-67 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนนักเนื่องจากหน้าที่ของยีนนี้มีความโปรตีนดังกล่าวนี้ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดอื่นที่มีหน้าที่ชัดเจน อีกทั้งขนาดและความไวของโปรตีน Ki-67 ต่อ protease cleavage ซึ่งยากในการจัดการและศึกษา โปรตีน Ki-67 นี้มีด้วยกัน 2 isoform ที่มีหน้าที่เหมือนกันคือการลดแรงตึงผิว (surfactant) ของโครโมโซม ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ดำเนินต่อไปหลังจากที่ nuclear envelope สลายไป โดยจับกับโปรตีน Phosphatase 1 (Cuylen et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการที่เซลล์ขาดโปรตีน Ki-67 ไปนั้นส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S-phase ได้ช้าลง (Sun et al., 2017) ยิ่งไปกว่านั้นมีการศึกษาพบว่าโปรตีน Ki-67 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งอีกด้วย (Mrouj et al, 2021) อีกทั้งโปรตีน Ki-67 นี้จะสามารถตรวจพบได้เฉพาะในกระบวนการแบ่งเซลล์เท่านั้น ไม่ว่าจะเป็นระยะ interphase prophase metaphase anaphase และ telophase ซึ่งจะไม่สามารถพบได้ในเซลล์ที่อยู่ในระยะ G_0 กล่าวคือจะไม่สามารถตรวจพบโปรตีน Ki-67 ได้ในเซลล์ที่อยู่ในระยะที่ไม่มีการแบ่งเซลล์ (quiescence stage) โปรตีนดังกล่าวจึงเป็น marker ที่ดีมากสำหรับการศึกษากระบวนการแบ่งเซลล์ (Bonhin et al., 2014)

2.8 ยีน *IL1RN*

ยีน Interleukin 1 receptor antagonist (*IL1RN*) มีหน้าที่ในการสร้างโปรตีน IL-1RA ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้มีหน้าที่ในการแย่งจับกับ receptor ของโปรตีน IL-1 เพื่อยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีน IL-1 และ receptor ดังแสดงในรูปที่ 9 (Arend et al., 1998) เนื่องจากโปรตีน IL-1 เป็นตัวควบคุมหลักของการเกิดการอักเสบ โดยผ่านกระบวนการทางภูมิคุ้มกันต่างๆ (Dinarello, 2009) เช่น กระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว มีความเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดไข้ เป็นตัวกระตุ้นองค์ประกอบหลายอย่างของการตอบสนองแบบฉับพลัน (acute-phase response) และมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ lymphocyte (LAF) (Gery, Gershon and Waksman, 1972) เพราะฉะนั้นแล้วการรักษาสมดุลระหว่างโปรตีน IL-1 และ IL-1RA นั้นมีความสำคัญอย่างมากในการป้องกันการเกิดการอักเสบขึ้นในบางอวัยวะ (Arend and Guthridge, 2000) ยีน *IL1RN* นั้นประกอบไปด้วย 4 isoform 1 isoform ที่มีการสร้างโปรตีนและส่งออกนอกเซลล์ (secreted isoform) ซึ่งมีหน้าที่ในการแย่งจับกับ receptor ของ IL-1 ที่กล่าวไปข้างต้น และอีก 3 isoform ที่เป็นโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular isoform) Intracellular IL-1RA (icIL-1RA) นี้จะยับยั้งการกระตุ้นต่างๆที่เป็นผลมาจากโปรตีน IL-1 จากภายในเซลล์ ยกตัวอย่างเช่นมีการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งรังไข่และมะเร็งปากมดลูกนั้นที่มีการแสดงออกของ icIL-1RA นั้นจะลดการแสดงออกของยีน *GRO* และ *IL8* ที่เป็นผลจากการกระตุ้นของโปรตีน IL-1 เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการแสดงออกของ icIL1RA (Watson et al., 1995)



รูปที่ 9 หน้าที่การทำงานของยีน *IL1RN* ที่จะสร้างโปรตีน IL-1RA เพื่อแย่งจับกับ receptor ของโปรตีน IL-1 และทำให้ไม่เกิด immune respond

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 12-well and 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Autoclave
- Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA)
- Bottle top vacuum filter (0.22 μm Pore 33.2 cm^2 PES membrane) (Corning®, USA)
- CO₂ Incubators
- Flask cell culture T25 with filter
- Hemocytometer
- Hot air oven
- Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA), Nanodrop 2000/2000c Software
- PCR plate (96-well)
- Pipette controller
- QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, USA), QuanStudio™ Design & Analysis Software
- Serological pipette 2, 5, 10 and 25 ml
- Soxhlet extractor
- Thermal cycler (MyCycler™, Bio-Rad, USA)
- Varioskan™ LUX multimod microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA), SkanIt RE 5.0 Software, SoftMax Pro 6.5.1

- Water bath
- กระบอกตวงขนาด 10 50 100 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วขนาด 50 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Media bottle) (Duran®, Germany)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งตวงถนียม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
- ปีกเกอร์ขนาด 50 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip)
- หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- หลอด Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- หลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมี

- 75% Ethanol
- Antibiotic Antimycotic Solution (100x)
- Antrone reagent (Fluka, India)
- Capital™ qPCR green (Biotechrabbit, Germany)
- cDNA Synthesis Kit (Biotechrabbit, Germany)
- Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche, Switzerland)
- Chloroform
- Conc. Sulfuric acid
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Emplura®, Germany)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) powder (Grand Island Biological Company; GIBCO)
- Fetal Bovine Serum (10x) (FBS)
- Folin & ciocalteu (Loba chemie PVT. LTP., India)
- Gallic acid
- Glucose
- Isopropanol
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, USA)
- LE Agarose
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- TRIzol® Reagent (Ambion®, Life Technologies, USA)
- Trypan Blue solution (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin-EDTA solution

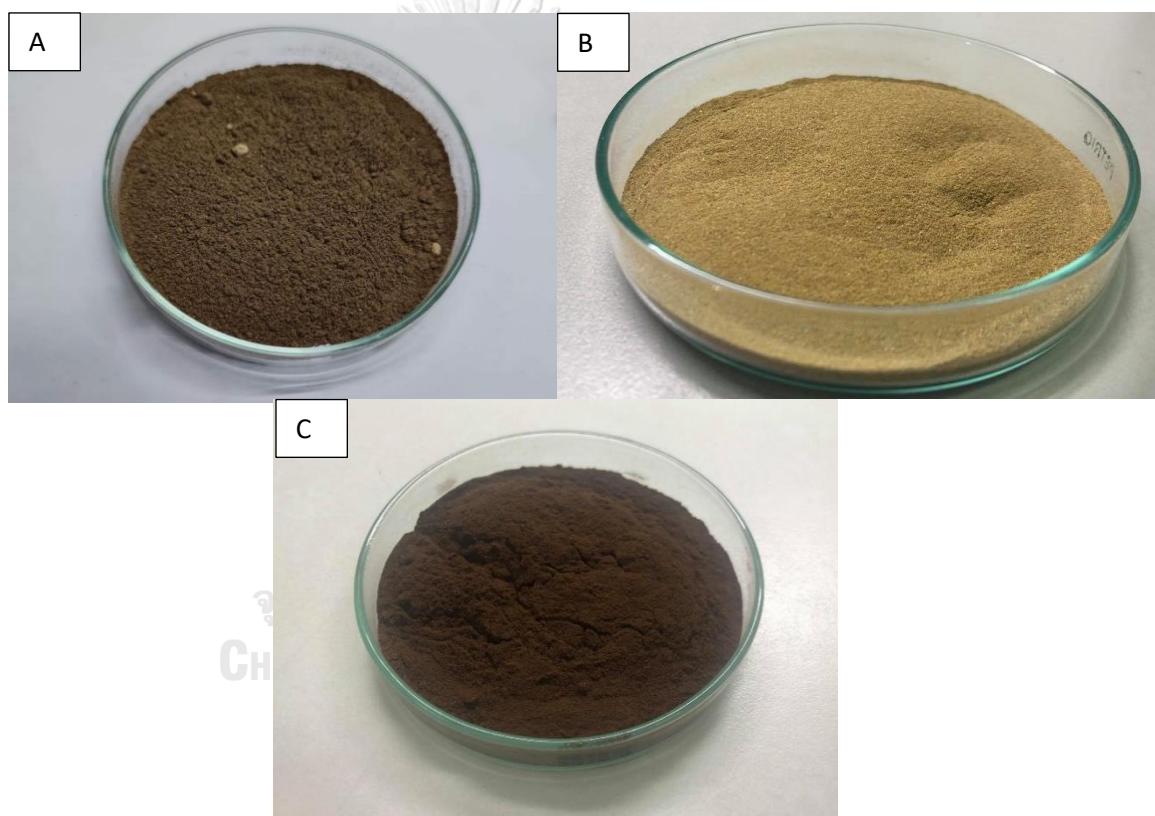
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างสูตรยาที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 สูตรได้แก่ สูตรตำรับ A สูตรตำรับ B ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเห็ดกระถินพิมานที่ปริมาณ 30% และมีสมุนไพรอื่นเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1 และอีกตัวอย่างหนึ่ง คือ เห็ดกระถินพิมาน 100% ตัวอย่างทั้งหมดจะอยู่ในรูปของผงละเอียดดังแสดงในรูปที่ 10

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของตัวอย่างแต่ละสูตรในงานวิจัย

องค์ประกอบ	สูตรตำรับ A	สูตรตำรับ B	เห็ดกระถินพินาน 100%
เห็ดกระถินพินาน (<i>Phellinus linteus</i>)	30%	30%	100%
เหง้าข้าวเย็นเหนือ (<i>Smilax corbularia</i> Kunth)	+	+	-
เหง้าข้าวเย็นใต้ (<i>Smilax glabra</i> Roxb.)	+	+	-
ผลพิลังกาสา (<i>Ardisia elliptica</i> Thunb.)	+	-	-
อื่นๆ	-	+	-

(หมายเหตุ: +: มี, -: ไม่มี)



รูปที่ 10 ตัวอย่างสูตรตำรับ A B และ 100% เห็ดกระถินพินาน

(A) ตัวอย่างสูตรตำรับ A (B) ตัวอย่างสูตรตำรับ และ (C) ตัวอย่างสูตร 100% เห็ดกระถินพินาน

3.4 การเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

งานวิจัยนี้ให้ความสนใจความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และกลไกของสารสกัดสูตรต่างๆ ที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เพราะฉะนั้นแล้วเซลล์ที่เลือกมาศึกษาจะประกอบไปด้วยเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด เซลล์ C33a ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปาก

มดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส HPV เซลล์ SiHa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 16 และ เซลล์ HeLa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 18 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับซึ่งได้แก่ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่ได้จากไตของเอมบริโอของคน โดยเซลล์ทั้งหมดจะถูกเลี้ยงใน complete DMEM (ประกอบด้วย DMEM: 89%, FBS (10x): 10% และ Antibiotic Antimycotic Solution (100x): 1%) ในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5%

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การสกัดสารจากตัวอย่าง

เริ่มจากการอบตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่อบแล้วมาสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและสกัดที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ตัวอย่างที่มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 4 กรัมต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร ในการสกัดสารครั้งนี้ได้ใช้เครื่อง Soxhlet extractor ในการสกัดสารจากตัวอย่าง ซึ่งใช้เวลาทั้งสิ้น 6 ชั่วโมงแบ่งเป็น 2 รอบ รอบละ 3 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการสกัดจะออกมาในรูปของสารละลายใสสีน้ำตาล จากนั้นนำสารละลายที่ได้กรองผ่าน bottle top vacuum filter (0.22 µm) หลังจากกรองผ่านฟิลเตอร์แล้วนำสารสกัดมาวัดค่าความเข้มข้นโดยนำสารสกัดมาระเหย้าน้ำออกที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 คืน และชั่งน้ำหนักแห้งของตะกอนที่เหลือจากการระเหยน้ำออกไป จากนั้นนำน้ำหนักแห้งที่ได้ลบด้วยน้ำหนักของบีกเกอร์เปล่าและหารด้วยปริมาณของสารสกัดที่นำมาวัดความเข้มข้น โดยสารสกัดทั้ง 3 สูตรจะถูกเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

3.5.2 การหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

การหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดในการศึกษานี้ใช้วิธี Anthrone test โดยอ้างอิงจากวิทยานิพนธ์ของ ปริญา (2535) เริ่มจากการเตรียมสารละลายอันโทรน (Anthrone reagent) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำผง Anthrone มาละลายด้วยกรดซัลฟูริก (Conc. Sulfuric acid) โดยในการหาปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างทุกครั้งควรเตรียมสารละลายอันโทรนใหม่เสมอ จากนั้นนำสารสกัดแต่ละสูตรมาในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมเข้ากับสารละลายอันโทรนที่ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีก่อนจะนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 625 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากสมการกราฟมาตรฐานของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการทดลอง

การทดลองในรูปแบบเดียวกันแต่เปลี่ยนจากตัวอย่างสารสกัดทั้ง 3 สูตรเป็นสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.5.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในการศึกษานี้อ้างอิงวิธีการทดลองจากงานวิจัยของ Wang et al. (2019) มาปรับเปลี่ยนให้เหมาะกับการศึกษาในส่วนนี้ซึ่งมีวิธีดังต่อไปนี้ นำสารสกัดแต่ละสูตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย 10% Folin & ciocalteu ปริมาตร 2 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร (Na_2CO_3) 2 มิลลิลิตรมาผสมเข้าด้วยกัน ต่อมานำสารละลายที่ผสมแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยห้ามโดนแสงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลจากสมการกราฟมาตรฐานที่ใช้ gallic acid แทนที่ของสารสกัดแต่ละสูตรโดยจะใช้วิธีการทดสอบแบบเดียวกัน

3.5.4 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability study)

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ HEK293 C33a SiHa และ HeLa หลังจากการทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 3 สูตร เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 96 หลุม ในจำนวนหลุมละ 3,000 เซลล์ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับสารสกัดแต่ละสูตรใส่ลงในหลุมภายหลังจากนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ในการทดสอบของสารสกัดสูตรตำรับ A และ B เซลล์ทั้งหมดจะถูกทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 25 ถึง 600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในสารสกัดสูตร 100% ให้เตรียมปริมาณจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายในช่วงของความเข้มข้นเท่ากับ 400 ถึง 4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ช่วงของความเข้มข้นอาจมีการปรับเพิ่มหรือลดเพื่อให้เหมาะกับการคำนวณหา 50% inhibitory concentration (IC_{50}) และในการทดสอบในส่วนนี้ได้เลือกใช้ Cisplatin ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดการทดลองควบคุมบวก (positive control) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะทำทั้งสิ้น 4 ซ้ำ ($n=4$) หลังจากใส่สารละลายระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์และสารสกัดลงไปแล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดแล้วมาประเมินระดับการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้ MTT ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ DMEM ในอัตราส่วน 1: 9 และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย MTT ออกและทำการละลายผลึกของ formazan ด้วย DMSO ต่อมายังวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 570

นาโนเมตร ในส่วนของการคำนวณเพื่อที่จะประเมินระดับการมีชีวิตของเซลล์นั้นสามารถคำนวณได้จากสูตรที่อธิบายดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Cell viability}_x = (\text{Abs}_x - \text{Mean of Abs}_{\text{BG}}) / (\text{Mean of Abs}_B - \text{Mean of Abs}_{\text{BG}}) \times 100$$

% Cell viability_x: ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น X

Abs_x: ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น X

Mean of Abs_{BG}: ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในชุดการทดลองที่ไม่มีการใส่เซลล์ลงไป (background)

Mean of Abs_B: ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในชุดการทดลองที่ไม่มีการผสมสารสกัดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (blank)

จากนั้นเมื่อได้ค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละชุดการทดลองแล้ว นำค่าดังกล่าวมาเฉลี่ยและหาค่าการกระจายตัวของข้อมูล ต่อมานำค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ในแต่ละความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่ค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์นั้นแปรผกผันกับความเข้มข้น (dose-dependent) ไปคำนวณหาค่า IC₅₀ โดยอาศัยสมการเชิงเส้นระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัด ($y = mx + c$; โดยกำหนดให้ y เท่ากับค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ x เท่ากับความเข้มข้นของสารสกัด m คือความชันของกราฟ และ c คือจุดตัดแกน Y) จากนั้นเมื่อสร้างสมการการลดลงของค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ได้แล้วแทนค่า y ในสมการเส้นตรงด้วย 50 และแก้สมการเพื่อหาค่า x ซึ่งค่า x ที่ได้จะเป็นค่าของความเข้มข้นที่ทำให้ค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 50% หรือค่า IC₅₀

3.5.5 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation study)

การทดสอบในส่วนนี้มีวิธีการและขั้นตอนคล้ายกับการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ในหัวข้อ 3.5.4 เริ่มจากเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในเพลทขนาด 96 หลุมเป็นจำนวน 3,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง นำสารสกัดแต่ละสูตรมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า IC₅₀ ที่คำนวณได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.4 ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มีเซลล์อยู่ภายหลังจากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และในการทดสอบของแต่ละชนิดเซลล์นั้นจะมีการนำ Cisplatin มาใช้เป็นชุดการทดลองควบคุมบวก (positive control) โดยจะใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแต่ละชุดการทดลองนั้นจะทำทั้งสิ้น 4 ซ้ำ (n=4) จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5% เป็นเวลา 1 วัน และ

2 วัน หลังจากครบกำหนดแล้วนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยชุด cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche, Switzerland) ซึ่งมีวิธีดังต่อไปนี้เริ่มจากนำ BrdU labelling reagent ผสมกับ cDMEM ใส่ลงในหลุมแทนที่ของอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าและเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลาทั้งสิ้น 18 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและทำให้เพลทแห้งโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาใส่ Fix Denat. และนำไปบ่มที่ 20 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลายออกและเติม Anti-BrdU-POD ลงไปและบ่มต่อที่ 20 °C เป็นเวลา 90 นาที ต่อมาดูดสารละลายออกและล้างเพลทด้วย PBS 3 รอบ ก่อนจะใส่ substrate solution และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 และ 492 นาโนเมตร ทุกๆ 10 นาที จนครบ 30 นาที จากนั้นนำมาคำนวณค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ (% cell proliferation) ของสารสกัดแต่ละสูตร เริ่มจากนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ลบด้วยที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm จากนั้นใช้สูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Cell Proliferation}_x = (\text{Abs}_x - \text{Mean of Abs}_{BG}) / (\text{Mean of Abs}_B - \text{Mean of Abs}_{BG}) \times 100$$

% Cell Proliferation_x: ค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด X ที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀

Abs_x: ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ลบด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด X ที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀

Mean of Abs_{BG}: ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ลบด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ในชุดการทดลองที่ไม่มีการใส่เซลล์ลงไป (background)

Mean of Abs_B: ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ลบด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ในชุดการทดลองที่ไม่มีการผสมสารสกัดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (blank)

ต่อมานำค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์มาหาค่าเฉลี่ย และค่าการกระจายตัวของข้อมูล จากนั้นนำไปทดสอบทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ของชุดการทดลองที่มีการทดสอบด้วยสารสกัด (treatment group) และชุดการทดลองที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด (control group) โดยใช้ Independent T-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

3.5.6 การศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression study)

