โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 6 ต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ชื่อนิสิต นางสาววริศรา ขันธรักษ์ **เลขประจำตัว** 6032148223

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 6 ต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นางสาววริศรา ขันธรักษ์

6032148223

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชา
พฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

Effect of product from *Phellinus igniarius* formula 6 on *FOXP3* expression of cervical cancer cells

Ms. Warissara Khuntharuks

6032148223

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 6 ต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	วริศรา ขันธรักษ์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

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

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

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 6 ต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	วริศรา ขันธรักษ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกเป็นสาเหตุอันดับต้นของการเสียชีวิตของผู้หญิงในประเทศไทยส่วนใหญ่ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อไวรัส human papilloma virus จึงมีความต้องการรักษาและผลิตยาเพิ่มมากขึ้น โดยมีการประยุกต์ใช้ยาสมุนไพรร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบัน เพื่อนำไปรักษาและบรรเทาอาการที่เกิดจากโรคมะเร็งปากมดลูก เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus igniarius*) เป็นเห็ดที่มีส่วนประกอบของพอลีแซ็กคาไรด์ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการแบ่งตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้น้อย โดยในงานวิจัยฉบับนี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1 % เพื่อศึกษาระดับการมีชีวิต และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และศึกษาการแสดงออกของยีน *FOXP3* ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และ SiHa เปรียบเทียบกับเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 เมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำกลั่น พบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC50) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa อยู่ที่ 488.376 ± 18.438 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 อยู่ที่ 505.549 ± 58.875 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ส่งผลต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa มีค่าลดลงมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 เมื่อทดสอบการแสดงออกของยีน *FOXP3* ภายในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกให้สารสกัดเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1 % พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดดังกล่าว

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก, เห็ดกระถินพิมาน, ระบบภูมิคุ้มกัน, การแสดงออกของยีน, ระดับการมีชีวิตของเซลล์

Title	Effect of product from Phellinus igniarius formula 6 on *FOXP3* expression of cervical cancer cells
Student name	Warissara Khunatharuks
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pattamawadee Yanatatsaneejit
Co- Advisor	Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong
Acardemic year	2020

Abstract

Cervical cancer is the leading cause of death for the most women in Thailand as a result of consequently, human papilloma virus infection has increased demand for treatment and drug productions. Therefore, it has been applied to herbal medicine. It is used in conjunction with modern medical treatment to treat and relieve symptoms caused by cervical cancer. *Phellinus igniarius* is a polysaccharide-active mushroom, which inhibits proliferation and metastasis of cervical cancer cells and has less side effects on patients. In this research shows the effects of formula 6 products from *1% P.ignarius* extracts on cervical cancer and human cell lines. To study the cell viability and the cell proliferation rate of cancer cells by the expression of the *FOXP3* gene which in immune system. It was studied in C33A and SiHa type cervical cancer cells compared with HEK-293 normal kidney cells with extracts at concentrations of 0100 200 300 400 and 513 µg / mL for 48 hours with 52.69 % of polysaccharide. The results showed that the extracts of *P.ignarius* with distilled water were found that the concentration percentage of formula 6 product extracts was a component of 1% *P.ignarius* is effective in inhibitory concentration (IC50) in SiHa and HEK-293 normal kidney cells were 488.376±18.438 and 505.549±58.875 µg / mL, respectively. In conclusion, 1% of *P. igniarius* formula 6 product extracts showed significant antitumor more effective against on SiHa cervical cancer cells than normal kidney cells HEK-293 as equal concentration *in vitro*. Detection in *FOXP3* gene expression on C33A cervical cells which treated by 1% of *P. igniarius* extracts showed that no expression on C33A cervical cells.

Keywords: Cervical cancer, *Phellinus igniarius*, immunology system, gene expression, cell viability

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิตและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณรุ่นพี่นักศึกษาปริญญาโท ได้แก่ นาย ธนวิชญ์ แสงคีรีพัฒน์ นางสาว พิมพ์วิภา สุวรรณกาศ และ นางสาว กาญจนา เอี่ยมสมบุญที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และสัตว์เลี้ยงที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านและให้กำลังใจแก่นิสิตในการทำโครงงานวิจัยอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	13
4 ผลการศึกษา	24
5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	34
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	42
ภาคผนวก ก	43
ภาคผนวก ข	48

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บริเวณที่เกิดมะเร็งปากมดลูกและการแพร่ของเซลล์มะเร็งเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง	5
2	ลักษณะรูปร่างและขนาดของมะเร็งปากมดลูกในการพัฒนาของเซลล์แต่ละตำแหน่ง	5
3	ลักษณะการรวมตัวแบบ Dimerization บริเวณพื้นที่ผิว Forkhead Domain ของ *FOXP3*	7
4	บทบาทและหน้าที่ของ *FOXP3* บนแต่ละตำแหน่งของ allele แต่ละชนิด	7
5	การทำ Sequence alignment บริเวณตำแหน่ง FKH domain ของยีน *FOXP3*	8
6	การแสดงออก *FOXP3* บนเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูก	8
7	เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus igniarius*)	9
8	Molecular mechanisms ของเห็ดกระถินพิมานส่งผลภายใต้กระบวนการยับยั้งการเกิดเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง	11
9	ลักษณะสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%	24
10	เซลล์ไตปกติชนิด HEK-293	25
11	เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A	26
12	เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa	26
13	ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) และสมการเส้นตรงของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%	27
14	ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) และสมการเส้นตรงของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%	29

15 ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) และสมการเส้นตรงของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HEK-293 เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% 30

16 ผลการแสดงออกของยีน *FOXP3* และ *GAPDH* จาก cDNA ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A 33

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของไพรเมอร์ *FOXP3* และ *GAPDH*	22
2	ตารางเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นส่วนประกอบ 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง	32
3	ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์, Melting temperature และ ค่าเปอร์เซ็นต์ GC ของ Forward และ Reverse Primer ในยีน *FOXP3*	32
4	สารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	45
5	ตารางค่า O.D. ของการสกัด RNA จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยจากรายงานของ WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer ได้รายงานว่า พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีประชากรสตรีที่เสี่ยงต่อมะเร็งปากมดลูก 29 ล้านคน โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคมีแนวโน้มพบผู้ป่วยใหม่สูงขึ้นโดยคาดว่า ในปี พ.ศ. 2568 จะมีจำนวนผู้ป่วยรายใหม่สูงขึ้นเป็นปีละประมาณ 8,622 คน และมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่อยู่ในอันดับ 2 จากจำนวนสตรีที่เป็นโรคมะเร็ง (Bruni et al., 2019) แสดงให้เห็นว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกในประเทศไทยเพิ่มขึ้นสูงมากขึ้น ดังนั้นความต้องการในการรักษาหรือผลิตยารักษาจึงเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

ในปัจจุบันมีการใช้ยาสมุนไพรอย่างแพร่หลายเราจึงสนใจสมุนไพรที่ใช้เกี่ยวกับการรักษาโรคมะเร็ง ยาสมุนไพรในการศึกษาครั้งนี้ได้ความอนุเคราะห์จากบริษัทเอกชน ซึ่งส่วนประกอบในยาดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยยาดังกล่าวมีส่วนประกอบสำคัญที่เป็นสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานซึ่งเป็นสูตรที่ 6 โดยแต่ละสูตรจะมีปริมาณของสารประกอบต่างกัน โดยสูตรที่ 6 นี้มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ซึ่งเห็ดกระถินพิมานเป็นเห็ดที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติและนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในยาสมุนไพรเพื่อรักษาโรคในแถบเอเชียนตะวันออก รวมไปถึงประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น (Lee and Yan et al., 2011) โดยมีการค้นพบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และผลกระทบจากยาต้านมะเร็งในเนื้อเยื่อเทียมจากการทดลอง (Song et al.,2008; Shon and Nam, 2001) รวมไปถึงโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตขนาดยาวในเห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้ (Li et al., 2015)

โมเลกุลดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งยีนก่อมะเร็ง เพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้โดยตรงด้วยการกระตุ้นกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์ (Wasser, 2002; Zhang et al., 2007)

จากการศึกษาจากงานวิจัยของ Jing-Kun Yan และคณะพบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Yan et al., 2017) โดยพบว่า สาย polysaccharides

ในเห็ดกระถินพิมานประกอบไปด้วย กลูโคส และ แมนโนส ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื่องจากมีโครงสร้างที่ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ macrophage ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Lombard, 1994) ดังนั้นจึงต้องการพิสูจน์กระบวนการดังกล่าวโดยเลือกที่จะศึกษาการแสดงออกในยีน *FOXP3* โดยยีน *FOXP3* มีหน้าที่ในการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์, ยับยั้งกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์และเพิ่มการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (Luo et al., 2015) เนื่องจากการปรากฏของ transcription factor ของยีน *FOXP3* มีส่วนช่วยให้ naïve T cells เกิดการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็น *FoxP3+* regulatory T cells (Treg) โดยมีหน้าที่สำคัญคือกดการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันในหลาย ๆ ขั้นตอน โดย Treg มีความสามารถในการปล่อยไซโตไคน์ออกมาทำให้เกิดการยับยั้งการทำหน้าที่ของ T cell หลายชนิดเช่น IL-10 และ TGF-β ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลง (พงศกร เชื่อมไมตรี, 2556) จึงทำให้เซลล์ที่เกิดการแสดงออกของยีน *FOXP3* อาจทำให้นำไปสู่การเกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด

เทคนิคที่สำคัญในการทดลองคือ MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาระดับการมีชีวิตของเซลล์โดยนับจากอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยศึกษาจากการทดสอบความเป็นพิษในเนื้อเยื่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Stoddart, 2011) ซึ่งเป็นเทคนิคการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้การย้อมสีโปรตีนเพื่อศึกษาในขั้นตอนการแบ่งตัวของเซลล์ และกระบวนการ Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคใช้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน ด้วยเหตุดังกล่าวผู้ศึกษาคาดว่าผลการศึกษาจากโครงงานวิทยาศาสตร์ในหัวข้อเรื่องดังกล่าว สามารถก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก รวมไปถึงการนำสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาณไปต่อยอดในการรักษามะเร็งปากมดลูดได้

1.2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% สามารถส่งผลต่อการมีชีวิตในเซลล์มะเร็งและตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลจากการทดสอบด้วยสารสกัดของของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่ใช้ความเข้มข้น 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองมีผลต่อการลดลงของปริมาณเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เซลล์มะเร็งปาก

มดลูกชนิด C33A และเซลล์ไตปกติ HEK-293 อีกทั้งพบระดับการแสดงออกของยีน *FOXP3* ที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เพื่อนำไปศึกษาหากลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อไป

บทที่ 2

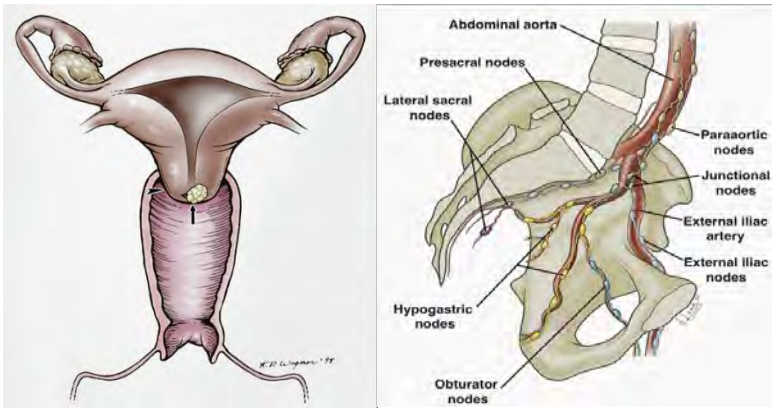
การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. มะเร็งปากมดลูก

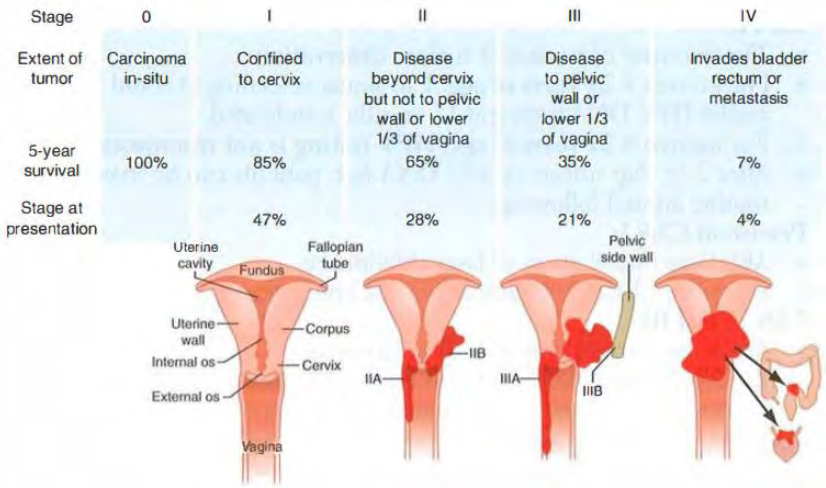
ในปัจจุบันมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่อยู่ในอันดับต้นที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งทั่วโลก ซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่เกิดในผู้หญิงมากที่สุด (Brisson and Drolet, 2019) เกิดจากการพัฒนาของเซลล์ผิดปกติที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงบริเวณปากมดลูก ซึ่งทำให้เกิดเซลล์เนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อ epithelium ที่เรียกว่า cervical intraepithelial neoplasia (CIN) โดยเมื่อศึกษาจากลักษณะทางชีวภาพและทางพันธุกรรมของเซลล์ เมื่อศึกษาจากการทำ cancer *in situ* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนนำไปสู่การแพร่กระจายของเซลล์ (metastasized) ซึ่งสาเหตุในการเกิดโรคมะเร็งชนิดดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้จากการติดเชื้อจากเชื้อไวรัสชนิด human papilloma virus ซึ่งเกิดจากการร่วมเพศ (Al-Daraji and Smith, 2009) และอาจเกิดจากพันธุกรรมซึ่งมียีนที่ผิดปกติทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยการแบ่งตัวที่มากเกินไปจนนำไปสู่การเกิดเป็นมะเร็งในที่สุด หนทางในการรักษาอาจใช้วัคซีนในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งที่เกิดจากเชื้อไวรัสและใช้วิธีผ่าตัดในขั้นระยะการเกิดมะเร็งในขั้นที่รุนแรงขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ

2.2. การก่อตัวของมะเร็งปากมดลูกและความเกี่ยวข้องในยีน *FOXP3*

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งชนิด adenocarcinoma ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติมากเกินไปบริเวณอวัยวะที่ทำหน้าที่เป็นต่อม มักเกิดในบริเวณของเนื้อเยื่อ epithelium โดยมะเร็งปากมดลูกสามารถแบ่งระยะการเกิดได้ 2 ระยะคือ preinvasive คือระยะก่อนที่จะมีการรุกล้ำทำลายชั้นเนื้อเยื่อเมมเบรนและระยะ invasive lesions คือระยะที่เกิดการขยายขนาดเป็นก้อนเนื้องอกจนกลายเป็นมะเร็ง และเกิดการแพร่ของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะข้างเคียง ดังรูปที่ 1 เช่น uterine corpus, vagina, parametrium เป็นต้น หรือแพร่ผ่านท่อน้ำเหลือง โดยระยะที่แบ่งตาม IFGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (Yan, et al. 2019) มีทั้งหมด 5 ระยะ คือ 0, I (IA IA2 IB IB2), II (IIA IIB), III (IIIA IIIB) และ IV (IVA IVB) ดังรูปที่ 2 ซึ่งแบ่งตามขนาดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เมื่อเข้าสู่ระยะ IA และ IB มักจะเข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัด (Bhatla, N., et al. 2019)