3.5.6.1 การเตรียมเซลล์และเก็บตัวอย่างเซลล์

การศึกษาในส่วนนี้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลทขนาด 12 หลุมจำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมจากนั้นเมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการผสมกับสารสกัดแต่ละสูตรให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า IC_{50} ที่คำนวณได้จากการศึกษาในข้อ 3.5.4. แต่ละชุดการทดลองนั้นจะทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ($n=3$) จากนั้นใส่ลงในแต่ละหลุมที่มีเซลล์อยู่ภายหลังจากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากรุ่นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากรุ่นใส่ TRIzol® Reagent (Ambion®, Life Technologies, USA) หลุมละ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำเพลทไปแช่ตู้เย็น $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 4 นาที ต่อมานำเซลล์ที่อยู่ใน TRIzol® Reagent แต่ละหลุมของสารสกัดแต่ละสูตรมารวมกันและแบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดละ 1 มิลลิลิตร 1 หลอด และ หลอดละ 500 ไมโครลิตร 1 หลอด) ต่อมานำเซลล์ที่เก็บได้เก็บรักษาไว้ที่ $-20^{\circ}C$ (สามารถเก็บได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

3.5.6.2 การสกัด RNA เซลล์และการสังเคราะห์ cDNA

การสกัด RNA จากเซลล์เริ่มจากนำตัวอย่างออกจาก $-20^{\circ}C$ เมื่อตัวอย่างละลายแล้วใส่ chloroform ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร (ต่อปริมาณ TRIzol® Reagent 1,000 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ในถังน้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g; $10^{\circ}C$ เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างนั้นเตรียมหลอด 1.5 มิลลิลิตรใหม่แช่ในถังน้ำแข็ง เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จสารละลายจะแยกชั้นเป็น 3 ส่วนทำการดูดสารละลายใสส่วนที่อยู่บนสุดใส่ในหลอดที่แช่เตรียมไว้ในถังน้ำแข็ง จากนั้นเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร (ต่อปริมาณ TRIzol® Reagent 1,000 ไมโครลิตร) จากนั้นแช่ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g; $10^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที ต่อมาดูดสารละลายทิ้งทั้งหมด และเติม 75% ethanol ลงไป 1,000 ไมโครลิตร (ต่อปริมาณ TRIzol® Reagent 1,000 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 g; $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาดูดสารละลายทิ้ง และทำให้หลอดแห้งโดยการคว่ำหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อหลอดแห้งสนิทเติมน้ำ type I ในปริมาณหลอดละ 25 ไมโครลิตรและนำหลอดไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ $50-51^{\circ}C$ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่า optical density (OD) เพื่อหาปริมาณ RNA ในแต่ละชุดการทดลอง

หลังจากได้ค่า OD ของแต่ละชุดการทดลองแล้ว นำปริมาณ RNA ที่วัดได้มาคำนวณและทำการเตรียมสารละลาย RNA ให้มีปริมาณเท่ากันในแต่ละชุดการทดลองและมีปริมาณอยู่ในช่วง 100-1,500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นใช้ชุด cDNA Synthesis Kit (Biotech rabbit, Germany) ในการสังเคราะห์ cDNA จากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ และเมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการสังเคราะห์จะได้ cDNA ในแต่ละชุดการทดลองที่มีปริมาณ cDNA ที่เท่ากันเพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป ด้วยวิธี real-time PCR ต่อไป

3.5.6.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *CDK7* *MKI67* และ *IL1RN* สำหรับการทำ real-time PCR

การออกแบบไพรเมอร์ของทั้ง 2 ยีนนั้นได้มีการออกแบบให้ forward primer และ reverse primer ให้อยู่คนละเอีกซอนกันเพื่อที่จะสามารถทราบได้ว่าผลิตภัณฑ์ของการทำ real-time PCR นั้นได้มาจาก template ที่เป็น cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA หรือ DNA ที่ปนมาในการสกัด RNA โดยดูจากขนาดที่ต่างกัน อีกทั้งยังออกแบบให้ทั้ง forward primer และ reverse primer มี melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์ให้ใกล้เคียง Tm ของไพรเมอร์สำหรับยีน *GAPDH* ที่ใช้เป็น internal control ซึ่งได้อ้างอิงในวิทยานิพนธ์ของ Kanwalat (2019) เช่นเดียวกับไพรเมอร์ของยีน *MKI67* ที่ได้อ้างอิงลำดับเบสของไพรเมอร์จากวิทยานิพนธ์ดังกล่าว ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์ ความยาวไพรเมอร์ ค่า Tm และ % GC content มีข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2

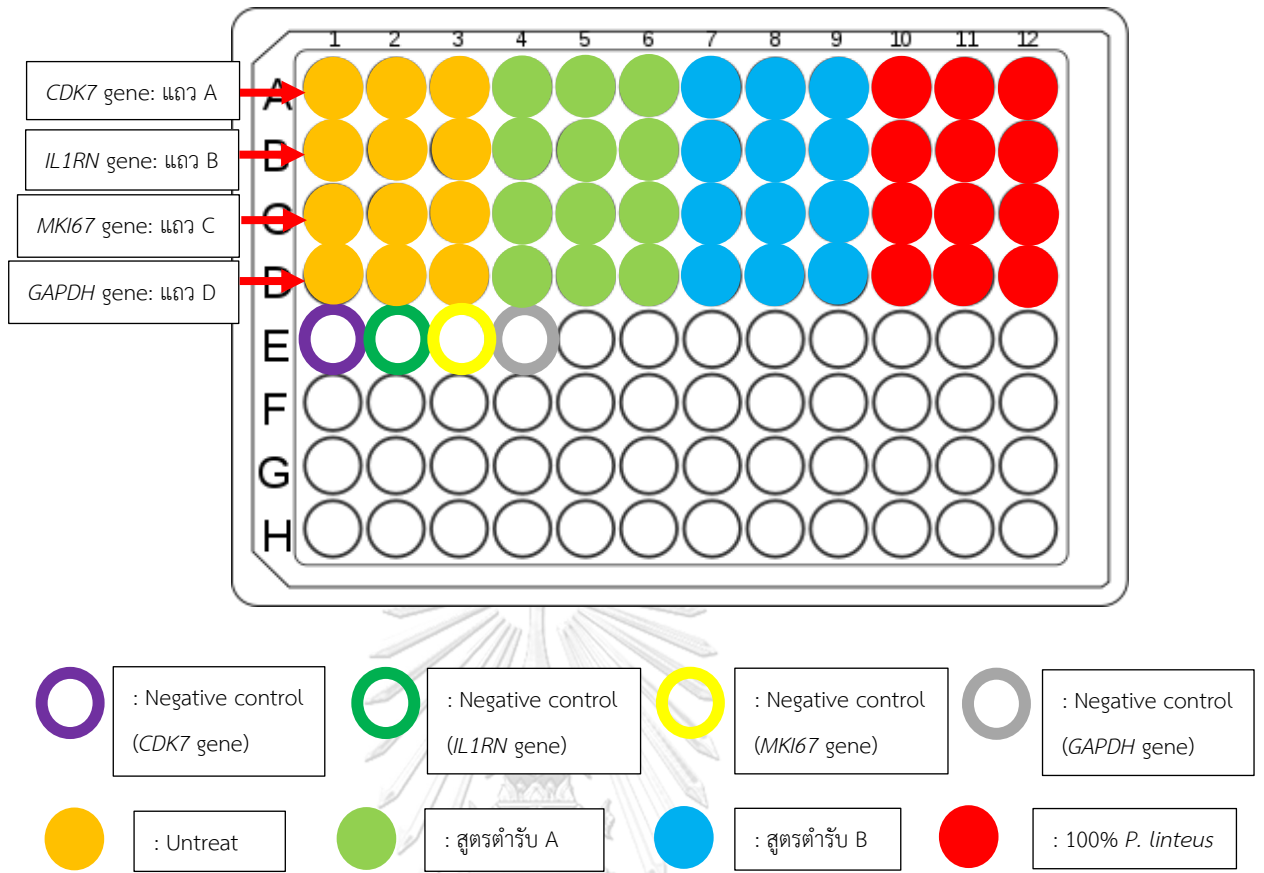
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์สำหรับยีน *CDK7* *MKI67* *IL1RN* และ *GAPDH*

Primer	Sequence 5'to 3'	Length (bp)	Tm (°C)	% GC content	Reference
<i>CDK7</i> -Forward primer	GGCTCTGGACGTGAA GTCTC	20	57.5 °C	60.0%	-
<i>CDK7</i> -Reverse primer	CTTAATGGCGACAATT TGGTTGGTG	25	57.2 °C	44.0%	-
<i>MKI67</i> -Forward primer	CCACACTGTGTCGTC GTTTG	20	53.8 °C	55.0%	Kanlawat (2019)
<i>MKI67</i> -Reverse primer	CCGTGCGCTCATCCA TTC	18	52.6 °C	61.1%	Kanlawat (2019)

<i>IL1RN</i> -Forward primer	AGGAACAACCAACTA GTTGCTGG	23	57.4 °C	47.8%	-
<i>IL1RN</i> -Reverse primer	TTGACACAGGACAGG CACATC	21	57.4 °C	52.4%	-
<i>GAPDH</i> -Forward primer	GTCTCCTCTGACTTCA ACAGCGA	23	57.1 °C	52.2%	Kanlawat (2019)
<i>GAPDH</i> -Reverse primer	CCTGTTCGTGTAGCC AAATTCGT	23	55.3 °C	47.8%	Kanlawat (2019)

3.5.6.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* *MKI67* และ *IL1RN* ด้วย real-time PCR

การศึกษาในส่วนนี้จะทำการทดลองต่อจากในส่วนข้อ 3.5.6.2. หลังจากที่ได้ cDNA ของเซลล์ในแต่ละชุดการทดลองแล้ว นำตัวอย่าง cDNA มาทำ real-time PCR โดยใช้รูปแบบ detection ของ PCR product เป็น SYBR Green ด้วยชุด Capital™ qPCR green (Biotechrabbit, Germany) โดยในแต่ละชุดการทดลองของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (n=3) ต่อหนึ่งยีน ซึ่งแบ่งชุดการทดลองได้ตั้งรูปที่ 11 หลังจากนั้นจะได้ผลการทดลองออกมาในค่าของ cycle (CT) จากนั้นนำค่า CT ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองในแต่ละยีนนำมาคำนวณระดับการแสดงออกโดยเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ไม่มีทดสอบสารสกัด (untreat) และใช้การแสดงออกของยีน *GAPDH* เป็น internal control ซึ่งวิธีที่ใช้ในการคำนวณคือ $\Delta\Delta CT$ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นร้อยละเพื่อง่ายต่อการแปลผลมากขึ้น และนำค่าร้อยละการแสดงออกของยีนที่คำนวณได้มาทดสอบทางสถิติเพื่อยืนยันความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด กับชุดการทดลองที่ทดสอบด้วยสารสกัดที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ด้วยวิธี Independent T-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22



รูปที่ 11 การแบ่งชุดการทดลองในแต่ละชนิดเซลล์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน

บทที่ 4

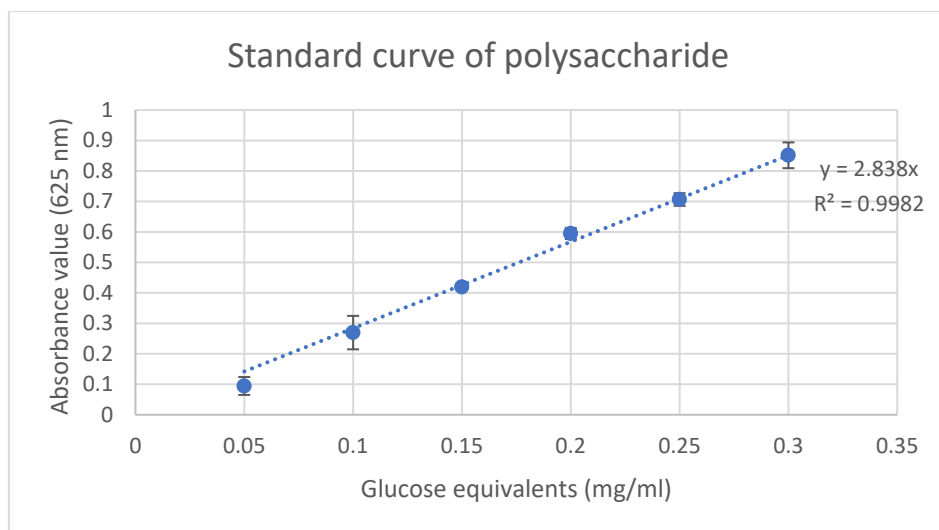
ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดสารจากตัวอย่างทั้ง 3 สูตรและความเข้มข้นของสารสกัด

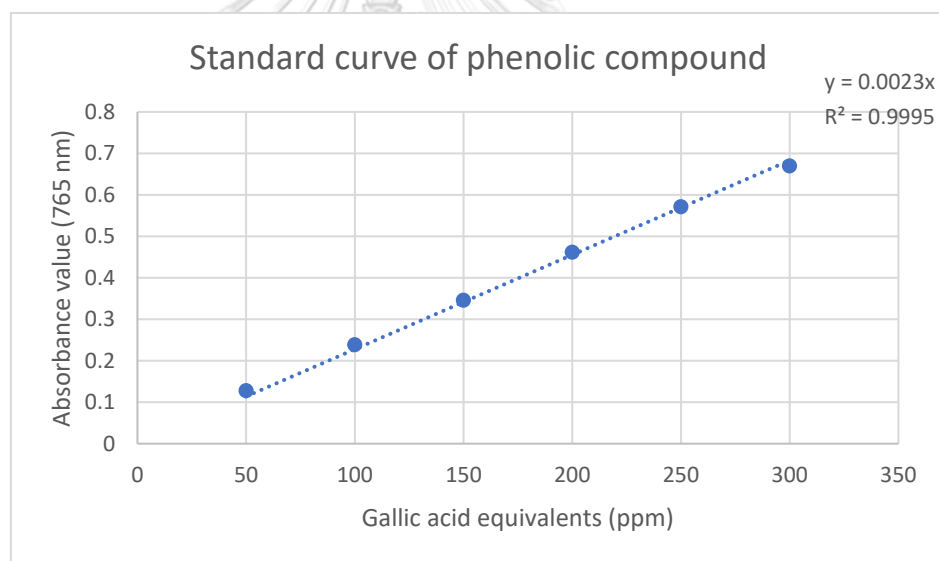
สารสกัดที่ได้ออกมาเป็นสารละลายที่มีสีน้ำตาลใสทั้ง 3 สูตรด้วยกันแต่สารสกัดสูตร 100% ให้ดรรชนีพิมาณจะมีสีน้ำตาลที่เข้มกว่าสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และเมื่อนำสารสกัดทั้ง 3 ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้วิธีการชั่งน้ำหนักแห้งของตะกอนเมื่อระเหยน้ำออกพบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A มีความเข้มข้นอยู่ที่ 5.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 9.45% ของปริมาณตัวอย่างที่ใช้ โดยตัวอย่างทุกสูตรจะใช้ตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 8 กรัมของน้ำหนักแห้งในขั้นตอนการสกัดสาร สารสกัดสูตรตำรับ B มีความเข้มข้นอยู่ที่ 11.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 22.37% ของปริมาณตัวอย่างที่ใช้ และสารสกัดสูตร 100% ให้ดรรชนีพิมาณมีความเข้มข้นเท่ากับ 46.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 87.19% ของปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 3

4.2 ผลการวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลในสารสกัด

หลังจากที่วัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลดังในข้อที่ 3.5.2 และ 3.5.3 แล้วผลที่ได้จะออกมาในรูปของค่าการดูดกลืนแสง เมื่อนำค่าทั้ง 2 ส่วนดังกล่าวนี้มาคำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลโดยอาศัยสมการกราฟมาตรฐานในรูปที่ 12 และ ที่ 13 ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลในสารสกัดแต่ละสูตรดังแสดงในตารางที่ 3 โดยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสารสกัด 100% ให้ดรรชนีพิมาณนั้นมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ที่ 3.08 ± 0.34 10.53 ± 0.98 และ 50.36 ± 3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของสารประกอบฟีนอลนั้นในสารสกัดสูตรตำรับ A มีอยู่ 0.60 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสูตรตำรับ B มีสารประกอบฟีนอลอยู่ 0.75 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดให้ดรรชนีพิมาณอยู่ที่ 0.54 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานและสมการใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัด (n=3)



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานและสมการใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัด (n=3)

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความเข้มข้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลในสารสกัด
สูตรตำรับ A สารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน (n=3)

สารสกัด	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละของ ความเข้มข้น ต่อปริมาณ ตัวอย่างที่ใช้	ปริมาณพอลิ แซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ สารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
สูตรตำรับ A	5.04	9.45%	3.08±0.34	0.60±0.01
สูตรตำรับ B	11.93	22.37%	10.53±0.98	0.75±0.01
100% เห็ดกระถินพิมาน	46.50	87.19%	50.36±3.60	0.54±0.01

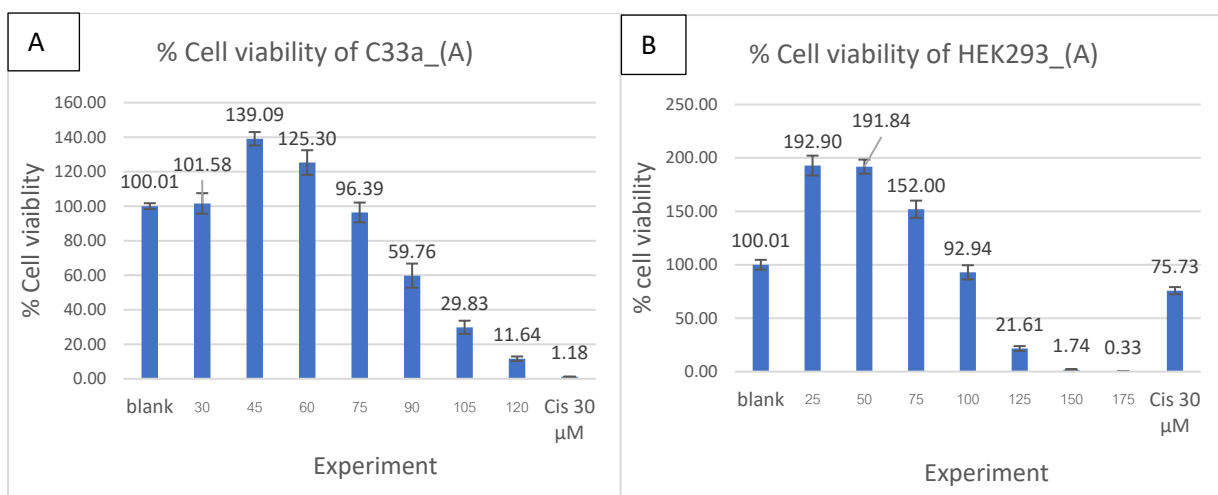
4.3 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability Study)

ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบกับ
สารสกัดสูตรตำรับ A B และสารสกัด 100% เห็ดกระถินพิมานในส่วนนี้ได้จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ย
ของค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสกัดแต่ละสูตรซึ่งมีผลดังนี้

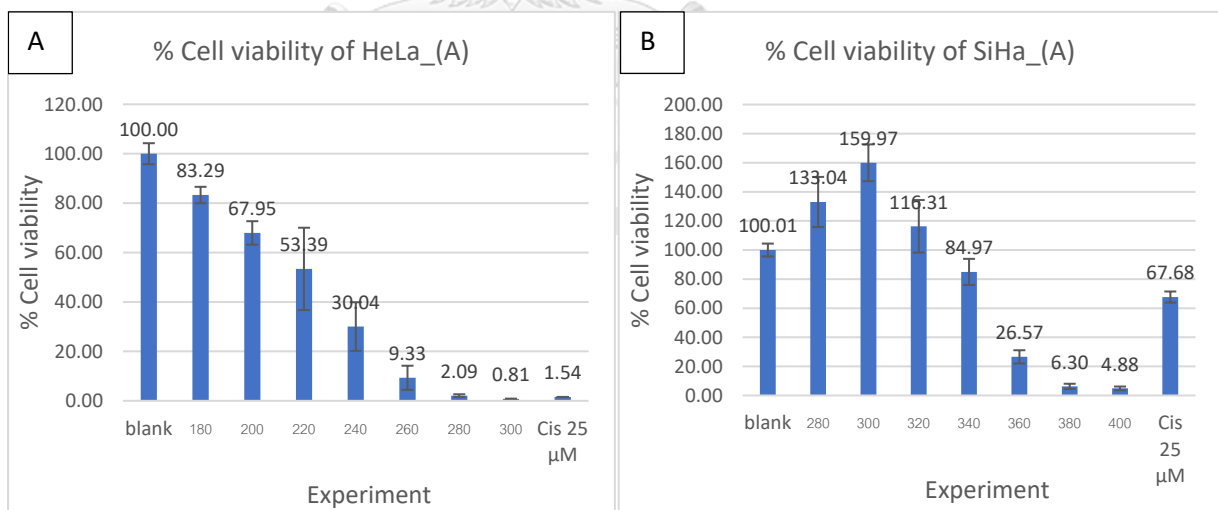
4.3.1 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A