รูปที่ 1 บริเวณที่เกิดมะเร็งปากมดลูกและการแพร่ของเซลล์มะเร็งเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง (ลูกศร) จะอยู่บริเวณปากมดลูก (ภาพขวา) เมื่อเข้าสู่ระยะที่มีความรุนแรงมากขึ้นจะแพร่เข้าสู่อวัยวะข้างเคียง (ภาพซ้าย) (ดัดแปลงจาก: Dong et al. 2015)

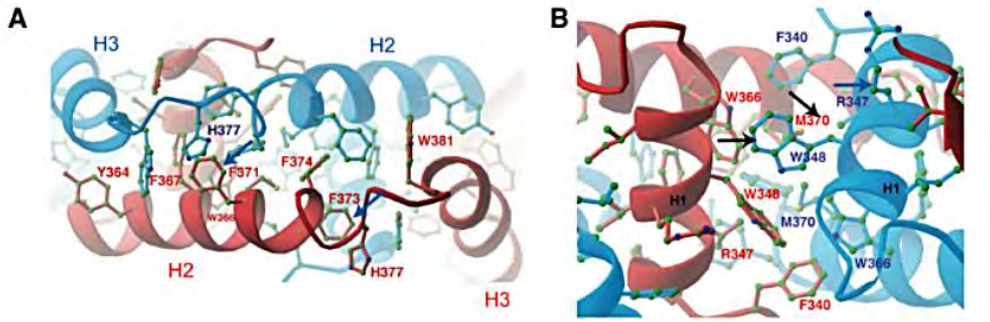


รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างและขนาดของมะเร็งปากมดลูกในการพัฒนาของเซลล์แต่ละตำแหน่งทั้ง 5 ระยะ ได้แก่ระยะ 0, I, II, III และ IV โดยในแต่ระยะมีอัตราในการรอดชีวิตและการลุกลามสู่อวัยวะข้างเคียงแตกต่างกัน (ดัดแปลงจาก: http://medicalhealthguides.blogspot.com/2015/08/staging-of-cervical-cancer.html)

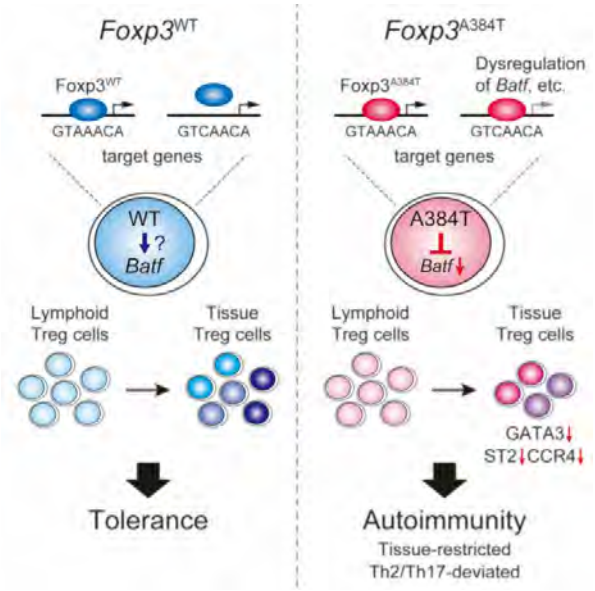
ในร่างกายของมนุษย์นั้นมี Regulatory T cells (Treg cells) คือกลุ่มของ T cells ที่เจริญเต็มที่ถูกเก็บไว้ในต่อมไทมัสตามการกระตุ้นของ peripheral naïve T cells โดย Treg cells เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาการตอบสนองของร่างกายด้วยการเกิดแอนติบอดีแบบอัตโนมัติและการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานมากเกินไปจนอาจนำไปสู่การเกิดความเสียหายในร่างกายได้ ในทางตรงกันข้ามเมื่อเกิดการทำงานของ Treg cells มากเกินไปอาจทำให้เกิดการหยุด

การป้องกันของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อและเกิดเนื้องอกขึ้นได้ในเวลาเดียวกัน โดย Forkhead/ winged-helix transcription factor box P3 (*FOXP3*) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 3 และเป็นสมาชิกในกลุ่มของ forkhead/winged-helix และทำหน้าที่เป็น transcription factor มีความสำคัญต่อการแสดงออกของ Treg cells โดย *FOXP3* มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการทำงานของ Treg cells โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการแสดงออกของ *FOXP3* ที่สูงอาจแสดงให้เห็นว่าเกิดการยับยั้งกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การหยุดการทำงานของ Treg cells เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีน *FOXP3* แบบ loss-of-function เป็นต้น อาจทำให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง โดยขึ้นกับตำแหน่งบน allele ของ *FOXP3* ยกตัวอย่างเช่น $FOXP3^{A384T}$ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลทำให้เกิดการอักเสบของ Treg cells ดังรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ (Hayatsu et al., 2017) มากไปกว่านั้น *FOXP3* ยังแสดงออกทั้งในไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 6 อีกทั้งยังกระตุ้นการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เมื่อเกิดการแสดงออกที่ผิดปกติของ *FOXP3* อาจยับยั้งหรือก่อให้เกิดการพัฒนาของเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน (Luo et al., 2015)

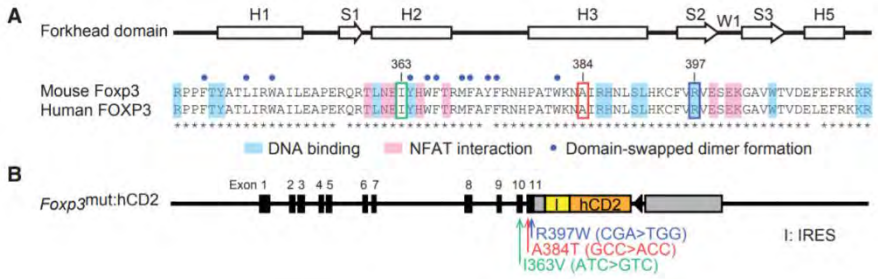
ระดับการแสดงออกของ *FOXP3* ยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย โดยแสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับของ *FOXP3* สูงจะทำให้เกิดการยับยั้ง PPARγ และ caspase-3 รวมไปถึงกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน NF-KB p65 และ Cyclin D ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็ง เพื่อป้องกันการเกิดการทำลายตัวเองของเซลล์มะเร็ง ความสำคัญของระดับการแสดงออกของยีน *FOXP3* สามารถเป็นสิ่งที่ใช้ทำนายการเกิดโรคมะเร็งในแต่ละชนิดได้ แต่ในการศึกษาได้ใช้ตัวอย่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นตัวกำหนด โดยอาจขึ้นอยู่กับการจับกับ promoter ที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดการแสดงออกที่ต่างกัน เช่น เมื่อจับกับบริเวณ 5’ regulatory region ของ *CTLA4* หรือ *IL2RA* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *FOXP3* ทำให้เกิด transcription ของ *CTLA-4* และ *CD25* ภายใน T cells (up-regulation) ได้และทำให้เกิด histone acetylation ในทางตรงกันข้ามเมื่อจับกับ promoter ของ IL-2, IL-7RA, interferon สามารยับยั้งกระบวนการ acetylation ของโปรตีนฮิสโตนและการสร้างโครมาติน โดยสรุปได้ว่าการแสดงออกของ *IL-7R* และ *IL-2* ใน T cells ถูกยับยั้งหรือเกิดการ down-regulation (Martin et al., 2010) ดังนั้นการแสดงออกของ *FOXP3* จึงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลากหลายอย่างเพื่อส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการทำงานภายในของ regulatory T cells เมื่อระดับการแสดงออกของ *FOXP3* มาก จะแสดงให้เห็นว่าเกิดมะเร็งปากมดลูกเกิดขึ้นภายในอวัยวะหรือเซลล์ในร่างกายที่ค้นพบ (Chu et al., 2015)



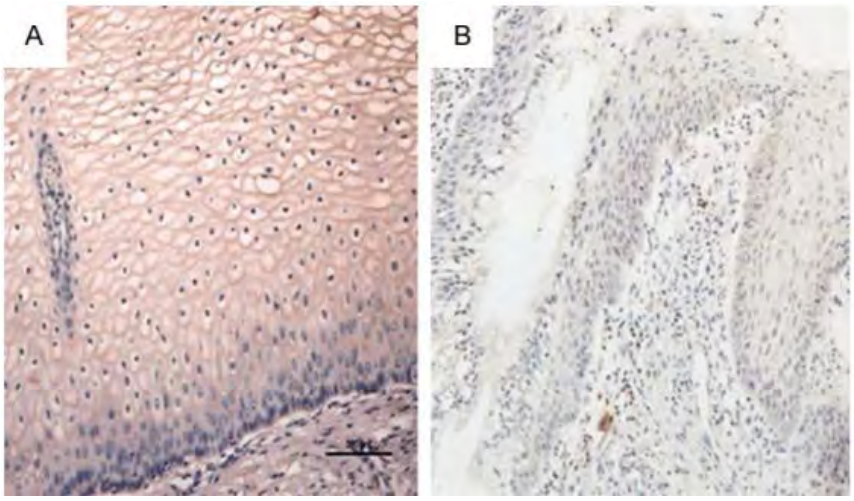
รูปที่ 3 ลักษณะการรวมตัวแบบ Dimerization บริเวณพื้นที่ผิว Forkhead Domain ของ *FOXP3* (ดัดแปลงจาก: Bandukwala et al., 2011)



รูปที่ 4 บทบาทและหน้าที่ของ *FOXP3* บนแต่ละตำแหน่งของ allele แต่ละชนิด เมื่อเกิดการกลายพันธุ์แบบเฉพาะที่ของยีน *FOXP3* โดยเปลี่ยนจาก ทำให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Batf* เกิดการทำงานของภูมิคุ้มกันที่มากเกินไป (ดัดแปลงจาก: Hayatsu et al., 2017)



รูปที่ 5 การทำ Sequence alignment บริเวณตำแหน่ง FKH domain ของยีน *FOXP3* ในหนูและมนุษย์ แสดงดังโครงสร้างด้านบน และ การวิเคราะห์การกลายพันธุ์บนแต่ละตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับ DNA-binding, NFAT interaction และ โครงสร้างแบบ domain-swapped dimer (ดัดแปลงจาก: Bandukwala et al., 2011)



รูปที่ 6 การแสดงออก *FOXP3* บนเนื้อเยื่อ normal cervical epithelium (A) และ แสดงออกในเนื้อเยื่อ Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (B) (ดัดแปลงจาก: Luo et al. 2015)

โดยในระดับของการแสดงออกของ *FOXP3* สามารถพบได้ในทั้งเนื้อเยื่อของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลากหลายชนิดและเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจึงเลือกยีนชนิดดังกล่าวมาศึกษาเกี่ยวกับอัตราการอยู่รอดและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

2.3. **เห็ดกระถินพิมาน**

เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus igniarius*) เป็นกลุ่มเชื้อราขนาดใหญ่ (macrofungi) เกาะกลุ่มอยู่บริเวณต้นไม้ยืนต้น ดังรูปที่ 7 มีลักษณะเปลือกเป็นสีน้ำตาลเข้มปนเหลือง มีโครงสร้างของ pileus เป็นครึ่งวงกลม เป็นเห็ดที่นิยมใช้ในแถบเอเชียตะวันออกและแถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้

โดยนำมาประยุกต์ในการรักษาทางการแพทย์และแพร่หลายในการใช้เป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่สำคัญ โดยมักนำส่วนที่เรียกว่า fruiting body ที่มีส่วนประกอบเป็น ลิกนิน และ เซลลูโลส ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างสปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและฟังไจบางชนิดที่ดำรงชีวิตเป็นปรสิต มีลักษณะเป็นเส้นใย ที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างที่สามารถดูดซับสารอาหารจากเซลล์ของโฮสต์ได้ ซึ่งมักเชื่อว่าสามารถบรรเทาอาการของโรคหนองใน, ท้องเสีย และกล้ามเนื้ออ่อนแรง เป็นต้น (Leung, A.Y., 2006)

รูปที่ 7 เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus igniarius*) มีลักษณะเปลือกสีน้ำตาลเข้มปนเหลือง มีโครงสร้างของ pileus เป็นครึ่งวงกลม

ที่มา: https://ultimate-mushroom.com/poisonous/175-phellinus-igniarius.html

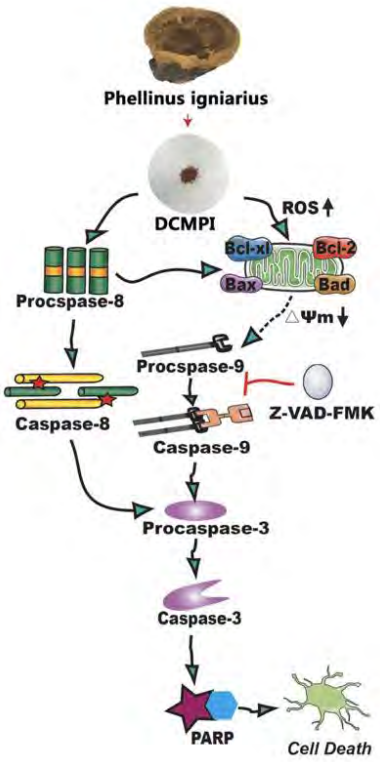
2.4. ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดเห็ดกระถินพิมานต่อเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาจากงานวิจัยของ Jing-Kun Yan และคณะพบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Yan et al., 2017) โดยพบว่าโครงสร้างสายพอลีแซกคาไรด์ในเห็ดกระถินพิมานประกอบไปด้วย กลูโคส และ แมนโนส โดยในงานวิจัยของ Gao และคณะ พบว่ามีโครงสร้างแบบ (1 ⟶ 3; 1 ⟶ 6)-β-D-polysaccharide (Gao et al., 2015) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ macrophage ภายในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Lombard, 1994) อีกทั้งพอลีแซกคาไรด์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานถูกค้นพบว่ามีความสามารถในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก (Li et al., 2015) มากไปกว่านั้นสาร styrylpyrones และ hispolon ยังเป็นโครงสร้าง

ทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญที่พบมากในเห็ดชนิดดังกล่าว อีกทั้งยังมีความสามารถในการในการต่อต้านโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งเต้านม, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งปากมดลูก ซึ่งใช้เป็นตัวอย่าง cell line ในการทดลอง เป็นต้น (Chen et al., 2016) โดยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเพื่อนำมาใช้ในการทดลองมีส่วนประกอบไปด้วยสมุนไพร 5 ชนิดและเห็ดกระถินพิมานที่เป็นองค์ประกอบ 1%