สารสกัดสูตรตำรับ A สามารถลดค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ทั้ง C33a HEK293 HeLa และ
SiHa เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแต่ช่วงของความเข้มข้นที่ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดนั้น
ลดลงจะมีความแตกต่างกันออกไป ในเซลล์ C33a ที่ความเข้มข้น 30 45 60 75 90 105 และ 120
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสูตรตำรับ A มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ
101.58±11.88 139.09±7.74 125.30±14.26 96.39±11.45 59.76±13.99 29.83±7.65 และ
11.64±2.59% ตามลำดับ ในเซลล์ HEK293 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 50 75 100 125 150 และ 175
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสูตรตำรับ A มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ
192.90±18.54 191.84±13.18 152.00±16.10 92.94±13.25 21.61±4.52 1.74±1.40 และ
0.33±0.53% ตามลำดับ ในเซลล์ HeLa ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A เท่ากับ 180 200
220 240 260 280 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ
83.29±6.64 67.95±9.49 53.39±33.31 30.04±19.69 9.33±9.76 2.09±1.10 และ 0.81±0.05
ตามลำดับ และในเซลล์ SiHa ที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A เท่ากับ 280 300 320 340
360 380 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 133.04±34.47

159.97±25.32 116.31±36.11 84.97±17.94 26.57±9.07 6.30±3.55 และ 4.88±2.57%
ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 14(A) 14(B) 15(A) และ 15(B) ตามลำดับ



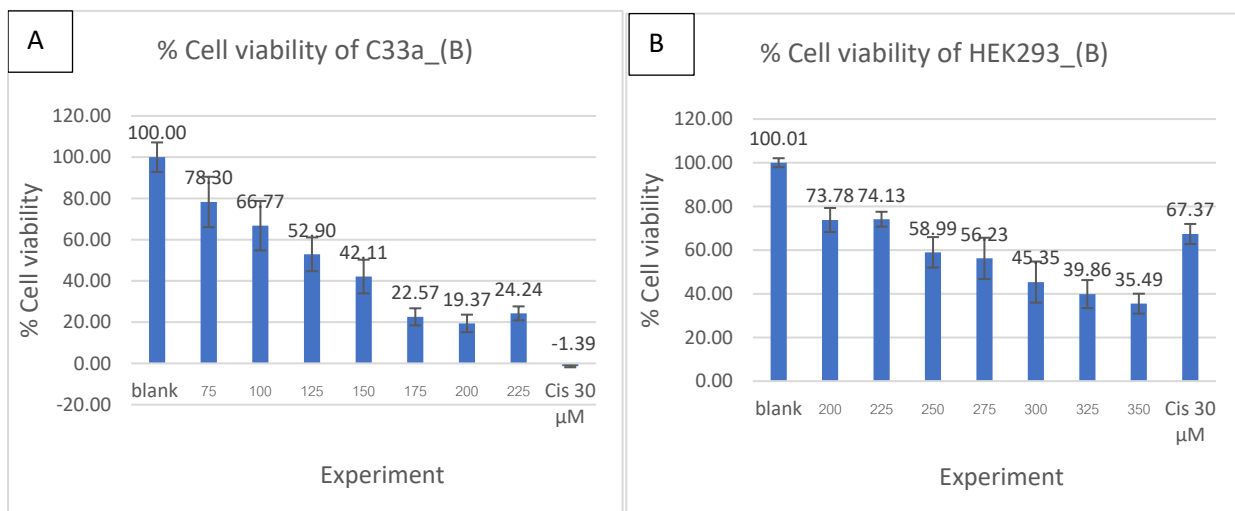
รูปที่ 14 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ C33a และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HEK293 (n=4)



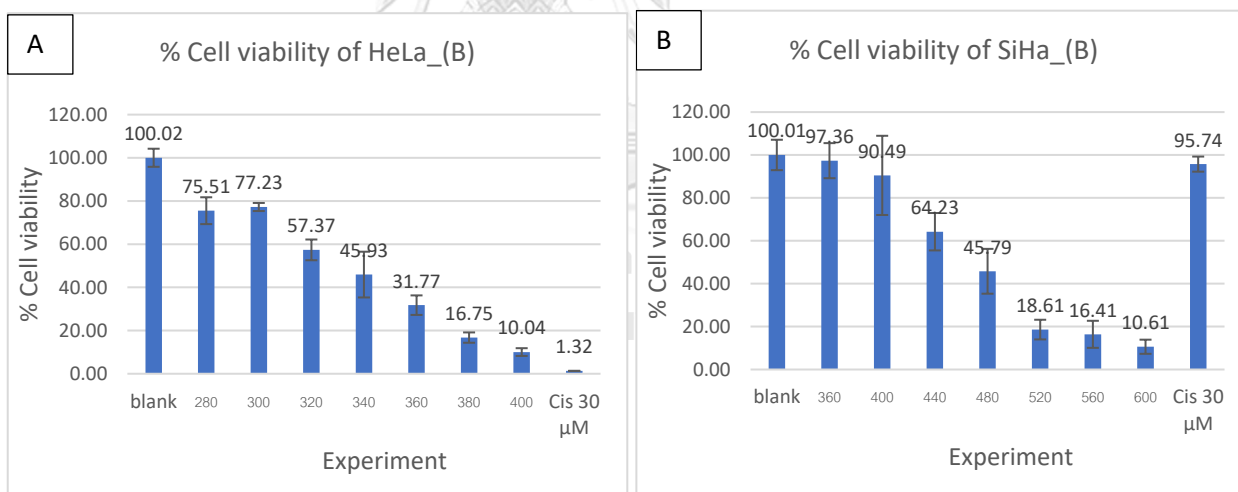
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HeLa และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ SiHa (n=4)

4.3.2 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B

สารสกัดสูตรตำรับ B สามารถลดค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ทั้ง C33a HEK293 HeLa และ SiHa เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นซึ่งช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ลดค่าร้อยละ การมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไปเช่นเดียวกันกับสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B เท่ากับ 75 100 125 150 175 200 และ 225 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 78.30 ± 24.44 66.77 ± 23.91 52.90 ± 16.37 42.11 ± 16.34 22.57 ± 8.28 19.37 ± 8.50 และ $24.24 \pm 6.79\%$ ตามลำดับ ในเซลล์ HEK293 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200 225 250 275 300 325 และ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสูตรตำรับ B มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 73.78 ± 11.01 74.13 ± 6.82 58.99 ± 13.93 56.23 ± 18.88 45.35 ± 18.82 39.86 ± 12.85 และ $35.49 \pm 9.10\%$ ตามลำดับ ในเซลล์ HeLa ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B เท่ากับ 280 300 320 340 360 380 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 75.51 ± 12.42 77.23 ± 3.74 57.37 ± 9.61 45.93 ± 21.18 31.77 ± 9.05 16.75 ± 4.78 และ $10.04 \pm 3.60\%$ ตามลำดับ และในเซลล์ SiHa ที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B เท่ากับ 360 400 440 480 520 560 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 97.36 ± 16.35 90.49 ± 36.92 64.23 ± 17.44 45.79 ± 20.90 18.61 ± 9.17 16.41 ± 12.60 และ $10.61 \pm 6.58\%$ ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 16(A) 16(B) 17(A) และ 17(B) ตามลำดับ



รูปที่ 16 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ C33a และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HEK293 (n=4)

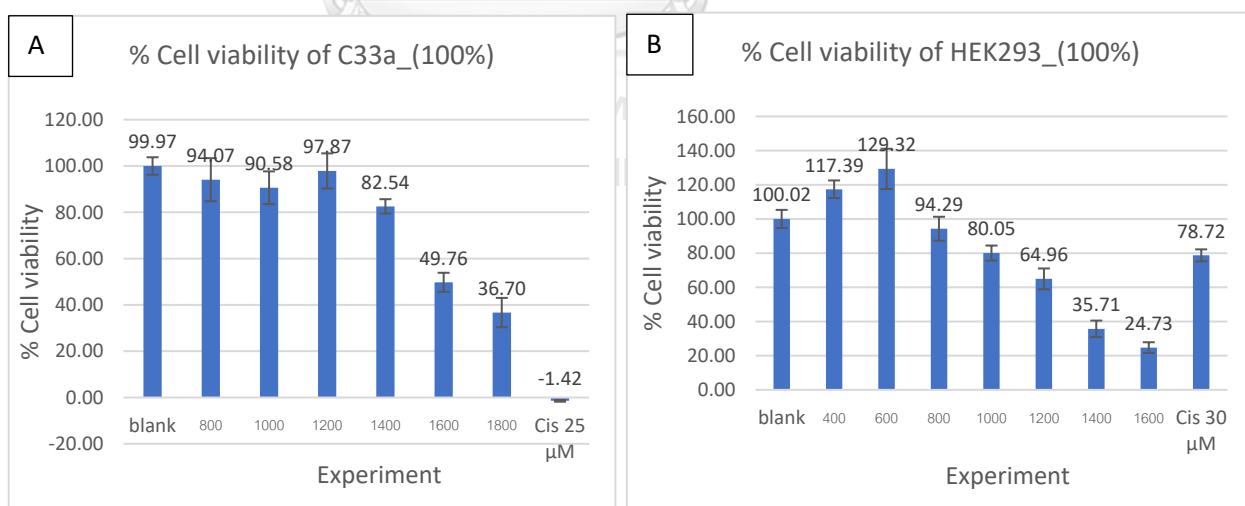


รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HeLa และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ SiHa (n=4)

4.3.3 ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตร 100% เติดกระถินพินาน

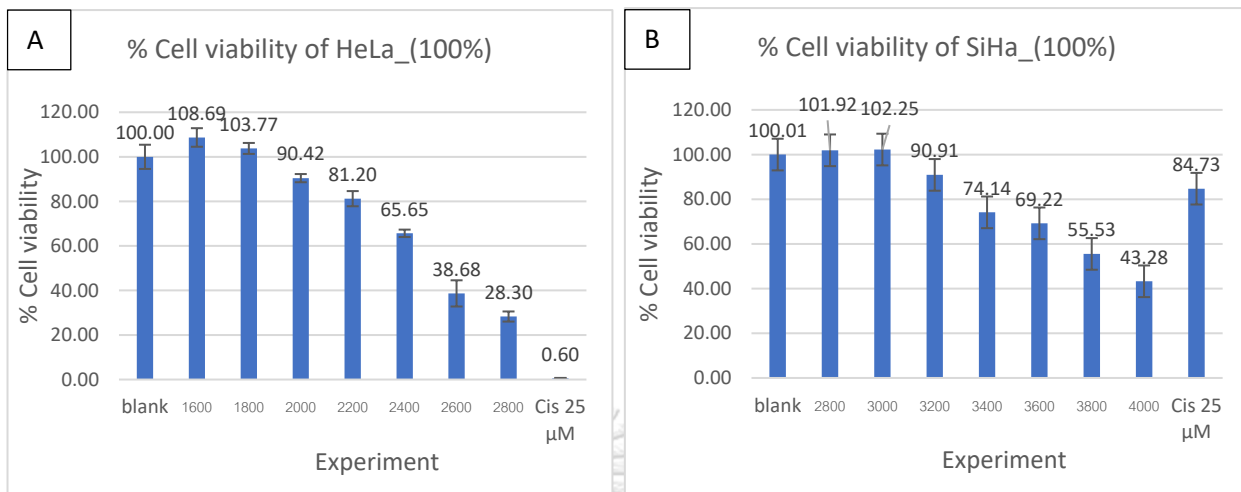
ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ทั้ง C33a HEK293 HeLa และ SiHa มีลักษณะความสัมพันธ์ในรูปแบบเดียวกันกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้นจะ

ส่งผลให้ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์นั้นลดลง ซึ่งช่วงของความเข้มข้นที่ส่งผลดังกล่าวนั้นก็จะมีแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของเซลล์ ซึ่งผลการศึกษการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพืมานมีดังต่อไปนี้ ที่ความเข้มข้น 800 1,000 1,200 1,400 1,600 และ 1,800 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสูตรดังกล่าว มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 94.07 ± 18.60 90.58 ± 14.17 97.84 ± 15.14 82.54 ± 6.21 49.76 ± 8.22 และ $36.70 \pm 12.64\%$ ตามลำดับ ในเซลล์ HEK293 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 400 600 800 1,000 1,200 1,400 และ 1,600 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรของสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพืมาน มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 117.39 ± 10.32 129.32 ± 23.58 94.29 ± 14.02 80.05 ± 8.80 64.96 ± 12.17 35.71 ± 9.69 และ $24.73 \pm 6.29\%$ ตามลำดับ ในเซลล์ HeLa ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพืมาน เท่ากับ 1,600 1,800 2,000 2,200 2,400 2,600 และ 2,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 108.69 ± 8.33 103.77 ± 4.92 90.42 ± 3.67 81.20 ± 6.82 65.65 ± 3.33 38.68 ± 11.77 และ $28.30 \pm 4.54\%$ ตามลำดับ และในเซลล์ SiHa ที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพืมาน 2,800 3,000 3,200 3,400 3,600 3,800 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 101.92 ± 10.29 102.25 ± 7.62 90.91 ± 4.26 74.14 ± 5.53 69.22 ± 7.40 55.53 ± 6.61 และ $43.28 \pm 9.70\%$ ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 18(A) 18(B) 19(A) และ 19(B) ตามลำดับ



รูปที่ 18 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a และ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพืมานที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ C33a และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HEK293 (n=4)



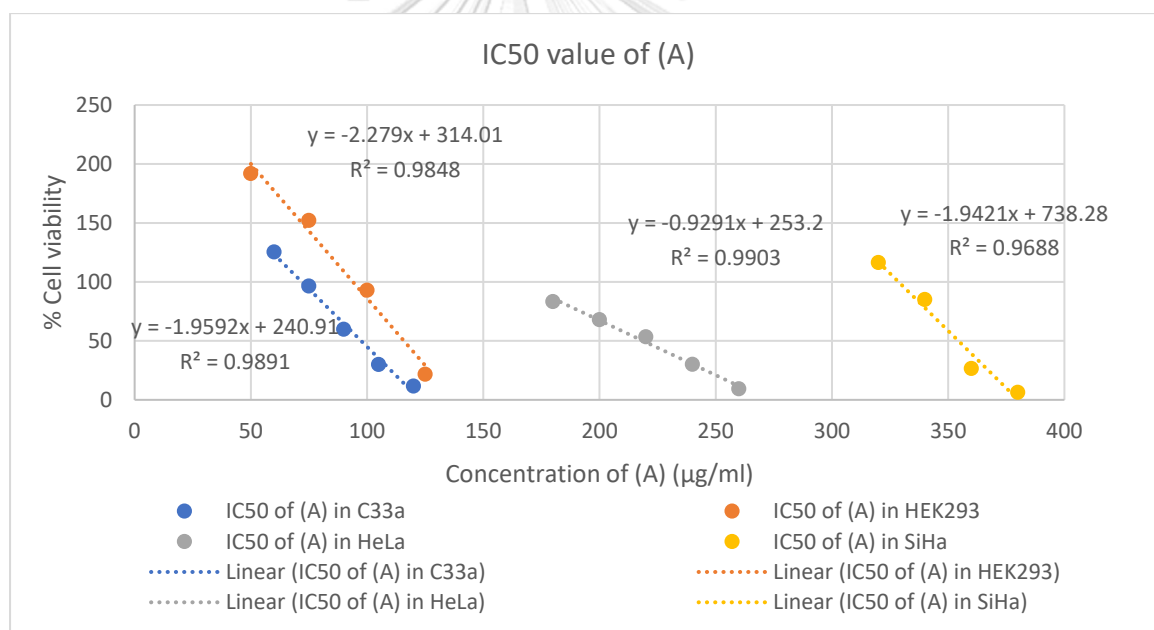
รูปที่ 19 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa และ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินปริมาณที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่กราฟ (A) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ HeLa และกราฟ (B) เป็นผลการศึกษาในเซลล์ SiHa (n=4)

4.3.4 ผลการประเมินระดับความสามารถในการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัด

ผลการทดลองในส่วนนี้ได้จากการนำค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa ในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารสกัดมาคำนวณค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของสารสกัดแต่ละสูตรในการลดระดับความเป็นพิษในแต่ละชนิดเซลล์ ในสารสกัดสูตรตำรับ A มีค่า IC_{50} ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa เท่ากับ 97.44 115.84 218.71 และ 354.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A ดังแสดงในรูปที่ 20 จากผลส่วนนี้ทำให้ทราบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A มีความเป็นพิษต่อเซลล์ C33a มากที่สุดตามมาด้วย HEK293 HeLa และ SiHa ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

Cell type	50% inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation ($y=mx+c$)	R-squared
C33a	97.44	$y=-1.9592x+240.91$	0.9891
HEK293	115.84	$y=-2.279x+314.01$	0.9848
HeLa	218.71	$y=-0.9291x+253.2$	0.9903
SiHa	354.40	$y=-1.9421x+738.28$	0.9688

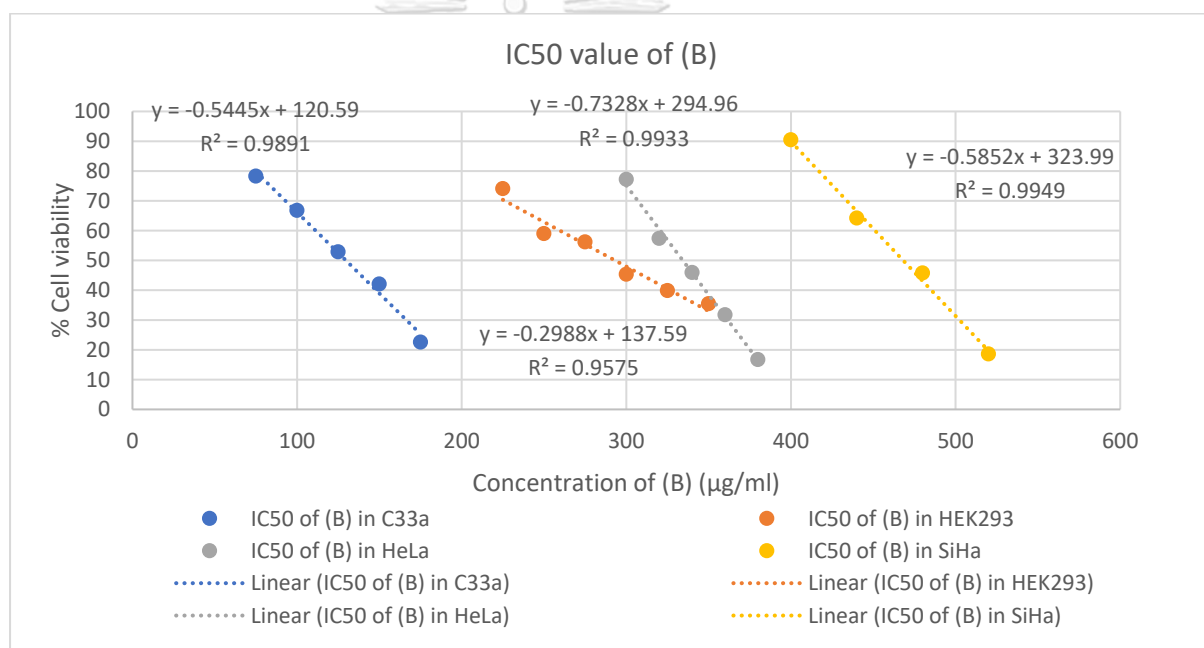


รูปที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดลงระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