จากการศึกษาวิจัยของ Wang et al. (2018) พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานส่งผลต่อการแบ่งของเซลล์ได้แตกต่างกันแต่สามารถต่อต้านเซลล์สายพันธุ์มะเร็งในการจำลองแบบ *in vitro* และ *in vivo* ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดการทำลายตัวเองของเซลล์ (Apoptosis) รวมไปถึงหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะ G_0/G_1 ผ่านการแสดงออกที่ลดลงของ cyclin D1 สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ mitochondria dependent intrinsic apoptotic pathway ผ่านการ down-regulated ของ *Bcl-2* ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณและการกระตุ้นการแสดงออกของ Bax protein, caspase-9 และ caspase-3 โดยต่อมายังนำไปสู่การเกิด DNA fragmentation และ เกิดการลดลงของ nuclear PARP ระหว่างการเกิด apoptosis (Kuranaga et al., 2012)

อีกทั้งในการศึกษาสารสกัดเห็ดกระถินพิมานของ Dong et al. (2015) สามารถอธิบายได้ว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานช่วยกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนภายในเซลล์และนำพาไปสู่การเกิดการทำลายตัวเองของเซลล์ ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 Molecular mechanisms ของเห็ดกระถินพิมานส่งผลภายใต้กระบวนการยับยั้งการเกิดเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง การเพิ่มระดับการสร้างสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนภายในเซลล์มะเร็งนำไปสู่การเกิด apoptosis pathway ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน caspase-9 จากการลดการแสดงออกของยีน *Bcl-2* ทำให้เกิดการส่งต่อสัญญาณผ่านโปรตีน caspase-3 สู่การชักนำโปรตีน PARP ทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ซึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (ดัดแปลงจาก: Dong et al., 2015)

ดังนั้นจากการศึกษางานวิจัยในหลากหลายรูปแบบ พบว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ทางชีวภาพ อาจกระตุ้นกระบวนการในร่างกาย ให้มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีความผิดปกติได้ โดยอาจชักนำโปรตีนต่างๆ จึงสนใจที่ศึกษาทดลองผลของสารสกัดผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์เพื่อสนับสนุนผลการวิจัยดังกล่าวต่อไป

2.5. **เทคนิคที่ใช้ในการวิจัย**

2.5.1. MTT assay

เทคนิค MTT assay ที่ใช้ในการทดลองเป็นการใช้วิธีการในการวัดการระดับความมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้ทฤษฎีในการแตกตัวตัวของ tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2 และ 5-diphenyl tetrazolium bromide ไปเป็นผลึก formazan ซึ่งมีสีม่วงเกิด จากการสังเคราะห์เอนไซม์ succinate dehydrogenase โดยไมโทรคอนเดรีย ของเซลล์ที่มีชีวิต โดยวัดจากค่าดูดกลืนของแสงในช่วงคลื่นประมาณ 540-570 นาโนเมตร จึงสามารถนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบในการมีดำรงอยู่ของเซลล์ในการทดลอง (Sylvester, 2011)

2.5.2. Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

เทคนิค Reverse Transcription PCR (RT-PCR) สำหรับใช้ในการทดลองโดยการทำ PCR ดังกล่าวมีตัวอย่างตั้งต้นเป็นสายอาร์เอ็นเอ ในขั้นตอนเริ่มต้นจะต้องมีการเปลี่ยนรหัสบนสายอาร์เอ็นเอ (mRNA) ไปเป็นสายดีเอ็นเอก่อนโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นโดยมีอาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบ เรียกว่า cDNA (complementary DNA) การสร้าง cDNA จะใช้ไพรเมอร์ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ random primer, oligo (dT) primer และ gene-specific primer จากนั้นสาย cDNA ที่ได้จะถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณในบริเวณที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค PCR ต่อไป ซึ่งเทคนิค RT-PCR นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน (Seifi et al ., 2012)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ดำเนินการ

ไมโครปิเปต: P1000 (0.1-1 mL) (Gilson, France)
ขวดเลี้ยงเซลล์ T-25
ปิเปต ขนาด 1.5 และ 5 mL
ปิเปตต์ปลอดเชื้อ
ปิเปตต์ดูดจ่ายอัตโนมัติ
ขวดรูปชมพู่ 250 mL
บิกเกอร์ 50 mL
กระบอกตวง 100 mL
ตู้เย็น 4 °C
เครื่องชั่งดิจิตอล
เครื่อง Soxhlet extractor
Water bath
เครื่องอบแห้ง
กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับสำหรับส่องเซลล์ (Inverted microscope) (Motic, Germany)
ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)
เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclaved)
ที่กรองสาร 500 mL (Bottle Top Filter) (CORNING, USA)
ผงของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็งองค์ประกอบ 1%
ผงของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็งองค์ประกอบ 100%

เซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเวลล์

เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A
เซลล์ไต HEK293
เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

3.2. สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ

สารเคมีทั่วไป

Lysis buffer (Thermo Scientific, USA)
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Japan)
Proteinase K (USB, USA)
Phenol-chloroform-isoamyalcohol (25:24:1) (Sigma, USA)
Chloroform (Merck, Germany)

Absolute ethanol (Merck, Germany)

Ammonium acetate (CH3COONH4) (Merck, Germany)

Trizol reagent (Invitrogen, USA)

Isopropanol (VWR, France)

Nuclease free water (GE healthcare, UK)

75% ETOH

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA)

cDNA synthesis kit (Biotechrabbit, Germany)

สารเคมีใช้ในการเลี้ยงเซลล์และใช้ในกระบวนการ MTT assays

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

Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Modified without phenol red (phenol red free DMEM) (GE Healthcare Life Sciences, USA)

Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)

Charcoal Stripped FBS One ShotTM (GIBCO, USA)

Trypsin-EDTA (GIBCO, USA)

100x Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, USA)

Phosphate Buffered Saline (PBS)

PBS Buffer (10X) (VISUALPROTEIN, Taiwan)

Sodium hydrogenphosphate dihydrate $(NaHPO_4)_2H_2O$

Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)

Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO, USA)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (AMRESCO, USA)

Cisplatin (Glentham Life Sciences Ltd, UK)

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, USA)

5-Bromo-2'-deoxyuridine (Sigma-Aldrich, USA)

Poly-D-Lysine (Thermo Fisher Scientific, USA)

สารเคมีสำหรับทำ PCR

10X PCR buffer (Qiagen, Germany)

25mM Magnesium chloride (Qiagen, Germany)

10mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega, USA)

Oligonucleotide primers (Bionics, Korea)

Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)

สารเคมีในการทำ gel electrophoresis

40% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad, USA)

1X Tri-Borate-EDTA (1X TBE buffer) (Sigma, USA)

Ammonium Persulfate (APS) (Thermo Scientific, USA)

50 bp ladder (Biotechrabbit, Germany)

6X DNA loading dye (Fermentas International Inc., Canada)

RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (iNtRON Biotechnology, South Korea)

LE Agarose (Bioexpress and VWR, USA)

3.3. วิธีดำเนินการ

3.3.1. การเตรียมและสกัดผลิตภัณฑ์ผงเห็ดกระถินพิมานด้วยเครื่อง Soxhlet extractor

เตรียมการสกัดผลิตภัณฑ์ผงสมุนไพรสูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% นำผงเห็ดกระถินพิมานที่ได้รับความอนุเคราะห์จากทางบริษัท ไปชั่งน้ำหนัก 10 กรัม แล้วนำเข้าเครื่องอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนักก่อนอบและหลังอบ ต่อมาจึงนำมาสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยใช้น้ำกลั่นปริมาณ 200 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย นำผงผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่ได้อบแล้วมาสกัด โดยใส่ลงใน chamber ปริมาณ 4 กรัม (อัตราส่วนของ น้ำกลั่น : สารสกัด = 50:1) ซึ่งใช้เวลาในการสกัดแบ่งเป็น 2 วัน โดยวันแรกสกัดประมาณ 3 ชั่วโมง นำสารละลายที่สกัดได้ มาใช้สำหรับการสกัดต่อในวันที่สอง โดยใส่ผงสารสกัดอีก 4 กรัมลงใน chamber เดิม โดยสกัดต่ออีก 3 ชั่วโมง โดยทำการสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละขั้นตอนการทำ นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยที่กรองขนาด 0.45 µ ใส่ลงในขวดชมพู่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยปริมาณสารละลายที่สกัดสุทธิที่ได้คือ 150 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งมาวัดความเข้มข้นสุทธิของสารละลายที่สกัดได้ โดยนำสารละลายที่ที่ได้มาใส่บิกเกอร์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร (3 ซ้ำ) โดยขั้นตอนดังกล่าวปฏิบัติตามเทคนิคการกีดกั้นเชื้อทั้งหมด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นสุทธิของสารละลายที่สกัดได้ และเก็บ Stock ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

3.3.2. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไตปกติ

เซลล์ C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้มาจากเนื้อเยื่อชั้น Epithelial บริเวณ Retinoblastoma โดยเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งของคนไข้เพศหญิงชาวคอเคเชี่ยน เซลล์ SiHa เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้มาจากเนื้อเยื่อชั้น Epithelial บริเวณภายในปากมดลูกโดยเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งของคนไข้เพศหญิงชาวเอเชียซึ่งมีอายุประมาณ 55 ปี โดยเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC) เซลล์มะเร็งชนิด Human Embryonic Kidney Cell Lines (HEK-293) เป็นเซลล์ไตที่ได้จาก fetus ซึ่งถูกสร้างโดย Michele Calos's laboratory โดยมีส่วนประกอบเป็น plasmid ที่ถอดรหัสได้จากการกลายพันธุ์ของ SV40 large T antigen ทำให้สามารถเกิดการแบ่งตัวของเซลล์ได้ โดยนำเซลล์ทั้งสามชนิดมาทดลองเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

3.3.3. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHA C33A และเซลล์ไตชนิด HEK- 293 (ดัดแปลงจาก Corning Incorporate, USA)

โดยทำเมื่อจำนวนของเซลล์มีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 ดูดอาหารเก่าออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 ที่มีเซลล์เก่าอยู่ เติม PBS 5 มิลลิตร (กลั้วให้ทั่วทั้งภาชนะ) เพื่อล้าง FBS ออก โดย FBS เป็น serum ที่มีองค์ประกอบของโปรตีน albumins โดย serum ดังกล่าวจะส่งผลโดยเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังจากนั้นจึงดูดออกแล้วจึงเติม Trypsin ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที (นำออกมาเคาะและส่องกล้องดูว่าเซลล์มีการกระจายตัวดีหรือหลุดออกจากภาชนะหมดหรือไม่) หลังจากนั้นจึงเติม cDMEM ลงไป 3 เท่าของปริมาณ Trypsin (1.5 มิลลิลิตร) เพื่อหยุดการทำงานของ Trypsin ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน จึงดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในภาชนะใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ (cDMEM) อยู่ 5 มิลลิลิตร โดยจะใส่ลงไปประมาณ 100 – 200 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับการวางแผนการดำเนินงานและนำไปเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีอุณหภูมิอยู่ที่ 37 °C

3.3.4. การศึกษาผลสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมานต่อการระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไตด้วยกระบวนการ MTT assay (ดัดแปลงจาก Sylvester, 2011)

3.3.4.1. นำเซลล์ที่เลี้ยงลงใน 96 well plate สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 จำนวนเซลล์ 6,000 cell/ well ส่วนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ใช้จำนวน 3,000 cell/well ตามลำดับ โดยเฉพาะเมื่อต้องการเลี้ยงเซลล์ไตชนิด HEK-

293 ใน 96 well plate จะต้องทำการ coat plate ด้วย Poly-D-Lysine หลุมละ 200 ไมโครลิตรและดูดออก ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที (เพื่อช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ไตมากขึ้น) เมื่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไตมีจำนวน 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM เก่าทิ้ง ล้างเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไตด้วย PBS 5 มิลลิลิตร กลั้วเบาๆ ให้ทั่วทั้งภาชนะ หลังจากนั้นจึงดูดออก เติม Trypsin 500 ไมโครลิตร กลั้วภาชนะเพื่อให้เอนไซม์กระจายทั่วพื้นผิว แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที (นำออกมาเคาะและส่องกล้องดูว่าเซลล์มีการกระจายตัวดีหรือหลุดออกจากภาชนะหมดหรือไม่) แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM ลงไปปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สังเกตบริเวณสารละลาย ดูด supernatant (ส่วนใสด้านบน) ออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัว แล้วนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM 4 มิลลิลิตร เพื่อให้เป็นสารละลายเซลล์ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตขึ้นลงให้เซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างกระจายตัวทั่วทั้งสารละลาย จากนั้นทำการเจือจางสารละลายที่ได้กับอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM 90 ไมโครลิตรกับสารละลายเซลล์ 10 ไมโครลิตร (อาจเป็น 10X/5X/1X ขึ้นกับจำนวนเซลล์) เพื่อนับเซลล์ด้วยสไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer) เมื่อทราบความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไต ปรับความหนาแน่นโดยให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A กับ เซลล์ไต HEK-293 ใช้จำนวนเซลล์เท่ากับ 1,008,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ใช้จำนวนเซลล์เท่ากับ SiHa 504,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (คำนวณจากการทดลอง 6 ชุดการทดลอง เผื่อความคลาดเคลื่อน 1 ชุดการทดลอง จึงใช้ทั้งหมด 7 ชุดการทดลอง ทำทั้งหมด 6 ซ้ำ ต่อการวัด MTT assays 2 วัน) แล้วนำเซลล์ที่นับได้มาคำนวณ เมื่อทราบจำนวนเซลล์ที่นับจึงคำนวณตามปริมาณการใช้เซลล์ นำมาเปรียบเทียบด้วยบัญญัติไตรยางศ์เพื่อหาปริมาตรสารละลายเซลล์ที่ต้องใช้กับอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ก) เพื่อทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ไตภายในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 well plate โดยใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร (เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และเซลล์ไต HEK-293 ใช้ 6,000 เซลล์ต่อหลุมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ใช้ 3,000 เซลล์ต่อหลุม) โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไตในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอกไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.2. เมื่อครบเวลาการบ่มจึงทำการเจือจางสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ปริมาณ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นตามที่

ต้องการโดยจะต้องเตรียมสารละลายโดยการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางยารักษาโรคมะเร็ง Cisplatin ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำสารสกัดและ Cisplatin มาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM (ในอัตราส่วน สารสกัดหรือ Cisplatin : cDMEM เท่ากับ 1:9) โดยปริมาตรที่จะใช้ต่อหลุมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากในหลุมทิ้ง ทำการใส่สารที่เตรียมไว้โดยมีการทดลองทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) ปริมาตร 180 ไมโครลิตรเป็นกลุ่มควบคุมเพื่อใช้เป็น negative control
- สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% โดยใช้ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A SiHa และเซลล์ไตชนิด HEK-293 เท่ากับ 247.039, 226.917 และ 377.037 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็น positive control
- ยารักษาโรคมะเร็ง Cisplatin เพื่อใช้เป็น positive control

โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเพื่อใช้เป็น negative control โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง โดยตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 6 ซ้ำ เมื่อใส่สารที่เตรียมไว้แล้ว จึงนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.4.3. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำ MTT assay ดูดอาหารเก่าทิ้ง เติม MTT Molecular probes® ที่เจือจางด้วย DMEM (ในอัตราส่วน 1:9) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มด้วยตู้เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดอาหารออก ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เมื่อครบเวลานำไปเขย่าบนไมโครเพลทเป็นเวลา 5 วินาที จึงนำไปวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไตด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำผลมาวิเคราะห์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ระดับการมีชีวิต (% Cell viability) จากสมการ

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดหรือเซลล์ไตด้วยสารต่างๆ (ค่าเฉลี่ย)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหรือเซลล์ไตในกลุ่มชุดควบคุมลบ (ค่าเฉลี่ย)}} \times 100$$

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์ระดับความมีชีวิต (%Cell viability) มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยเปรียบเทียบระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารต่างๆ ในแต่ละความเข้มข้นกับกลุ่มควบคุม ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์หรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี ในโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences 22 (SPSS) (IBM, USA)

3.3.5. การศึกษาผลสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมานที่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *FOXP3* ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A

3.3.5.1. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A และให้สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100%

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกภายในขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต จำนวน 90 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หน้าตัดขวดเลี้ยงเซลล์ T-25 จึงนำมาทำตามขั้นตอนที่ 3.3.4. โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 150,000 เซลล์ลงใน 6 well plates ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการเจือจางสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และและสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ตามความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM ในอัตราส่วน สารสกัดหรือ Cisplatin : cDMEM เท่ากับ 1:9 โดยปริมาตรที่จะใช้ต่อหลุมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากในหลุมทิ้ง ทำการใส่สารที่เตรียมไว้โดยมีการทดลองทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง ดังนี้

- อาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM ปริมาตร 1.80 มิลลิลิตรเป็นกลุ่มควบคุมเพื่อใช้เป็น negative control
- สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% โดยใช้ความเข้มข้นที่มีค่าใกล้เคียงกับค่า IC50 เท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% โดยใช้ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ลดลงครึ่งหนึ่ง เพื่อใช้เป็น positive control

โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำต่อ 1 ชุดการทดลอง เมื่อใส่สารที่เตรียมไว้แล้ว จึงนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.5.2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

เมื่อครบเวลาจึงนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100 % นำมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ทำการล้างเศษเซลล์ด้วย PBS 1 มิลลิตร (กลั้วให้ทั่วทั้งภาชนะ) เพื่อล้าง FBS ออก ใส่ trizol reagent 400 ไมโครลิตร ใช้ชะล้างบริเวณหลุมให้เซลล์หลุดออกมาให้มากที่สุด จึงดูดลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วยไมโครปิเปตต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่ choloroform 80 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลง 15 วินาที จึงนำแค่เฉพาะส่วนใส (supernatant) ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดบริเวณ aqueous phase ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่แช่ในน้ำแข็ง ใส่ isopropanol 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงแล้ววางแช่ไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75% ETOH 400 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 7,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาทีดูดส่วนใสทิ้ง นำไปทำให้แห้งด้วยบรรยากาศปกติ เมื่อตะกอน RNA แห้งสนิทจึงละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นชนิด type I 20 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงแล้วนำไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) โดยใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อการวัด 1 ครั้ง ค่า O.D. 260/280 (ภาคผนวก ข) ที่ได้ควรอยู่ประมาณ 2.00 จึงจะถือเป็นอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี

3.3.5.3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) (Biotechrabbit, Germany)

นำชุด cDNA synthesis kit (Biotechrabbit, Germany) มาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.3.5.2. มาเข้ากระบวนการตามวิธีคำแนะนำของ

บริษัท ใส่ master mix ที่ผสมกับ RNA template ให้เข้ากัน นำไปเข้ากระบวนการ PCR เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงจะได้ cDNA ของเซลล์ C33A

3.3.6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ด้วยเทคนิค PCR

3.3.6.1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FOXP3* ที่ใช้สำหรับการทำ PCR โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาจากฐานข้อมูล Ensembl[ASIA] ใน NCBI (ENST00000376207.10) แล้วออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณของ Intron เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างขนาดของ PCR product ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในสารตัวอย่าง ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 118 bp โดยที่คู่ไพรเมอร์มีขนาดประมาณ 25 bp มี %GC content ประมาณ 40-60% และมี annealing temperature ที่ห่างกันไม่เกิน 4 °C โดยใช้โปรแกรม Oligo Calculator version 3.27 ในการคำนวณ %GC และ annealing temperature

3.3.6.2. เทคนิค PCR

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใส่ไพรเมอร์ 2 คู่ ใน PCR reaction โดยใช้ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *FOXP3* และไพรเมอร์ยีน *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (NG_007073.2)) เป็น housekeeping gene สำหรับใช้เป็น internal control ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของไพรเมอร์ *FOXP3* และ *GAPDH*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาดของ PCR Product จาก RNA (bp)
FOXP3	F: 5' ACAATGTCTCCTCCAGAGAGA 3'	118
	R: 5' AGCCTTGGTCAGTGCCATTTT 3'	
GAPDH	F: 5' CAGCCGCATCTTCTTTTG 3'	163
	R: 5' GCCCAATACGACCAAATC 3'	

สำหรับ Forward primers และ Reverse primers ตามลำดับ โดยแบ่ง PCR reaction เป็นสองชุดที่มีความแตกต่างของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ แต่มีส่วนผสมที่ใช้ PCR เช่นเดียวกันคือ ใส่ Distilled water 7.0 ไมโครลิตร ใส่ 10X PCR buffer 1.0 ไมโครลิตร ใส่ 25 มิลลิโมลาร์ $Mgcl_2$ 0.4 ไมโครลิตร ใส่ 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.4 ไมโครลิตร ใส่ Taq polymerase 0.1 ไมโครลิตร ใส่ 10 ไมโครโมลาร์ Forward F*OXP3* primer และ 10 ไมโครโมลาร์ Reverse *FOXP3* primer 0.15 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับ 10 ไมโครโมลาร์ Forward *GAPDH* primer และ 10 ไมโครโมลาร์ Reverse *GAPDH* primer ในคนละ PCR reaction จึงได้เป็น PCR Master Mix ผสมกับ cDNA 1.0 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ต่อ PCR 1 หลอด จากนั้นนำไปเข้ากระบวนการ PCR โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ซึ่งเริ่มจากขั้นตอน Initial denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 3 นาที ใช้ PCR cycle 30 รอบ ที่ ประกอบด้วย ขั้นตอน Denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 58 °C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้ว Holding ที่ 4°C เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ในบริเวณที่สนใจของยีน *FOXP3* เมื่อได้ PCR product จึงนำไปตรวจสอบขนาดของ PCR product และการปนเปื้อนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

3.3.6.3. เจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

นำ PCR product ที่ได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผ่านเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสโดยใช้ 1% polyacrylamide gel ผสมกับ 1X Triborate-EDTA (1X TBE buffer) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที แล้วแช่เจลลงใน 10X TBE buffer แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของยีน *FOXP3* ด้วยเครื่อง Electrophoresis chambers (Bio-rad, USA)

3.3.7. **การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีการทางสถิติ**

นำค่าระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa C33A และเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 ที่มีกลุ่มการทดลอง 5 กลุ่มตัวอย่างจากข้อ 3.3.4. มาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองภายในแต่ละเซลล์ และนำค่าความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานการเป็นส่วนประกอบ 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ลดลงครึ่งหนึ่ง [IC50 (Inhibitory Concentration)] ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และเซลล์ไต HEK-293 มาเปรียบเทียบกันด้วยวิธี Independent t-test เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า IC50 ระหว่างสองเซลล์ โดยกำหนดค่า p-value <0.05 ในการวิเคราะห์ข้อมูลและสร้างกราฟ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.22 (SPSS Inc, USA) และ Microsoft Excel 2019