สารสกัดสูตรตำรับ B มีค่า IC_{50} ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa เท่ากับ 129.64 293.14 334.28 และ 468.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B ในรูปที่ 21 จากผลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ B มีความเป็นพิษต่อเซลล์ C33a มากที่สุดตามด้วย HEK293 HeLa และ SiHa ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงค่า IC_{50} สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตรตำรับ B ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

Cell type	50% inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation ($y=mx+c$)	R-squared
C33a	129.64	$y=-0.5445x+120.59$	0.9891
HEK293	293.14	$y=-0.2988x+137.59$	0.9575
HeLa	334.28	$y=-0.7328x+294.96$	0.9933
SiHa	468.20	$y=-0.5852x+323.99$	0.9949

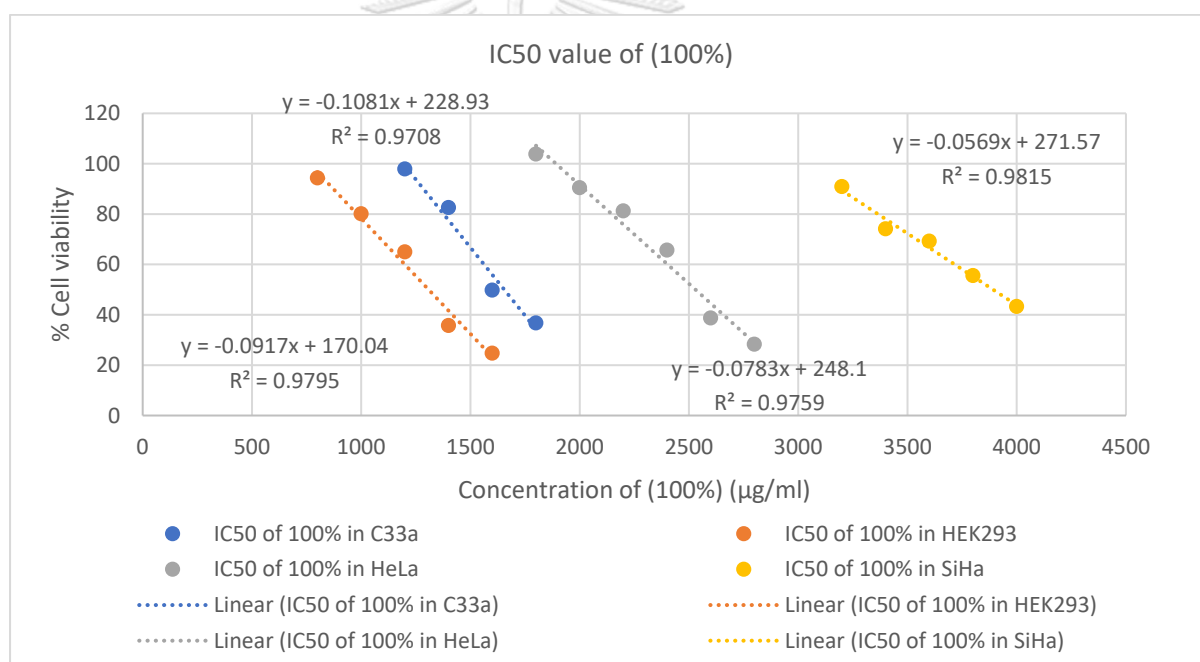


รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดลงระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ B ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

ในส่วนสารสกัดอีกหนึ่งสูตรหรือสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานนั้นมีค่า IC_{50} ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa เท่ากับ 1,655.23 1,308.72 2,530.01 และ 3,894.02 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งได้คำนวณจากสมการจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ และความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานดังแสดงในรูปที่ 22 จากการศึกษาในส่วนนี้ทำให้ทราบว่าสารสกัดสูตรนี้มีความเป็นพิษกับเซลล์ HEK293 มากที่สุดตามด้วย C33a HeLa และ SiHa ตามลำดับ

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC₅₀ สมการการลดลง และค่า R-squared ของสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

Cell type	50% inhibitory concentration (µg/ml)	Regression equation (y=mx+c)	R-squared
C33a	1,655.23	y=-0.1081x+228.93	0.9708
HEK293	1,308.72	y=-0.0917x+170.04	0.9795
HeLa	2,530.01	y=-0.0783x+248.1	0.9759
SiHa	3,894.02	y=-0.0569x+271.57	0.9815



รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ และสมการการลดลงระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน ในเซลล์ C33a HEK293 HeLa และ SiHa

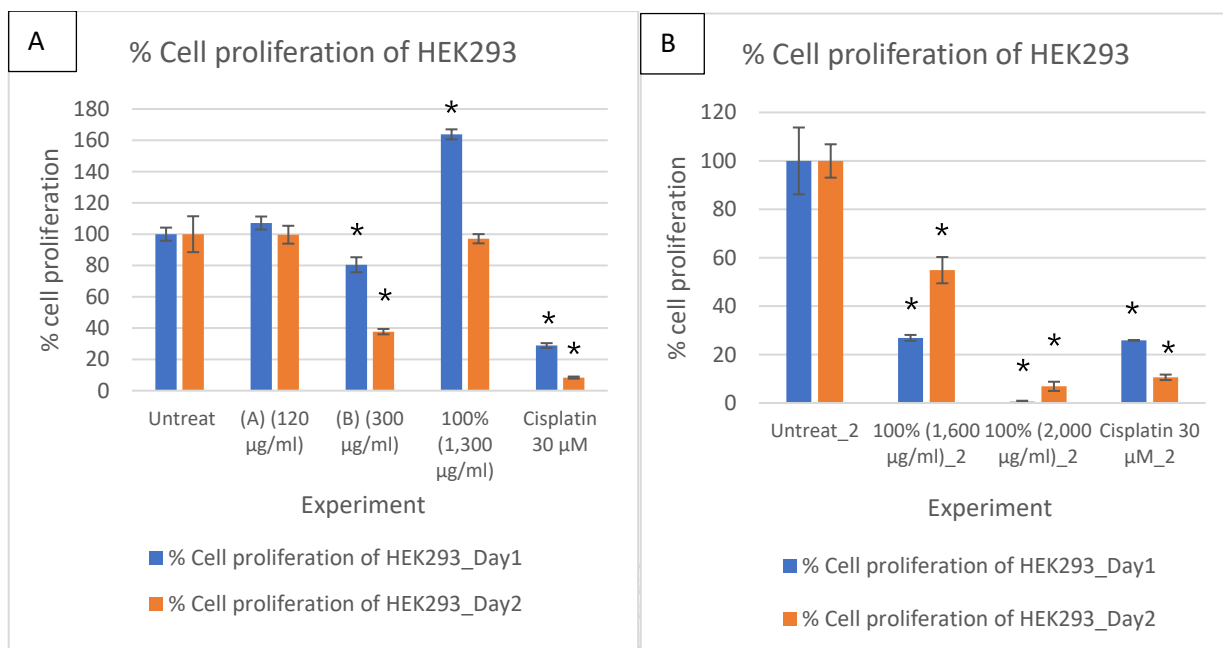
4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation Study)

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าเมื่อนำสารสกัดสูตรต่างๆ ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC₅₀ มาทดสอบกับเซลล์แต่ละชนิดเป็นเวลา 1 และ 2 วัน นั้นในชุดการทดลองที่เซลล์ HEK293 C33a และ SiHa ถูกทดสอบด้วยสารสกัด พบว่าในสารสกัดบางสูตรที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับค่า IC₅₀ มีค่า % cell proliferation ที่ลดลง ในส่วนของการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ในเซลล์

HeLa นั้นไม่สามารถแปลผลได้ โดยผลการทดลองในส่วนนี้จะแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อย่อยตามชนิดเซลล์ดังต่อไปนี้

4.3.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A สูตรตำรับ B และสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 120 300 และ 1,300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ พบว่าเมื่อเซลล์ HEK293 ผ่านการทดสอบกับสารสกัดเหล่านี้เป็นเวลา 1 วันนั้นมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ (% cell proliferation) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เซลล์ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (ชุดควบคุม) เท่ากับ 107.16 ± 8.28 80.46 ± 9.62 และ $163.81 \pm 6.40\%$ ตามลำดับ อีกทั้งค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานในส่วนนี้มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 และเมื่อผ่านการทดสอบ 2 วันมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 เท่ากับ 99.67 ± 11.42 37.72 ± 3.43 และ $97.10 \pm 5.90\%$ ซึ่งในชุดการทดลองของสารสกัดสูตรตำรับ B หลังจากเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเป็นเวลา 2 วันนั้นมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 23(A) ซึ่งก่อนการศึกษาในส่วนนี้ได้มีการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัดสูตรต่างๆ อีกครั้งเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานนั้นได้มีการเสื่อมสลายเกิดขึ้นส่งผลให้ค่า IC_{50} ที่ใช้ในเซลล์ชนิดต่างๆ มีค่าที่สูงขึ้นจึงได้มีการทำการทดสอบในส่วนนี้เพิ่มเติมด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมาน ซึ่งในเซลล์ HEK293 ได้เพิ่มจาก 1,300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เป็นค่า IC_{50} ที่คำนวณได้จากการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ในเซลล์ HEK293 เป็น 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเมื่อทำการทดสอบกับเซลล์ HEK293 นั้นส่งผลให้มีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 26.89 ± 2.44 และ $0.56 \pm 0.78\%$ เมื่อเซลล์ผ่านการทดสอบกับสารสกัดเป็นเวลา 1 วัน และเมื่อเซลล์ผ่านการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นเวลา 2 วันพบว่ามีค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 54.87 ± 10.86 และ $6.89 \pm 3.82\%$ ซึ่งค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรมีความแตกต่าง กับค่าร้อยละของการเจริญเติบโตในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 23(B)



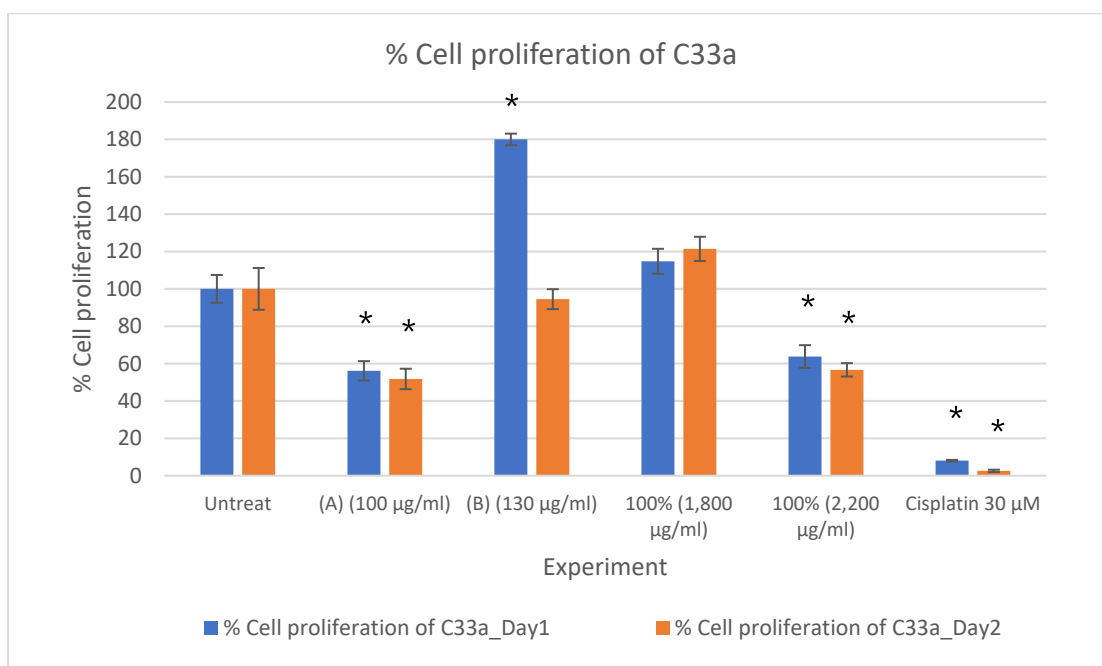
รูปที่ 23 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HEK293 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% ให้ดกระถินพิมานเป็นเวลา 1 และ 2 วัน

โดยที่ (A) กราฟแสดงค่า % cell proliferation ของเซลล์ HEK293 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A สูตรตำรับ B และ 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 120 300 และ 1,300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) กราฟแสดงค่า % cell proliferation ของเซลล์ HEK293 เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของ % cell proliferation เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

4.3.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 100 และ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ซึ่งเท่ากับ 1,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเซลล์ C33a ผ่านการทดสอบกับสารสกัดเหล่านี้เป็นเวลา 1 วันนั้นมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เท่ากับ 56.13 ± 10.32 180.00 ± 6.21 114.75 ± 13.39 และ $63.78 \pm 12.19\%$ และเมื่อเซลล์ C33a ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดเหล่านี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 2 วันจะมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ เท่ากับ

51.79±10.95 94.50±10.66 121.39±12.98 และ 56.67±7.18% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ในชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A ในวันที่ 1 และ 2 ชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ในวันที่ 1 และชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 และ 2 วันนั้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ในชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 24



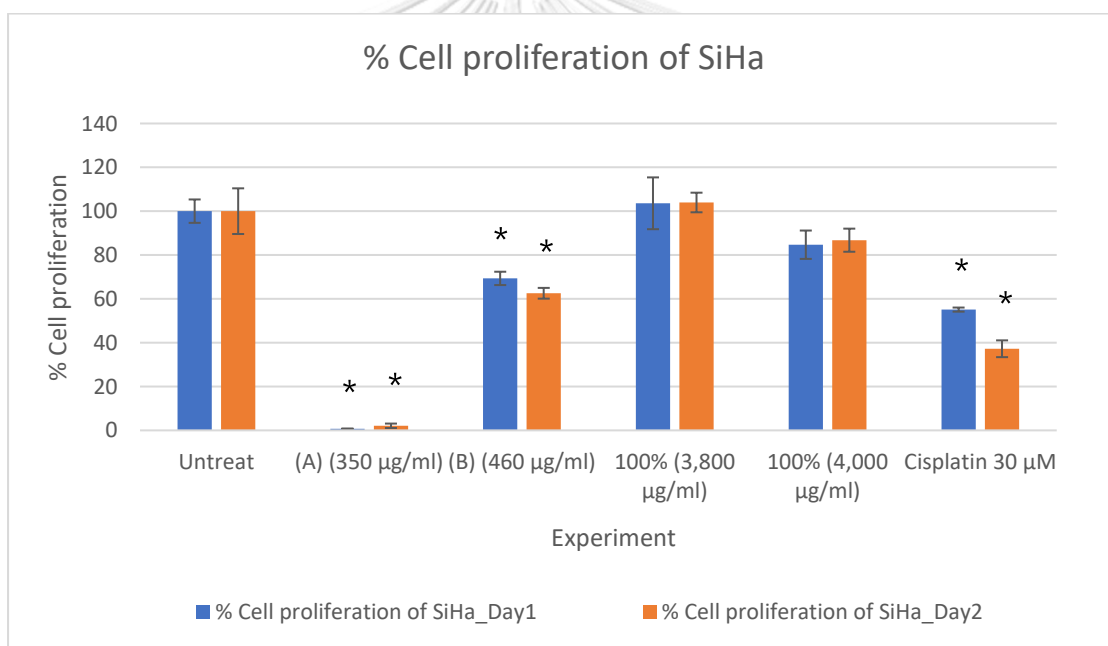
รูปที่ 24 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ C33a เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 1 และ 2 วัน

ซึ่งกราฟในรูปที่ 24 แสดงค่า % cell proliferation ของเซลล์ C33a เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 100 และ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 1,800 และ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของ % cell proliferation เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

4.3.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ได้แก่ 350 และ 460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และสูตร 100%

เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ซึ่งเท่ากับ 3,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเซลล์ SiHa ผ่านการทดสอบกับสารสกัดเหล่านี้เป็นเวลา 1 วันนั้นมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.74 ± 0.23 69.33 ± 6.08 103.59 ± 23.63 และ $84.70 \pm 12.94\%$ และเมื่อเซลล์ SiHa ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดเหล่านี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 2 วันจะมีความร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์เท่ากับ 2.10 ± 2.02 62.55 ± 4.90 103.96 ± 8.95 และ $86.76 \pm 10.54\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ในชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ทั้งในวันที่ 1 และ 2 วันหลังการทดสอบด้วยสารสกัดนั้นมีความแตกต่างกับค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 25

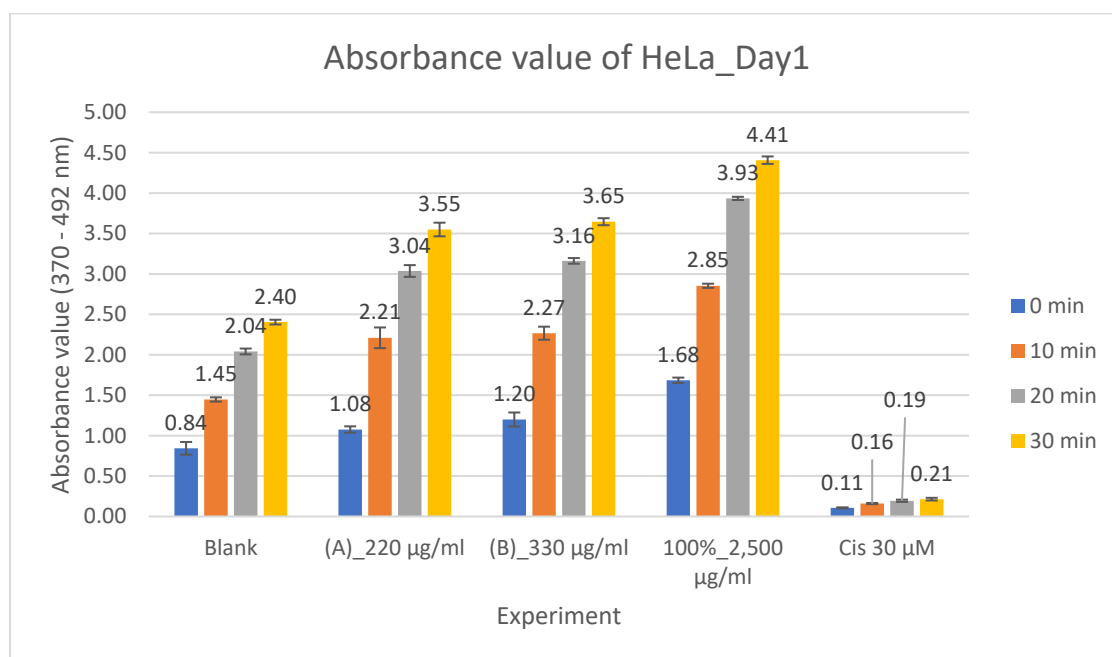


รูปที่ 25 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ SiHa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 1 และ 2 วัน

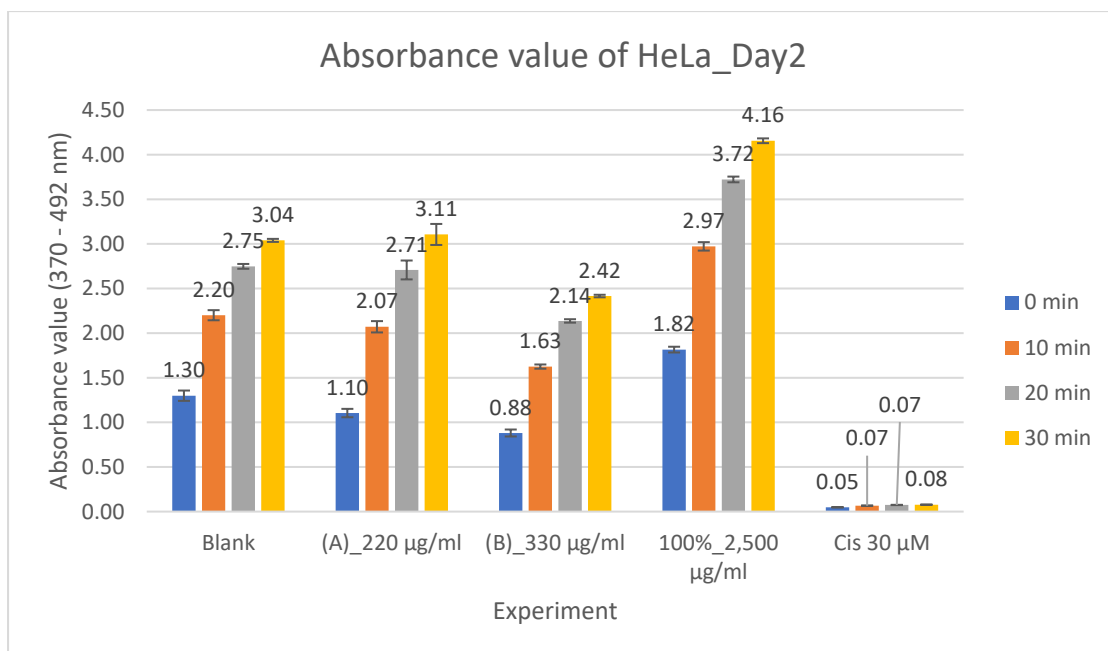
โดยกราฟในรูปที่ 25 แสดงค่า % cell proliferation ของเซลล์ SiHa เมื่อทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} คือ 350 และ 460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้น 3,800 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของ % cell proliferation เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

4.3.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa

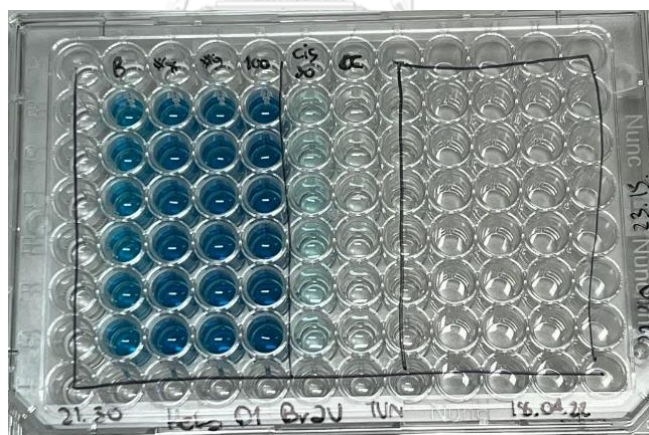
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa นั้นไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่มากส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ทุกๆ 10 นาทีจนครบ 30 นาที ในขั้นตอนสุดท้าย มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 26 และ 27 อีกทั้งเมื่อเวลายังผ่านไปมากยิ่งไม่สามารถบอกความต่างระหว่างชุดการทดลองได้ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 26 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa ที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (blank) เซลล์ HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B สูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน



รูปที่ 27 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของเซลล์ HeLa ที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (blank) เซลล์ HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B สูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน



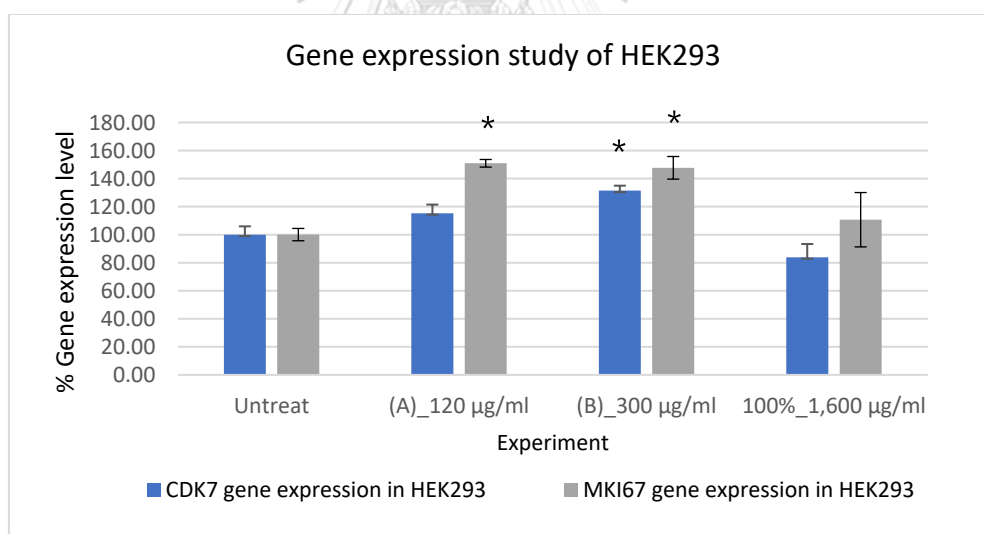
รูปที่ 28 เพลทขนาด 96-well ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa ด้วยวิธี BrdU assay

4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* *MKI67* และ *IL1RN* (gene expression study)

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* *MKI67* และ *IL1RN* ของสารสกัดแต่ละสูตรในเซลล์ HEK293 C33a SiHa และ HeLa นั้นมีระดับการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ที่แตกต่างกันออกไป แต่สำหรับการแสดงออกของยีน *IL1RN* ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแปลผลได้ ซึ่งรายละเอียดทั้งหมดมีดังต่อไปนี้

4.4.1 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ HEK293

จากการศึกษาในเซลล์ HEK293 พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *CDK7* เท่ากับ 115.28 ± 10.72 131.40 ± 6.14 และ $83.36 \pm 16.42\%$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} นั้นมีค่าร้อยละของระดับการแสดงออกของยีน *CDK7* มีความแตกต่างกับค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ในส่วนของการแสดงออกของยีน *MKI67* ในเซลล์ HEK293 นั้นมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดตำรับ A B และ 100% เห็นกระถินพิมานเท่ากับ 150.93 ± 4.93 147.72 ± 13.95 และ $110.66 \pm 33.57\%$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อีกทั้งยังพบว่าค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *MKI67* ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} มีความแตกต่างจากค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 29

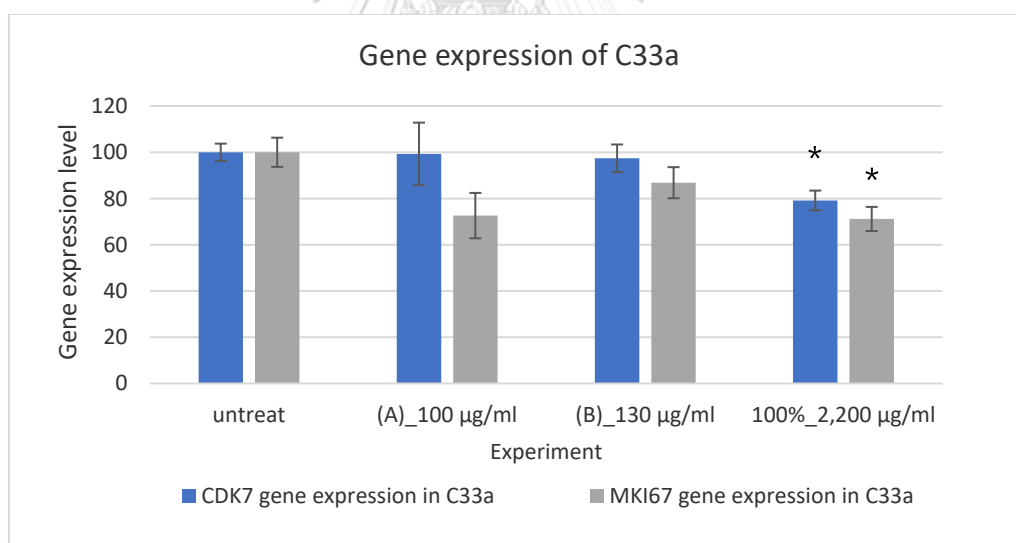


รูปที่ 29 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน *CDK7* และ *MKI67* ของเซลล์ HEK293 เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน

โดยทำการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการควบคุม (untreat) (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละการแสดงออกของยีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) ที่ P-value = 0.05)

4.4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ C33a

ผลการศึกษาในส่วนนี้ของเซลล์ C33a พบว่ามีการแสดงออกของยีน *CDK7* เมื่อเซลล์ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ 100% ให้ได้ระดับปริมาณที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนเท่ากับ 99.28 ± 23.46 99.39 ± 10.36 และ $79.17 \pm 7.40\%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อีกทั้งเมื่อนำผลการศึกษาในส่วนนี้ไปทดสอบทางสถิติพบว่าค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *CDK7* ในชุดการทดลองสูตร 100% ให้ได้ระดับปริมาณนั้นมีความแตกต่างจากค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value เท่ากับ 0.05 ในส่วนของการแสดงออกของยีน *MKI67* นั้นมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนเท่ากับ 72.61 ± 16.99 86.84 ± 11.64 และ $71.17 \pm 9.04\%$ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่า ชุดการทดลองสูตร 100% ให้ได้ระดับปริมาณนั้นมีความแตกต่างจากค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 เช่นเดียวกันกับยีน *CDK7* ดังแสดงในรูปที่ 30



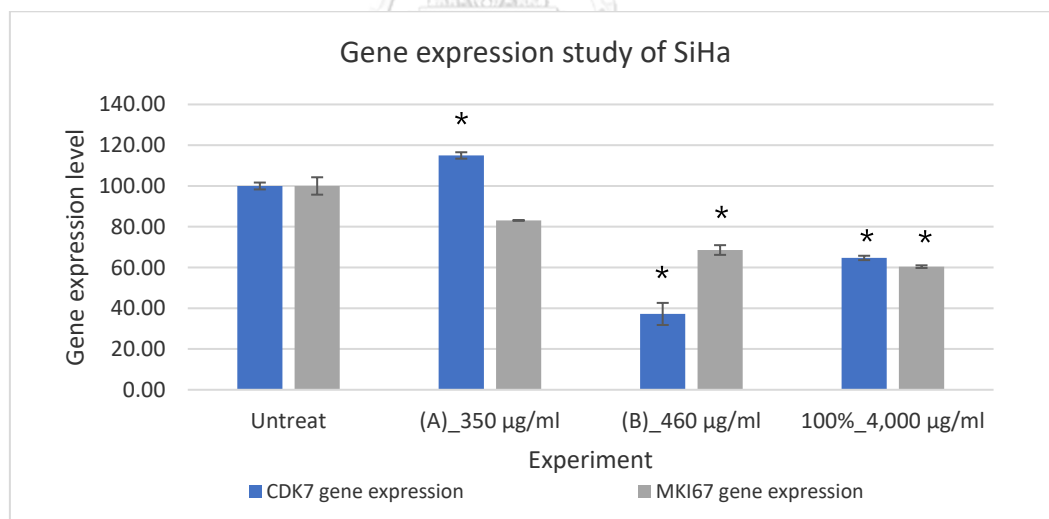
รูปที่ 30 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน *CDK7* และ *MKI67* ของเซลล์ C33a เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% ให้ได้ระดับปริมาณเป็นเวลา 2 วัน

โดยทำการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และสูตร 100% ให้ได้ระดับปริมาณที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละการ

แสดงออกของยีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เซลล์ไม่ผ่านการทดสอบกับสารสกัด (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

4.4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ SiHa

จากการศึกษาพบว่าเซลล์ SiHa นั้นเมื่อผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เห็นระดับปริมาณมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *CDK7* เท่ากับ 114.97 ± 2.72 37.21 ± 9.39 และ $64.69 \pm 1.85\%$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อนำค่าดังกล่าวทั้ง 3 ค่ามาทดสอบทางสถิติพบว่า ค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *CDK7* ในชุดการทดลองทั้งหมด ประกอบไปด้วยสูตรตำรับ A B และ 100% เห็นระดับปริมาณมีความแตกต่างจากค่าร้อยละการแสดงออกของยีน *CDK7* ในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 และมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *MKI67* เท่ากับ 83.09 ± 0.20 68.57 ± 4.12 และ $60.41 \pm 1.12\%$ ตามลำดับ โดยเมื่อทำการทดสอบความแตกต่างด้วยวิธีทางสถิติพบว่า ค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *MKI67* ใน SiHa ของชุดการทดลองสารสกัดสูตรตำรับ B และ 100% เห็นระดับปริมาณนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 31



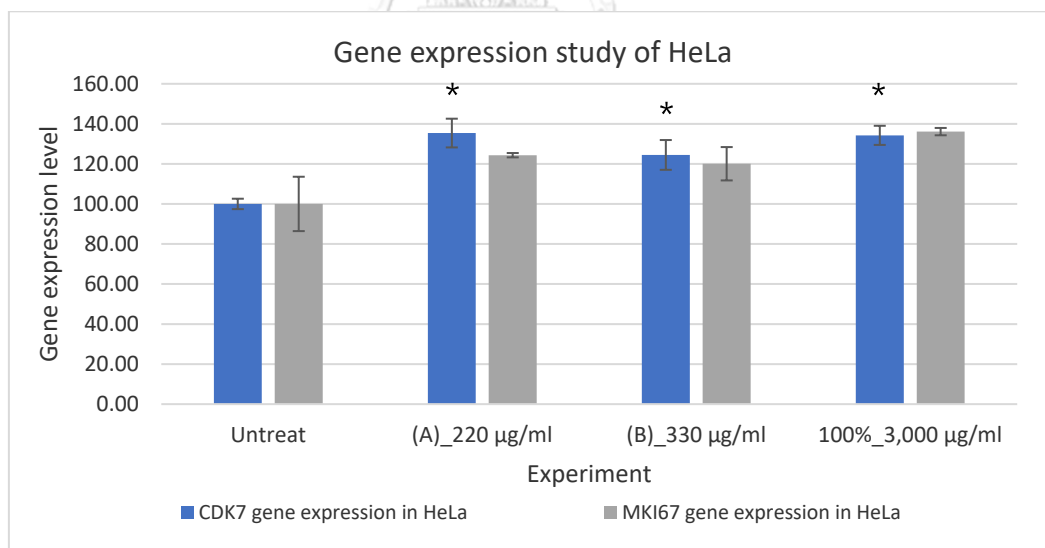
รูปที่ 31 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน *CDK7* และ *MKI67* ของเซลล์ SiHa เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นระดับปริมาณเป็นเวลา 2 วัน

โดยทำการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ 100% เห็นระดับปริมาณที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreat) (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของ

การแสดงออกของยีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เซลล์ไม่ผ่านการทดสอบกับสารสกัด (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

4.4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ HeLa

การศึกษาในส่วนนี้พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และ 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นส่งผลให้การแสดงออกของยีน *CDK7* มีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 135.39 ± 12.43 124.47 ± 12.89 และ $134.25 \pm 8.28\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *CDK7* ของทั้ง 3 ชุดการทดลองไปทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกับค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *CDK7* ในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 และเช่นเดียวกันในยีน *MKI67* ที่มีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 124.34 ± 1.88 120.07 ± 14.43 และ $136.11 \pm 3.16\%$ ตามลำดับ แต่เมื่อนำไปทดสอบทางสถิติพบว่าค่าร้อยละของการแสดงออกของยีน *MKI67* ใน HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 3 สูตรนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุมที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ดังแสดงในรูปที่ 32



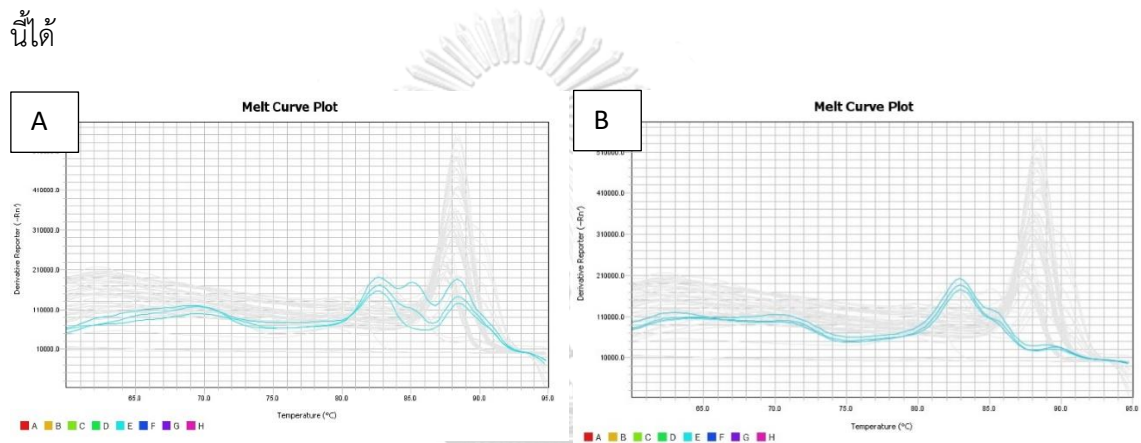
รูปที่ 32 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออก และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของยีน *CDK7* และ *MKI67* ของเซลล์ HeLa เมื่อผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 วัน

โดยทำการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

(untreat) (*: ชุดการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย % การแสดงออกของยีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เซลล์ไม่ผ่านการทดสอบกับสารสกัด (untreat) ที่ P-value เท่ากับ 0.05)

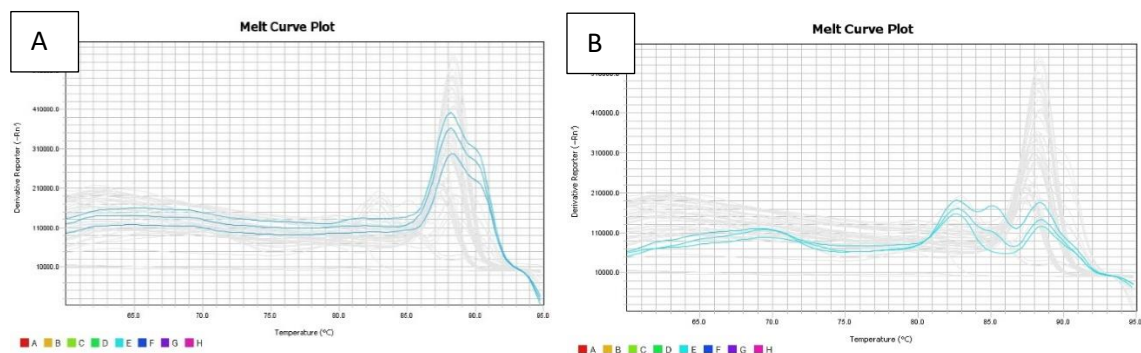
4.4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *IL1RN*

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *IL1RN* ในทุกชนิดเซลล์ในการศึกษานี้ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากลักษณะ melting curve ที่ได้จากการทำ real-time PCR ซึ่งแสดงถึงลักษณะของ PCR product มีจำนวนพีคหลายพีค และตำแหน่งของพีคในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 33-40 ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *IL1RN* ในการศึกษาครั้งนี้ได้



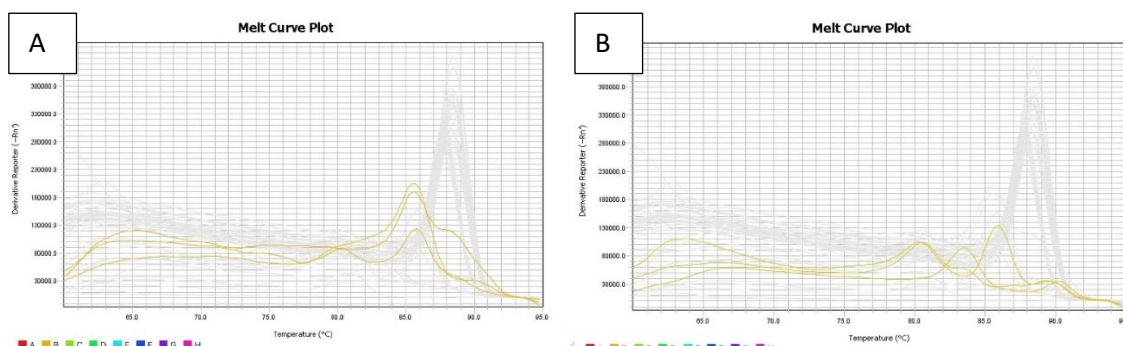
รูปที่ 33 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ HEK293 เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ HEK293 (A) เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดและ (B) ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.



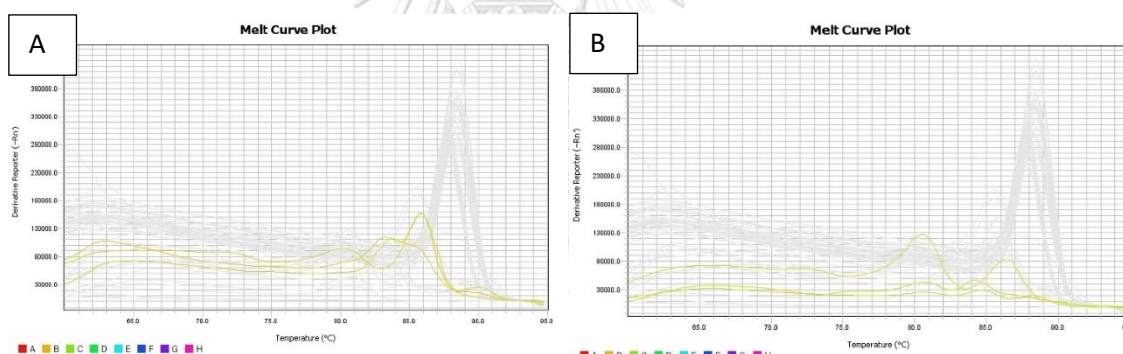
รูปที่ 34 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ HEK293 เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระฉิบพินาน

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ HEK293 (A) เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และ (B) สารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน



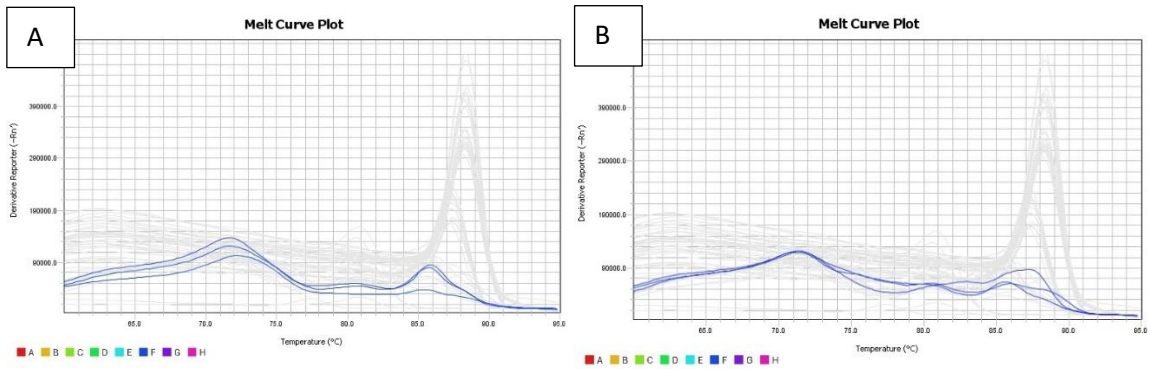
รูปที่ 35 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ C33a เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ C33a (A) เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดและ (B) ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.



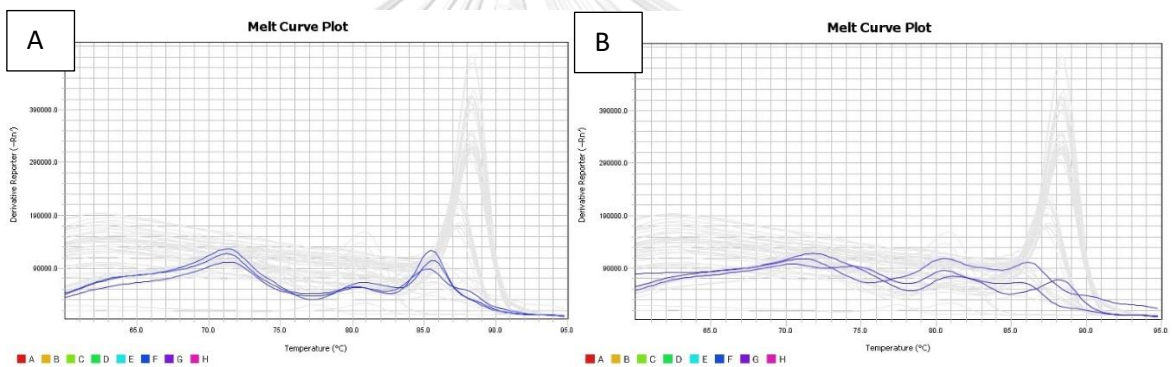
รูปที่ 36 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ C33a เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ C33a (A) เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และ (B) สารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน



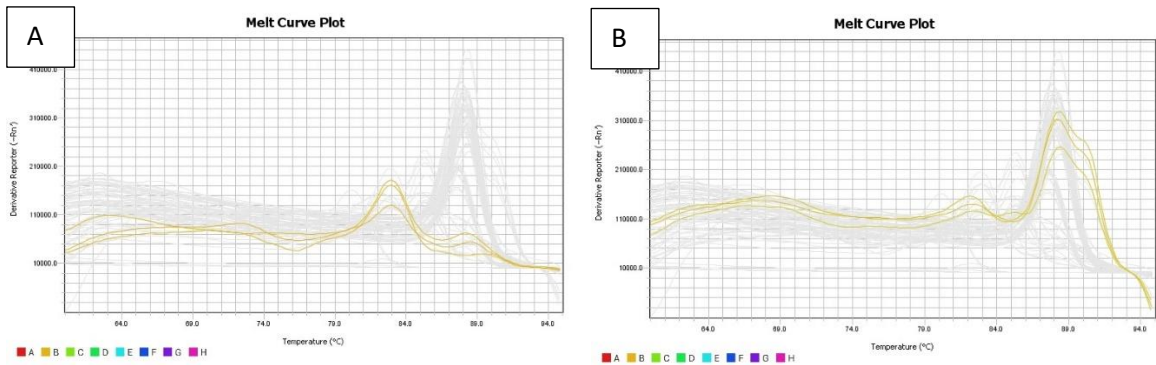
รูปที่ 37 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ SiHa เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ SiHa (A) เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดและ (B) ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.



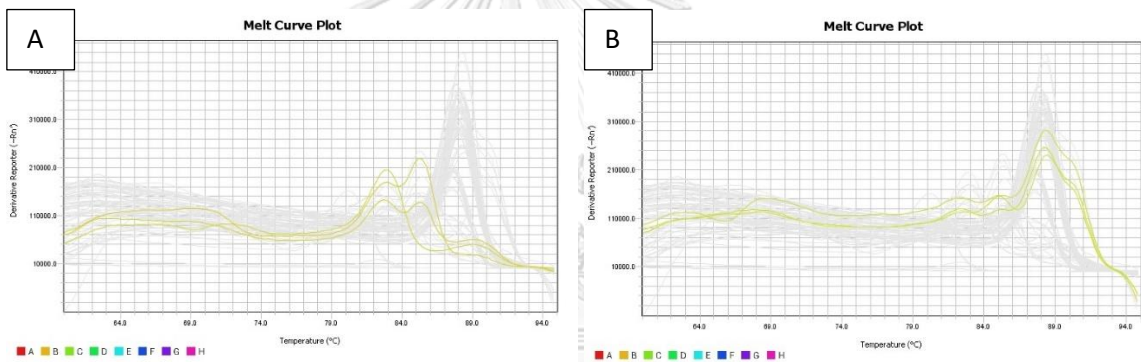
รูปที่ 38 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ SiHa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระฉิบพิมาน

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ SiHa (A) เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และ (B) สารสกัดสูตร 100% เห็นกระฉิบพิมาน



รูปที่ 39 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ HeLa เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัด และถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ HeLa (A) เมื่อไม่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดและ (B) ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A.



รูปที่ 40 กราฟ melting curve ของยีน *IL1RN* ในเซลล์ HeLa เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน

โดยกราฟ melting curve คือการแสดงออกของยีน *IL1RN* ของเซลล์ HeLa (A) เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และ (B) สารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมาน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ความเข้มข้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัด สูตรตำรับ A B และ 100% เติดกระถินพิมาน

จากผลการศึกษาในส่วนดังกล่าวทำให้พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A B และ สูตร 100% เติดกระถินพิมานนั้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 5.04 11.93 และ 46.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีความแตกต่างกันมากเป็นผลมาจากความละเอียดของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันโดยสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ความละเอียดของตัวอย่าง 100% เติดกระถินพิมานมีความละเอียดที่สูงที่สุด ตามมาด้วยสูตรตำรับ B และ A เมื่อใช้ปริมาณของตัวอย่างที่เท่ากัน และเวลาในการสกัดที่เท่ากันจึงส่งผลให้ความเข้มข้นของสารสกัดมีความแตกต่างกัน

ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบฟีนอลในสารสกัดแต่ละสูตรที่มีความแตกต่างกันเป็นผลมาจากองค์ประกอบที่ต่างกันจะเห็นได้ว่าสารสกัด 100% เติดกระถินพิมานมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรตำรับ A และ B เนื่องจากมีปริมาณเติดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบที่สูงกว่า ตัวอย่างสูตรตำรับ A และ B ที่มีปริมาณเติดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบเพียง 30% ทั้งนี้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสารสกัดสูตรตำรับ A และ B มีความเป็นไปได้ที่จะมาจากองค์ประกอบอื่นนอกเหนือจากเติดกระถินพิมาน ในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลนั้น สารสกัดทั้ง 3 สูตรมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันแต่ในสารสกัดสูตรตำรับ B จะมีมากกว่าอีก 2 สูตรเล็กน้อยในทำนองเดียวกันสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดสูตรตำรับ A และ B มีความเป็นไปได้ที่จะได้มาจากองค์ประกอบอื่นนอกจากเติดกระถินพิมาน

5.2 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

การศึกษาในส่วนนี้ทำให้พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A B และ 100% เติดกระถินพิมานสามารถลดค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ HEK293 C33a SiHa และ HeLa ได้เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่ช่วงของความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเซลล์ และสูตรของสารสกัด และเมื่อนำช่วงของความเข้มข้นเหล่านี้มาคำนวณค่า 50% inhibitory concentration (IC₅₀) สามารถประเมินระดับความเป็นพิษหรือความสามารถในการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัดได้ ซึ่งในสารสกัดสูตรตำรับ A มีความเป็นพิษต่อเซลล์ C33a มากที่สุดตามมาด้วย HEK293 HeLa และ SiHa สารสกัดสูตรตำรับ B มีความเป็นพิษต่อเซลล์ C33a มากที่สุดตามด้วย HEK293 HeLa และ SiHa เช่นเดียวกันกับสารสกัดสูตรตำรับ B ในส่วนของสารสกัด 100% เติดกระถินพิมานนั้นมีความ

เป็นพิษต่อเซลล์ HEK293 มากที่สุดตามด้วย C33a HeLa และ SiHa นอกจากนี้แล้วจากการศึกษาในส่วนนี้ทำให้พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบพินอลจากเห็ดมีผลต่อการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์ C33a HeLa และ SiHa และยังมีองค์ประกอบอื่นอีกเช่น พอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดสูตรตำรับ A และ B สารประกอบพินอลในสารสกัด A และ B ที่ได้จากองค์ประกอบอื่นในตัวอย่างสูตรตำรับ A และ B ก็มีผลต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ดังกล่าวเช่นเดียวกัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าเป็นผลมาจากองค์ประกอบใดเป็นหลัก ทั้งนี้อาจมีสารเคมีอื่นอีกนอกเหนือจากพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบพินอลในสารสกัดสูตรตำรับ A และ B อาจมีฤทธิ์ในการลดการมีชีวิตของเซลล์ C33a HeLa และ SiHa ที่เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้ง 3 สูตรนั้นยังคงมีความเป็นพิษกับเซลล์ปกติอย่าง HEK293 ในระดับที่สูงซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์ HEK293 เป็น epithelial cell ที่ได้จากเอมบริโอของคนเพราะฉะนั้นแล้วจะมีความไว (sensitivity) ต่อสารที่ทดสอบกว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ถ้าหากจะทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติยังมีตัวเลือกอื่นที่น่าสนใจ เช่น เซลล์ HK-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากไตของคนที่อยู่ในช่วงผู้ใหญ่ และเซลล์ไลน์นี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ หรือจะเป็นในส่วน of เซลล์ HaCaT ซึ่งเป็นเซลล์เคราติโนไซต์ของคนที่เป็นที่นิยมในการใช้เปรียบเทียบความเป็นพิษของสาร เช่นในการศึกษาของ Kaplum et al., 2018 ที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของ proanthocyanidin polymer ที่พบใน *Stryphnodendron adstringens* กับเซลล์มะเร็งปากมดลูกอย่าง C33a SiHa และ HeLa โดยใช้ HaCaT เซลล์เป็นเซลล์ปกติในการเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษ

5.3 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์

การศึกษากการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นจะมีการศึกษา 2 ช่วงเวลาด้วยกันได้แก่ 1 และ 2 วัน หลังจากเซลล์ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ที่ได้จากการศึกษาในส่วนของการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยการทดสอบสารสกัดกับเซลล์เป็นเวลา 2 วันด้วยกัน ในการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นในขั้นตอนแรกนั้นจำเป็นต้องใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการผสมกับ BrdU และเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 18 ชั่วโมงเพราะฉะนั้นแล้วจากสมมติฐานการใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ในการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์หลังจากเวลาผ่านไป 2 วัน จำนวนเซลล์ในขั้นตอนการ labeling with BrdU หรือจุดเริ่มต้นของการวัดการเจริญเติบโต จำนวนเซลล์เริ่มต้นของชุดการทดลองที่เซลล์ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (ชุดการทดลอง) จะน้อยกว่าชุดการทดลองที่เซลล์ไม่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัด (ชุดควบคุม) ด้วยเหตุนี้เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นของการศึกษากการ

เจริญเติบโตที่ต่างกัน ผลของการเจริญเติบโต หรือค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ในชุดการทดลองจะมีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะมีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุม จึงได้มีการเพิ่มการศึกษาในส่วนของ การเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผ่านการทดสอบที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} เป็นเวลา 1 วันเพื่อที่จะได้ข้อมูลการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วงก่อนที่จะถึงเวลาที่สารสกัดทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในชุดทดลองลดลงเหลือ 50%

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และสูตรเห็ดกระถินพิมานที่ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ได้ทั้งในชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเป็นเวลา 1 และ 2 วัน จากผลการศึกษาในส่วนนี้ หมายความว่าการที่ระดับการมีชีวิตของเซลล์ HEK293 มีการลดลงเมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B และสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานนั้นมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เป็นผลมาจากสารสกัดทั้ง 2 สูตรที่ระยะเวลา 2 วันหลังจากเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัด ถ้าหากสังเกตค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของวันที่ 1 และ 2 หลังจากการทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 2 สูตรนั้นมีความแตกต่างกันคือ ในสารสกัดสูตรตำรับ B ค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ของวันที่ 1 หลังการทดสอบจะมากกว่าวันที่ 2 แต่ในสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานวันที่ 2 มีค่ามากกว่าวันที่ 1 ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สารสกัดสูตรตำรับ B มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ได้นานกว่าสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน หรือเซลล์ HEK293 จะมีความไวต่อสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานมากกว่าสูตรตำรับ B ทำให้ค่าร้อยละของการเจริญเติบโตในวันที่ 1 ของชุดการทดลองสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานนั้นมีค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ที่ต่ำแสดงว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มาก แต่เมื่อเข้าสู่ในวันที่ 2 ปริมาณของสารที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตในสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานเหลือในปริมาณที่น้อยลงทำให้ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตส่งผลให้ค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 2 จึงสูงขึ้นกว่าในวันที่ 1 หลังการทดสอบกับสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมาน อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A นั้นมีค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้ง 2 วันแสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตรตำรับ A เท่ากับค่า IC_{50} นั้นไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 เพราะฉะนั้นการลดลงของระดับการมีชีวิตของเซลล์ HEK293 ที่ความเข้มข้นดังกล่าวในสารสกัดสูตรตำรับ A นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งเจริญเติบโตของเซลล์

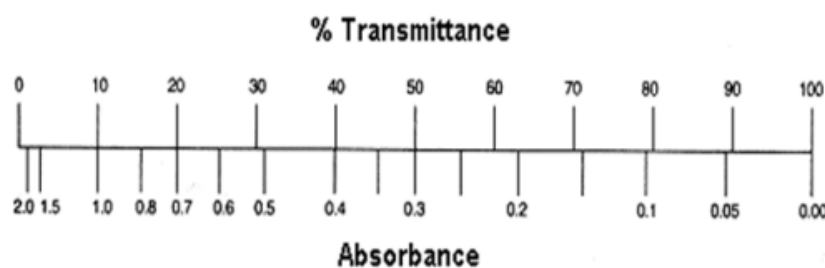
แต่อาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกอย่างอื่นที่ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั้นมีการลดลงเช่นการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการ apoptosis ขึ้นเป็นต้น

ในส่วนของการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ในเซลล์ C33a พบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} และสูตร 100% ให้ผลกระทบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีค่าร้อยละการเจริญเติบโตในวันที่ 1 และ 2 หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดมีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุม นั่นหมายถึงที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูตร A เท่ากับค่า IC_{50} และที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรของสารสกัดสูตร 100% ให้ผลกระทบที่การลดลงของจำนวนเซลล์ C33a ที่มีชีวิตที่เกิดขึ้นในการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารสกัดทั้ง 2 สูตรนี้ นอกจากนี้การที่ค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a นั้นลดลงทั้งวันที่ 1 และ 2 หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 2 สูตรนั้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสูตรตำรับ A และสารสกัดสูตร 100% ให้ผลกระทบที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ได้ทั้งในระยะเวลา 1 และ 2 วันหลังจากการทดสอบกับเซลล์ C33a ในส่วนของสารสกัดสูตรตำรับ B ค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ในวันที่ 1 มีค่าสูงถึง 180% ซึ่งมากกว่าชุดการควบคุมเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้จึงสามารถอนุมานได้ว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} ของสารสกัดสูตรตำรับ B จะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ให้มากขึ้น หลังจากเซลล์ผ่านการทดสอบกับสารสกัดสูตรตำรับ B เป็นเวลา 1 วัน อีกทั้งในวันที่ 2 หลังจากเซลล์ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรดังกล่าวค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a มีค่าเท่ากับ 94.50% ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม และจากผลตรงส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ C33a ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ใน SiHa พบว่าในสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} นั้นสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ได้ทั้ง 1 และ 2 วันหลังการทดสอบเซลล์ด้วยสารสกัด แสดงให้เห็นว่าการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ SiHa ในชุดทดลองของสารสกัดสูตรตำรับ A และ B ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า IC_{50} นั้นมีความเกี่ยวข้องกับความความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ของสารสกัดทั้ง 2 สูตร แต่ผลการศึกษาในชุดการทดลองของสารสกัดสูตร 100% ให้ผลกระทบที่ความเข้มข้นนั้นถึงแม้ว่าจะสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ได้ทั้งวันที่ 1 และ 2 หลังจากเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดก็ตาม แต่เมื่อนำค่าร้อยละของการเจริญเติบโตในทั้ง 2 มาทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าร้อยละของการ

เจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ในชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัด 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมที่ค่า P-value เท่ากับ 0.05 ในทั้ง 2 วันของการศึกษา เพราะฉะนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ SiHa ในชุดการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% เห็นกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ใน HeLa นั้นไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาที่วัดผล (วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 10 นาที จนครบ 30 นาที) เป็นผลมาจากจำนวนของเซลล์ HeLa ที่มาก เนื่องจาก HeLa เป็นเซลล์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าอีก 3 เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่งผลให้เมื่อเราเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นเท่ากับที่ 3,000 เซลล์ต่อหลุมนั้น ค่าการดูดกลืนแสงในชุดการทดลองของเซลล์ HeLa จะมีค่าสูงกว่าเซลล์อื่น อีกทั้งค่าการดูดกลืนแสงที่สูงนั้นหากนำไปคำนวณผลที่ได้จากการคำนวณจะเกิดความผิดพลาดขึ้นในการแปลผลเนื่องมาจากค่าการดูดกลืนแสงนั้นสามารถคำนวณได้จากค่าของปริมาณของแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างที่เครื่องวัดได้ (Transmittance value: T) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงคือ ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ $\log(1/T)$ เพราะฉะนั้นแล้วยิ่งค่าการดูดกลืนแสงมีค่ามากกว่า 1 ขึ้นไปนั้นช่วงของค่า T ที่เครื่องวัดได้จะยิ่งแคบลง และยิ่งเข้าใกล้ 0 มากขึ้น (Ramadhani et al., 2019) ดังแสดงในรูปที่ 41 ทำให้เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่มากไปคำนวณแล้วอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผล เพราะฉะนั้นแล้วการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ใน HeLa ด้วยวิธี BrdU assay นั้นจึงไม่เหมาะกับการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 3,000 เซลล์ต่อหลุม ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพลท 96-well



รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ ค่าร้อยละของแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่าง

5.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* *MKI67* และ *IL1RN*

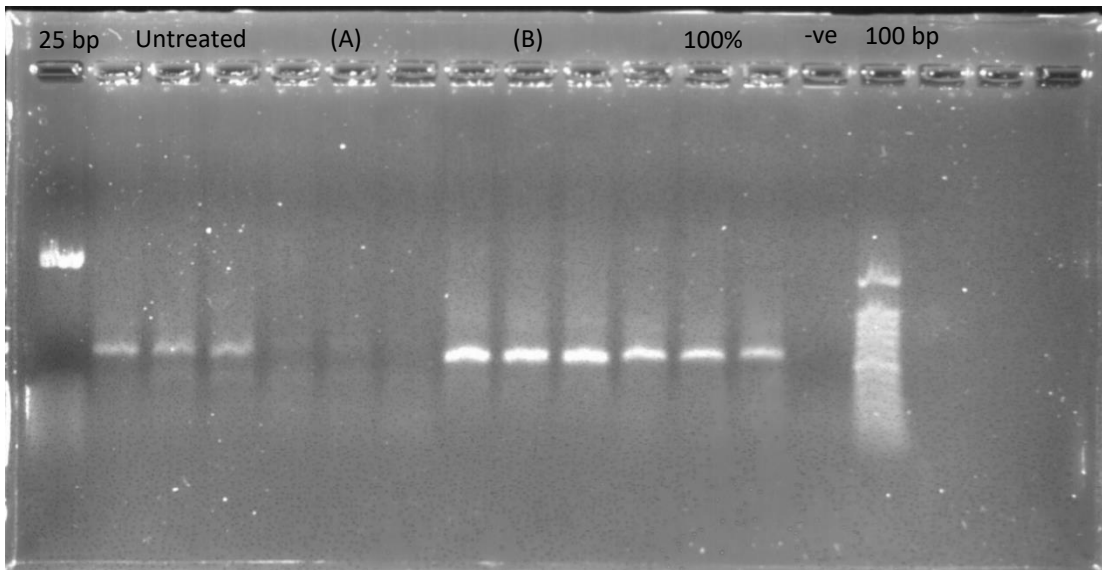
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* พบว่าในสารสกัดสูตรตำรับ A นั้น การยับยั้งการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นโดยสารสกัดดังกล่าวในเซลล์อย่าง C33a และ SiHa นั้นพบว่ามี การแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ที่ไปในทิศทางเดียวกันคือการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ยีนในทั้ง 2 ชนิดของเซลล์นั้นไม่ได้มีการลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีนทั้ง 2 ยีนในชุดควบคุม ซึ่งหน้าที่การทำงานของยีน *CDK7* นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยผ่านกระบวนการ T-loop phosphorylation ด้วยเหตุนี้การที่ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกที่ลดลง จึงมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ในทำนองเดียวกันถึงแม้ว่าหน้าที่ การทำงานของยีน *MKI67* กับการเจริญเติบโตของเซลล์และการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์นั้นจะยังไม่ เป็นที่ชัดเจนแต่มีการศึกษาพบว่า การยับยั้งการทำงานของ mRNA ของโปรตีน Ki-67 นั้นส่งผลทำให้ กระบวนการการสังเคราะห์ DNA (DNA synthesis) ในเซลล์นั้นถูกยับยั้งเช่นเดียวกัน (Schluter et al., 1993) เพราะฉะนั้นการที่การแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* นั้นมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น หรือไม่มีความแตกต่างจากการแสดงออกในชุดควบคุมนั้นจึงหมายถึงการยับยั้งการแสดง การเจริญเติบโตของสารสกัดสูตรตำรับ A ในเซลล์ C33a และ SiHa นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีนทั้ง 2

จากผลการศึกษาด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ในส่วนของการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* นั้นพบว่าในแต่ละชนิดเซลล์นั้นจะมีผลการศึกษาที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ในเซลล์ HEK293 นั้นพบว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B ไม่มีความเกี่ยวข้อง กับยีน *CDK7* และ *MKI67* เนื่องจาก HEK293 เป็นเซลล์ไตปกติซึ่งเป็นเซลล์คนละกลุ่มกับเซลล์ C33a และ SiHa ที่เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกเพราะฉะนั้นผลที่เกิดขึ้นจากการทดสอบด้วยสารสกัดสูตร เดียวกันนั้นย่อมมีความแตกต่างกัน แต่ในส่วนของเซลล์ C33a และ SiHa ที่เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก เหมือนกันนั้นเมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ B แล้วพบว่ามีการทดลองที่แตกต่างกันคือ ในเซลล์ C33a นั้นสารสกัดสูตรตำรับ B ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ แต่ในเซลล์ SiHa กลับพบว่าสารสกัดสูตรตำรับ B นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ได้และการ ยับยั้งการเจริญเติบโตดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ที่ลดลง จากผลการศึกษาส่วนนี้ถึงแม้เซลล์ C33a และ SiHa จะเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เหมือนกันแต่ เซลล์ C33a นั้นเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส HPV แต่เซลล์ SiHa นั้นเป็น เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัส HPV ชนิดที่ 16 เพราะฉะนั้นแล้วในส่วนตรงนี้จึงส่งผลให้ เซลล์ทั้ง 2 มีการตอบสนองหรือแสดงออกที่แตกต่างกันเมื่อทดสอบกับสารสกัด

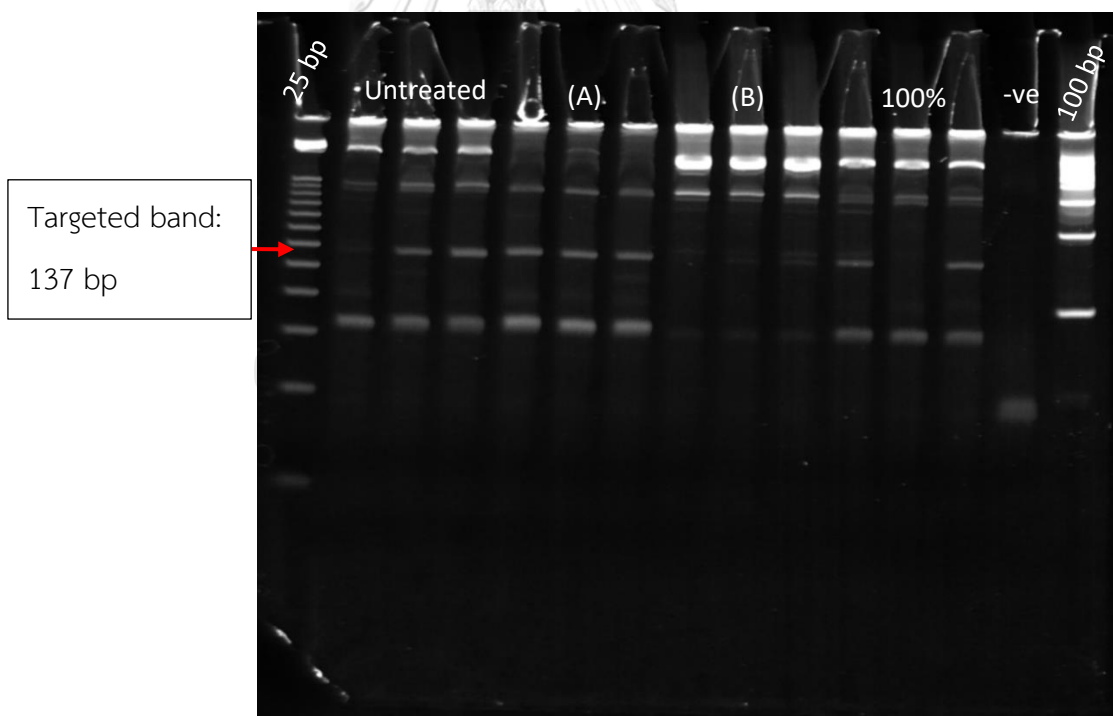
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* พบว่าสารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานนั้นมีความสามารถในการลดจำนวนการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยที่การลดลงดังกล่าวนี้มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ที่มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในชุดควบคุม แต่ผลการศึกษาการแสดงออกของสารสกัดสูตรดังกล่าวในเซลล์ HEK293 นั้นพบว่าการแสดงออกของทั้ง 2 ยีนนั้นไม่มีความแตกต่างกับการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ในชุดการทดลองควบคุมนั้นหมายความว่า สารสกัดสูตร 100% เห็ดกระถินพิมานนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 เช่นเดียวกันแต่ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ซึ่งการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เกิดขึ้นนี้อาจความสัมพันธ์กับยีนอื่นนอกเหนือจากยีน *CDK7* และ *MKI67*

ในส่วนของการศึกษาการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ HeLa ที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดทั้ง 3 สูตรพบว่าการแสดงออกของยีน *CDK7* นั้นเพิ่มขึ้นและยีน *MKI67* นั้นมีการแสดงออกในระดับที่ไม่แตกต่างกับการแสดงออกในชุดควบคุมแต่ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือไม่เนื่องจากผลการทดลองในส่วนของการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี BrdU assay นั้นไม่สามารถแปลผลได้

สุดท้ายคือผลการแสดงออกของยีน *IL1RN* ในทุกชนิดของเซลล์นั้นไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากในการทำ real-time PCR นั้นพบว่า PCR product ที่ได้มีหลายขนาด โดยสังเกตจาก melting curve จากสมมติฐานคาดว่า PCR product หลายขนาดเกิดจากการที่ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์นั้นได้เลือกบริเวณของเอ็กซอนที่สามารถพบได้ในทุกรูปแบบของ Isoform ในยีน *IL1RN* ทำให้ PCR product ที่ได้ อาจจะมีหลายขนาดด้วยกันขึ้นกับ isoform แต่เมื่อลองค้นหาข้อมูลจึงพบว่า แต่ละ isoform ของยีน *IL1RN* นั้นจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของเซลล์ จึงได้มีการลองนำ PCR product ของยีน *IL1RN* ที่ได้จากการทำ real-time PCR ในเซลล์ของ HEK293 จากทุกชุดการทดลองมาทำ gel electrophoresis เพื่อหาคำตอบ เริ่มจากใช้ 1% agarose gel ในการทำพบว่า PCR Product มีหลายขนาดด้วยกันแต่แถบไม่ชัดเจนมีแถบที่ชัดเจนเพียง 1 แถบ ดังแสดงในรูปที่ 42 จึงได้มีการตรวจสอบเพิ่มเติมโดยนำ PCR product เดียวกันนี้ไปทำ gel electrophoresis แต่เปลี่ยนจาก 1% agarose gel เป็น 8% acrylamide gel แทนพบว่ามีแถบของ non-specific band ขึ้นหลายแถบด้วยกัน โดยที่ปรากฏแถบของ PCR product ขนาด 137 bp. ซึ่งเป็นขนาดของ PCR product ที่ต้องการด้วยเช่นเดียวกันที่บริเวณที่ลูกศรสีแดงชี้ดังแสดงในรูปที่ 43 เพราะฉะนั้นแล้วจึงไม่สามารถแปลผลระดับการแสดงออกของยีน *IL1RN* ได้ในการศึกษาครั้งนี้



รูปที่ 42 แผ่นเจล 1% agarose gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis จาก Real-time PCR product ของยีน *IL1RN* จากตัวอย่างเซลล์ HEK293



รูปที่ 43 แผ่นเจล 8% acrylamide gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis จาก Real-time PCR product ของยีน *IL1RN* จากตัวอย่างเซลล์ HEK293

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดสูตรตำรับ A B และสารสกัด 100% ให้ผลกระทบที่มีนัยสำคัญนั้นมีความสามารถในการลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกอย่าง C33a SiHa และ HeLa ได้ในระยะเวลา 2 วัน แต่สารสกัดทั้ง 3 สูตรนี้ยังคงมีความเป็นพิษกับเซลล์ไต HEK293 ในระดับที่สูงมากเช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้เซลล์ HEK293 เป็นตัวอย่างเซลล์ที่ไม่ดีนักสำหรับการศึกษาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด นอกจากนี้ยังพบว่านอกเหนือจากพอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบฟีนอลจากเห็ดกระถินพิมานแล้ว ยังมีสารเคมีตัวอื่นจากสมุนไพรชนิดอื่นที่มีความสามารถในการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารสกัดสูตรตำรับ A มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a และ SiHa สำหรับสารสกัดสูตรตำรับ B นั้นจากการศึกษาพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 และ SiHa นอกจากนี้แล้วยังสามารถลดการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ SiHa อีกด้วย ส่วนในสารสกัดสูตร 100% ให้ผลกระทบที่มีนัยสำคัญนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 และ C33a ได้อีกทั้งยังสามารถลดการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* ในเซลล์ C33a ด้วยจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความสามารถในการลดระดับการมีชีวิตของเซลล์ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ของสารสกัดแต่ละสูตร และพบว่าในสารสกัดบางสูตรมีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน *CDK7* และ *MKI67* โดยยีนทั้งสองมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ ซึ่งผลการศึกษาที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมากที่จะนำไปศึกษาต่อ เพื่อใช้ในการพัฒนาสารสกัดให้มีความเหมาะสม และดีขึ้นสำหรับการเป็นทางเลือกในการรักษามะเร็งปากมดลูก และมะเร็งชนิดอื่นในอนาคต

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

ณรินทร์ สีกุด, มะลิวัลย์ บางน้อมน้อย และชาลินี มานะยิ่ง. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการมารับบริการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกของสตรีกลุ่มเสี่ยง ตำบลบ้านใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา. วารสารสาธารณสุขมูลฐาน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 36 (ตุลาคม 2563 - มีนาคม 2564) : 37-47.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. แผนการดำเนินงานป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งปากมดลูก. กรุงเทพมหานคร : บริษัทสยามออฟเซ็ทจำกัด, 2563

Ahmed, H. G. et al. A. 2017. Prevalence of Human Papillomavirus subtypes 16 and 18 among Yemeni Patients with Cervical Cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 18(6), 1543-1548.

Akhtar, M. et al. 2009. TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. Molecular Cell, 34(3), 387-393.

Arend, W. P., and Guthridge, C. J. 2000. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. Annals of the Rheumatic Diseases, 59 Suppl 1, i60-64.

Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J., and Gabay, C. 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. Annual Review of Immunology, 16, 27-55.

Bataille, A. R. et al. 2012. A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. Molecular Cell, 45(2), 158-170.

Blattman, J. N., and Greenberg, P. D. 2004. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. Science, 305(5681), 200-205.

Bonhin, R. G. et al. 2014. Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of glottis according to the degree of cell differentiation. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 80(4), 290-295.

Bowden, S. J. et al. 2019. The use of human papillomavirus DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia: A systematic review and meta-analysis. EBioMedicine, 50, 246-259.

- Bowden, S. J. et al. 2021. Genetic variation in cervical preinvasive and invasive disease: a genome-wide association study. Lancet Oncology, 22(4), 548-557.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6), 394-424.
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsague, X., Ferrer, E., Bosch, F. X., and de Sanjose, S. 2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. Journal Infectious Disease, 202(12), 1789-1799.
- Chen, W. et al. 2019. A Review: The Bioactivities and Pharmacological Applications of *Phellinus linteus*. Molecules, 24(10).
- Chen, Y. C. et al. 2013. Hispolon from *Phellinus linteus* induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in NB4 human leukaemia cells. The American Journal of Chinese Medicine, 41(6), 1439-1457.
- Choi, D. J., Cho, S., Seo, J. Y., Lee, H. B., and Park, Y. I. 2016. Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H₂O₂-induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells. Nutrition Research, 36(1), 31-43.
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., and Denny, L. 2019. Cervical cancer. Lancet, 393(10167), 169-182.
- Cuylen, S. et al. 2016. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. Nature, 535(7611), 308-312.
- Dai, Y.C. and Xu, M.Q. 1998. Studies on the medicinal polypore, *Phellinus baumii* and its kin, *Phellinus linteus*. Mycotaxon 67, 191-200.
- Denizot, F., and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods, 89(2), 271-277.
- Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual Review of Immunology, 27, 519-550.
- Dymond, J. S. 2013. Explanatory chapter: quantitative PCR. Methods in Enzymology, 529, 279-289.

- Fisher, R. P. 2005. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. Journal of Cell Science, 118(Pt 22), 5171-5180.
- Freeman, S. J., Aly, A. M., Kataoka, M. Y., Addley, H. C., Reinhold, C., and Sala, E. 2012. The revised FIGO staging system for uterine malignancies: implications for MR imaging. Radiographics, 32(6), 1805-1827.
- Gao, W., Wang, W., Sun, W., Wang, M., Zhang, N., and Yu, S. 2017. Antitumor and immunomodulating activities of six *Phellinus igniarius* polysaccharides of different origins. Experimental and Therapeutic Medicine, 14(5), 4627-4632.
- Gery, I., Gershon, R. K. and Waksman, B. H. 1972. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. Journal of Experimental Medicine, 136, 128-142.
- Golfetto, L. et al. L. 2018. PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test. Brazilian Journal Medical and Biological Research, 51(5), e7098.
- Hsin, M. C., Hsieh, Y. H., Wang, P. H., Ko, J. L., Hsin, I. L., and Yang, S. F. 2017. Hispolon suppresses metastasis via autophagic degradation of cathepsin S in cervical cancer cells. Cell Death & Disease, 8(10), e3089.
- Huang, S. C., Wang, P. W., Kuo, P. C., Hung, H. Y., and Pan, T. L. 2018. Hepatoprotective Principles and Other Chemical Constituents from the Mycelium of *Phellinus linteus*. Molecules, 23(7).
- Hull, R. et al. 2020. Cervical cancer in low and middle-income countries. Oncology Letter, 20(3), 2058-2074.
- Ichinohe, T. et al. 2010. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. Journal of Medical Virology, 82(1), 128-137.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. 2006. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. International Journal of Cancer, 119(5), 1108-1124.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. et al. 2006. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017

- women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. International Journal of Cancer, 118(6), 1481-1495.
- Kanlawat Chalertpet. Argonaute 4 promotes genomic methylation. Doctoral dissertation, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 2019.
- Kaplum, V. et al. 2018. Proanthocyanidin Polymer-Rich Fraction of *Stryphnodendron adstringens* Promotes in Vitro and in Vivo Cancer Cell Death via Oxidative Stress. Frontiers in Pharmacology, 9, 694.
- Kocjan, B. J., Bzhalava, D., Forslund, O., Dillner, J., and Poljak, M. 2015. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. Clinical Microbiology and Infection, 21(9), 808-816.
- Kong, S. Z. et al. 2018. Anti-Aging Effect of Chitosan Oligosaccharide on d-Galactose-Induced Subacute Aging in Mice. Marine Drugs, 16(6).
- Kwiatkowski, N. et al. 2014. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. Nature, 511(7511), 616-620.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M. A. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. Journal of Immunology Research, 2014, 149-185.
- Lemieszek, M., and Rzeski, W. 2012. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. Contemporary Oncology (Poznan, Poland), 16(4), 285-289.
- Li, Y. G. et al. 2013. Polysaccharide from *Phellinus linteus* induces S-phase arrest in HepG2 cells by decreasing calreticulin expression and activating the P27kip1-cyclin A/D1/E-CDK2 pathway. Journal of Ethnopharmacology, 150(1), 187-195.
- Lie, A. K., and Kristensen, G. 2008. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. Expert Review of Molecular Diagnostics, 8(4), 405-415.
- Lin, C. J. et al. 2016. Modulation of T cell response by *Phellinus linteus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 121(1), 84-88.

- Liu, Y., Wang, C., Li, J., Mei, Y., and Liang, Y. 2019. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Phellinus Linteus* Mycelial Extract from Solid-State Culture in A Rat Model of Type 2 Diabetes. Nutrients, 11(2).
- Lu, L., Zhang, L., Wai, M. S., Yew, D. T., and Xu, J. 2012. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. Toxicology In Vitro, 26(4), 636-644.
- Magnusson, P. K., Lichtenstein, P., and Gyllensten, U. B. 2000. Heritability of cervical tumours. International Journal of Cancer, 88(5), 698-701.
- McKee, S. J., Bergot, A. S., and Leggatt, G. R. 2015. Recent progress in vaccination against human papillomavirus-mediated cervical cancer. Reviews in Medical Virology, 25 Suppl 1, 54-71.
- Mead, T. J., and Lefebvre, V. 2014. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. Methods in Molecular Biology, 1130, 233-243.
- Mei, Y. et al. 2015. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. Carbohydrate Polymers, 124, 90-97.
- 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.
- Mrouj, K. et al. 2021. Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(10).
- Patel, H. et al. 2018. ICEC0942, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of CDK7 for Cancer Treatment. Molecular Cancer Therapeutics, 17(6), 1156-1166.
- Peirson, S. N., and Butler, J. N. 2007. Quantitative polymerase chain reaction. Methods in Molecular Biology, 362, 349-362.
- Peralta-Zaragoza, O., Bermúdez-Morales, V. H., Pérez-Plasencia, C., Salazar-León, J., Gómez-Cerón, C., and Madrid-Marina, V. 2012. Targeted treatments for cervical cancer: a review. OncoTargets and Therapy, 5, 315-328.
- Pérez-Zamorano, B. and Valverde-Garduno, V. 2015. Immune challenge induces DNA synthesis and nuclear fragmentation in *Aedes aegypti* fat body cells. International Journal of Mosquito Research, 2(4), 24-28.

- Pillai, T.G., Raghu, D., and Karunagaran, D. 2017. Cytotoxic effects of polysaccharides isolated from Emilia sonchifolia in cervical cancer cell line. Cancer Reports and Reviews, 1(6).
- Rimel, J. K. et al. 2020. Selective inhibition of CDK7 reveals high-confidence targets and new models for TFIIH function in transcription. Genes & Development, 34(21-22), 1452-1473.
- Ramadhani, F., Supriyanto, A., Ahmad, M. K. B., Diyanahesa, N. E. and Saputri, G. 2019. Optical properties of dye DN-F01 as sensitizer. Journal of Physics: Theories and Applications, 3(1), 36-42.
- Riss, T. et al. 2013. Cell Viability Assays, by S. Markossian et al. Assay Guidance Manual. 2013.
- Saslow, D. et al. 2012. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 62(3), 147-172.
- Schluter, C. et al. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. The Journal of Cell Biology, 123(3), 513-522.
- Steben, M., and Duarte-Franco, E. 2007. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. Gynecologic Oncology, 107(2 Suppl 1), S2-5.
- Sun, X., Bizhanova, A., Matheson, T. D., Yu, J., Zhu, L. J. and Kaufman, P. D. Ki-67 contributes to normal cell cycle progression and inactive X heterochromatin in p21 checkpoint-proficient human cells. Molecular and Cellular Biology, 37(17), e00569-16.
- Tsikouras, P. et al. 2016. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. Journal of the Balkan Union of oncology, 21(2), 320-325.
- Wang, J., Wang, J., Ye, J., Vanga, S. K. and Raghavan, V. 2019. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. Food Control, 96, 128-136.

- Wipperman, J., Neil, T., and Williams, T. 2018. Cervical Cancer: Evaluation and Management. American Family Physician, 97(7), 449-454.
- Wu, S.-J., Liaw, C.-C., Pan, S.-Z., Yang, H.-C., and Ng, L.-T. 2013. Phellinus linteus polysaccharides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells. Journal of Functional Foods, 5(2), 679-688.
- Xie, Z., Wang, Y., Huang, J., Qian, N., Shen, G., and Chen, L. 2019. Anti-inflammatory activity of polysaccharides from Phellinus linteus by regulating the NF-kappaB translocation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. International Journal of Biological Macromolecules, 129, 61-67.
- Yu, T. et al. 2018. A lethal synergy induced by phellinus linteus and camptothecin11 in colon cancer cells. Oncotarget, 9(5), 6308-6319.
- Yuan, R. et al. 2017. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. Annals of the New York Academy of Sciences, 1401(1), 19-27.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K. and Wang, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends in Food Science & Technology, 18, 4-19.
- 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.
- Zhu, T., Kim, S. H., and Chen, C. Y. 2008. A medicinal mushroom: Phellinus linteus. Current Medicinal Chemistry, 15(13), 1330-1335.

ภาคผนวก

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 7. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เติบโต กระถินพิมานเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม

Day 1	HEK293				
Experiment	Untreat	Mixture_(A)	Mixture_(B)	100%_P.linteus	Cisplatin
Concentration		120 µg/ml	300 µg/ml	1,300 µg/ml	30 µM
Replicate_1	111.5107	103.7345	77.7704	164.0770	24.5778
Replicate_2	93.0510	107.1262	69.3915	172.7041	29.4823
Replicate_3	94.4692	118.5778	82.1785	160.1770	31.9877
Replicate_4	100.9809	99.1964	92.5074	158.2862	29.3286
Mean	100.00	107.16	80.46	163.81	28.84
Standard deviation	8.41	8.28	9.62	6.40	3.09
Standard error of mean	4.21	4.14	4.81	3.20	1.55
T value		-1.213	3.057	-12.073	15.877
Sig. (2-tailed)		0.271	0.022	0.000	0.000

ตารางที่ 8. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เติบโต กระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HEK293				
Experiment	Untreat	Mixture_(A)	Mixture_(B)	100%_P.linteus	Cisplatin
Concentration		120 µg/ml	300 µg/ml	1,300 µg/ml	30 µM
Replicate_1	83.7090	90.5813	33.2611	95.9196	7.2241
Replicate_2	116.3319	92.3198	40.8288	90.0700	8.1240
Replicate_3	122.8770	115.6161	39.9493	104.3668	10.2409

Replicate_4	77.0924	100.1739	36.8608	98.0263	7.8786
Mean	100.00	99.67	37.72	97.10	8.35
Standard deviation	22.95	11.42	3.43	5.90	1.31
Standard error of mean	11.48	5.71	1.71	2.95	0.65
T value		0.026	5.367	0.245	7.974
Sig. (2-tailed)		0.981	0.011	0.820	0.004

ตารางที่ 9. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม

Day 1	HEK293			
Experiment	Untreat	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		1,600 µg/ml	2,000 µg/ml	30 µM
Replicate_1	94.4241	30.0970	-0.0776	27.0620
Replicate_2	140.4427	26.3000	0.4207	27.1044
Replicate_3	80.7739	24.1964	0.2061	25.2128
Replicate_4	84.3311	26.9773	1.6798	24.1400
Mean	99.99	26.89	0.56	26.05
Standard deviation	27.58	2.44	0.78	1.39
Standard error of mean	13.79	1.22	0.39	0.73
T value		5.280	7.208	5.356
Sig. (2-tailed)		0.013	0.005	0.013

ตารางที่ 10. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,600 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HEK293			
Experiment	Untreat	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		1,600 µg/ml	2,000 µg/ml	30 µM
Replicate_1	106.9609	46.1049	12.1790	10.3518
Replicate_2	103.3935	52.1609	3.0515	10.6563
Replicate_3	79.6654	70.6944	6.1317	7.9764
Replicate_4	109.8323	50.5164	6.1926	13.4842
Mean	99.96	54.87	6.89	10.62
Standard deviation	13.79	10.86	3.82	2.26
Standard error of mean	6.89	5.43	1.91	1.13
T value		5.140	13.013	12.792
Sig. (2-tailed)		0.002	0.000	0.001

ตารางที่ 11. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ให้ดูกระถินพิมานเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม

Day 1	C33a					
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		100 µg/ml	130 µg/ml	1,800 µg/ml	2,200 µg/ml	30 µM
Replicate_1	98.4830	54.4282	187.1082	130.7048	59.3738	6.9784
Replicate_2	121.4812	67.7782	183.1032	120.9351	74.7262	9.2812
Replicate_3	90.4427	59.2828	173.6066	104.1567	72.4506	8.0585

Replicate_4	89.5630	43.0505	176.1856	103.2161	45.5725	7.9159
Mean	99.99	56.13	180.00	114.75	63.78	8.06
Standard deviation	14.88	10.32	6.21	13.39	12.19	0.95
Standard error of mean	7.44	5.16	3.10	6.70	6.09	0.47
T value		4.844	-9.926	-1.475	3.766	12.334
Sig. (2-tailed)		0.003	0.000	0.191	0.009	0.001

ตารางที่ 12. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ C33a ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ที่เห็นกระถินพืมาเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	C33a					
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		100 µg/ml	130 µg/ml	1,800 µg/ml	2,200 µg/ml	30 µM
Replicate_1	123.8731	48.5928	99.2754	127.3816	61.5209	1.1365
Replicate_2	81.2371	61.1014	78.8346	127.6104	59.2327	3.1081
Replicate_3	114.2628	59.7666	102.5170	128.6401	45.9995	1.9793
Replicate_4	80.5888	37.8659	97.3686	101.9449	59.9192	4.0653
Mean	99.99	51.79	94.50	121.39	56.69	2.57
Standard deviation	22.38	10.95	10.66	12.98	7.18	1.28
Standard error of mean	11.19	5.47	5.33	6.48	3.59	0.64
T value		3.870	0.443	-1.655	3.687	8.693
Sig. (2-tailed)		0.015	0.679	0.161	0.025	0.003

ตารางที่ 13. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ใต้ กระถินพิมานเป็นเวลา 1 และชุดควบคุม

Day 1	SiHa					
Experiment	Untreat	Mixture _(A)	Mixture _(B)	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		350 µg/ml	460 µg/ml	3,800 µg/ml	4,000 µg/ml	30 µM
Replicate_1	106.321 5	0.6694	63.2303	93.1264	82.2639	52.7267
Replicate_2	111.745 9	0.5590	76.9223	86.9843	102.8709	55.7908
Replicate_3	91.6909	0.6460	71.3190	138.6054	81.4357	57.1435
Replicate_4	90.2555	1.0821	65.8390	95.6984	72.2157	54.7280
Mean	100.00	0.74	69.33	103.59	84.70	55.10
Standard deviation	10.66	0.23	6.08	23.63	12.94	1.86
Standard error of mean	5.34	0.12	3.04	11.81	6.47	0.93
T value		18.592	4.993	-0.277	1.825	8.287
Sig. (2-tailed)		0.000	0.005	0.791	0.118	0.003

ตารางที่ 14. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์ SiHa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ใต้ กระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	SiHa					
Experiment	Untreat	Mixture _(A)	Mixture _(B)	100% <i>P.linteus</i>	100% <i>P.linteus</i>	Cisplatin
Concentration		350 µg/ml	460 µg/ml	3,800 µg/ml	4,000 µg/ml	30 µM

Replicate_1	84.4705	5.1151	60.8307	110.9520	93.6561	32.5213
Replicate_2	128.386 2	1.1305	66.9595	112.0734	78.2802	46.7144
Replicate_3	102.887 8	0.8802	56.4069	93.9940	97.8649	39.9711
Replicate_4	84.2555	1.2565	66.0072	98.8326	11.2357	29.7410
Mean	100.00	2.10	62.55	103.96	86.76	37.24
Standard deviation	20.84	2.02	4.90	8.95	10.54	7.65
Standard error of mean	10.42	1.01	2.45	4.46	5.27	3.83
T value		9.351	3.498	-0.349	1.134	5.654
Sig. (2-tailed)		0.002	0.013	0.739	0.300	0.001

ตารางที่ 15. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน CDK7 ในเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ให้ได้ปริมาณเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HEK293 CDK7 gene			
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		120 µg/ml	300 µg/ml	1,600 µg/ml
Replicate_1	89.1792	104.9351	129.2928	67.1288
Replicate_2	101.1565	114.5821	126.5983	99.9403
Replicate_3	109.6644	126.3317	138.3188	84.5258
Mean	100.00	115.28	131.40	83.86
Standard deviation	10.29	10.72	6.14	16.42
Standard error of mean	5.94	6.19	3.54	9.48
T value		-1.782	-4.539	1.442
Sig. (2-tailed)		0.149	0.011	0.223

ตารางที่ 16. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคาร์ยอยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ HEK293 ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HEK293		MKI67 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		120 µg/ml	300 µg/ml	1,600 µg/ml
Replicate_1	92.1136	148.5499	148.3136	74.9422
Replicate_2	100.6802	156.3362	133.4783	141.5731
Replicate_3	107.3485	147.8916	161.3547	115.4548
Mean	100.05	150.93	147.72	110.66
Standard deviation	7.64	4.70	13.95	33.57
Standard error of mean	4.41	2.71	8.05	19.38
T value		-9.829	-5.192	-0.534
Sig. (2-tailed)		0.001	0.007	0.622

ตารางที่ 17. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคาร์ยอยละของแสดงออกของยีน CDK7 ในเซลล์ C33a ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% เห็นกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	C33a		CDK7 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		100 µg/ml	130 µg/ml	2,200 µg/ml
Replicate_1	107.4896	86.7097	101.0289	73.5784
Replicate_2	96.6403	84.7898	85.7038	76.3545
Replicate_3	65.8701	126.3457	105.4467	87.5648
Mean	100.00	99.28	97.39	79.17
Standard deviation	6.50	23.46	10.36	7.40

Standard error of mean	3.75	13.54	5.98	4.28
T value		0.051	0.369	3.663
Sig. (2-tailed)		0.962	0.731	0.022

ตารางที่ 18. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ C33a ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% หาระยะนิพินเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	C33a		MKI67 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		100 µg/ml	130 µg/ml	2,200 µg/ml
Replicate_1	105.8852	60.7424	75.0169	67.0573
Replicate_2	87.3780	92.0819	87.2186	64.9153
Replicate_3	106.7368	65.0185	98.2929	81.5303
Mean	100.00	72.61	86.84	71.17
Standard deviation	10.94	16.99	11.64	9.04
Standard error of mean	6.32	9.81	6.72	5.22
T value		2.347	1.426	3.519
Sig. (2-tailed)		0.079	0.227	0.024

ตารางที่ 19. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน CDK7 ในเซลล์ SiHa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% หาระยะนิพินเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	SiHa		CDK7 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		350 µg/ml	460 µg/ml	4,000 µg/ml
Replicate_1	103.3084	117.8478	30.8068	65.0373

Replicate_2	97.8238	114.6209	47.9919	66.3463
Replicate_3	98.8677	112.445	32.8360	62.6923
Mean	100.00	114.97	37.21	64.69
Standard deviation	2.91	2.72	9.39	1.85
Standard error of mean	1.68	1.57	5.42	1.07
T value		-6.509	11.061	17.721
Sig. (2-tailed)		0.003	0.000	0.000

ตารางที่ 20. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ SiHa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% หนีดกระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	SiHa		MKI67 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		350 µg/ml	460 µg/ml	4,000 µg/ml
Replicate_1	106.1773	83.1508	72.6464	61.6178
Replicate_2	91.8098	83.2502	68.6660	59.3910
Replicate_3	102.0129	82.8684	64.4045	60.2294
Mean	100.00	83.09	68.57	60.41
Standard deviation	7.39	0.20	4.12	1.12
Standard error of mean	4.27	0.11	2.38	0.65
T value		3.961	6.432	9.170
Sig. (2-tailed)		0.058	0.007	0.001

ตารางที่ 21. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคาร์้อยละของแสดงออกของยีน CDK7 ในเซลล์ HeLa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ใต้กระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HeLa		CDK7 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		220 µg/ml	330 µg/ml	3,000 µg/ml
Replicate_1	98.6978	124.1496	135.1248	127.4733
Replicate_2	105.0094	133.2895	128.1387	131.7863
Replicate_3	96.2928	148.7406	110.1457	143.4833
Mean	100.00	135.39	124.47	134.25
Standard deviation	4.50	12.43	12.89	8.28
Standard error of mean	2.60	7.18	7.44	4.78
T value		-4.637	-3.105	-6.292
Sig. (2-tailed)		0.010	0.036	0.003

ตารางที่ 22. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคาร์้อยละของแสดงออกของยีน MKI67 ในเซลล์ HeLa ระหว่างชุดการทดลองที่เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสูตรตำรับ A B และสูตร 100% ใต้กระถินพิมานเป็นเวลา 2 และชุดควบคุม

Day 2	HeLa		MKI67 gene	
Experiment	Untreat	Mixture (A)	Mixture (B)	100% <i>P.linteus</i>
Concentration		220 µg/ml	330 µg/ml	3,000 µg/ml
Replicate_1	102.1833	126.5001	104.6617	133.7994
Replicate_2	75.4737	123.3955	133.2698	134.8167
Replicate_3	122.3429	123.1198	122.2679	139.7181
Mean	100.00	124.34	120.07	136.11
Standard deviation	23.51	1.88	14.43	3.16

Standard error of mean	13.57	1.08	8.33	1.83
T value		-1.787	-1.260	-2.637
Sig. (2-tailed)		0.148	0.276	0.058



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธนวิชญ์ แสงศิริพัฒน์
วัน เดือน ปี เกิด	29 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
วุฒิการศึกษา	วท.บ. พันธศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	5-7 ถ.ราชดำเนิน ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	ธนวิชญ์ แสงศิริพัฒน์, วิชาณี แบนศิริ และ ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. 2565. ผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน <i>Phellinus linteus</i> ต่อความเป็นพิษของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก. รายงานสืบเนื่องงานประชุมวิชาการระดับชาติด้าน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาภาคใต้ ครั้งที่ 7: 139-148.