บทที่ 4

ผลการศึกษา

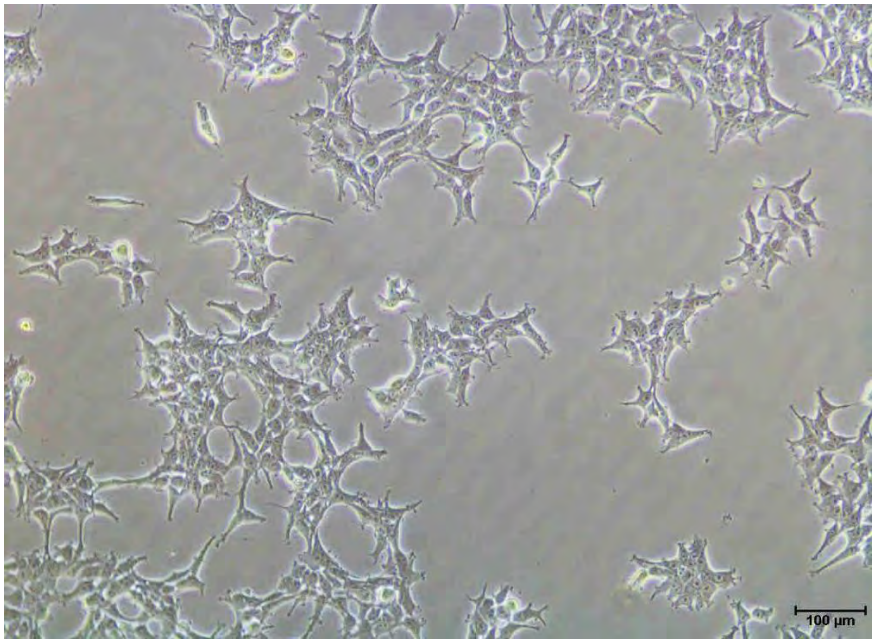
4.1. ผลการสกัดและความเข้มข้นที่ได้จากสารที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน

เมื่อนำผงของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% มาอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ผงที่มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มและหลังจากชั่งน้ำหนักก่อนอบได้ 48.44 กรัมและหลังอบได้ 48.10 กรัม ซึ่งน้ำหนักลดลง 0.34 กรัม หลังจากนำมาสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor ได้สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นส่วนประกอบ 1% ซึ่งมีลักษณะสีเหลืองเข้ม ดังรูปที่ 9 เมื่อนำค่าน้ำหนักหลังอบให้แห้งที่ชั่งด้วยเครื่องชั่งดิจิตอลทั้งหมด 3 ครั้งมาลบกับค่าบิกเกอร์ที่วัดได้ ดังนั้น $\bar{X}$= 0.0513 กรัม จึงนำมาคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมาน เป็นองค์ประกอบ 1% โดยมีค่าเท่ากับ 5,130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 9 ลักษณะสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% มีสีเหลืองเข้ม

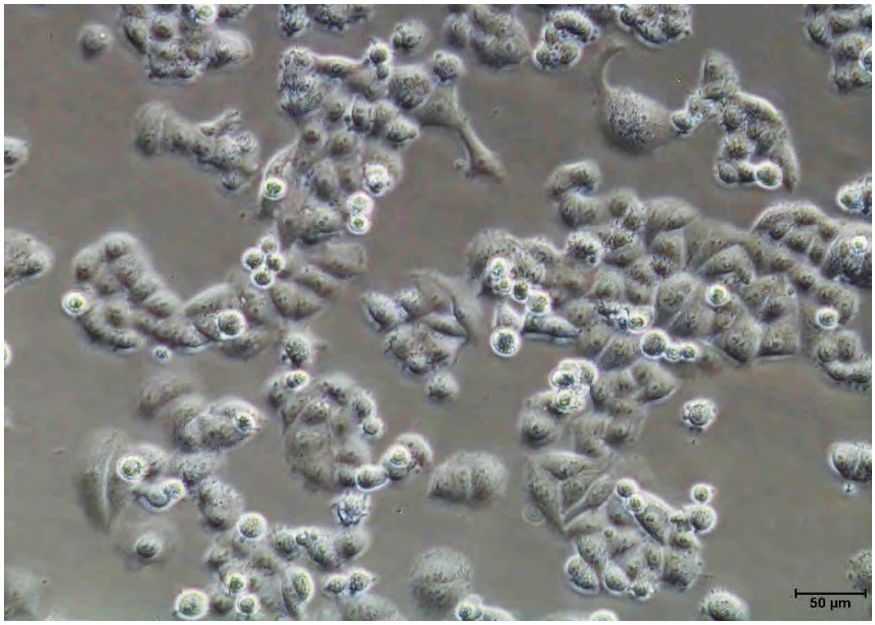
4.2. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่กำหนด คือ C33A และ เซลล์ไตปกติชนิด Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293)

เมื่อนำเซลล์ไตมาเลี้ยง พบว่า เซลล์ไตชนิด HEK-293 ที่ได้เลี้ยงไว้มีรูปร่างคล้ายหัวกระสวย และรูปร่างเซลล์มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมหน้าจั่ว รวมกลุ่มเกาะติดแน่น เป็นเซลล์ที่เป็นเนื้อเยื่อบุผิวของไต (Epithelial) ดังรูปที่ 10



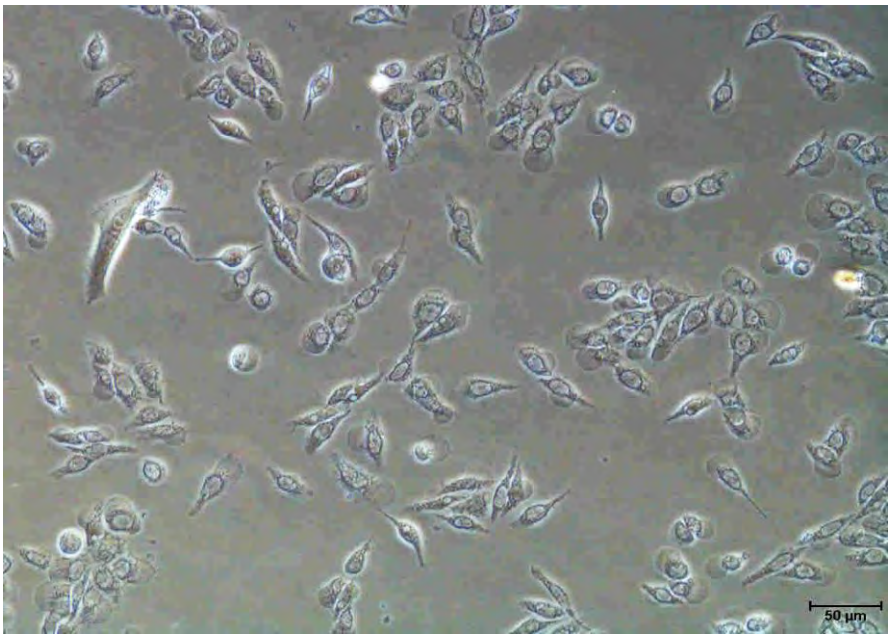
รูปที่ 10 ลักษณะของเซลล์ไตชนิด HEK-293 มีลักษณะรูปร่างเป็นกระสวยและมี fibroblast ยึดติดบริเวณผนังของ flask

เมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มาเลี้ยง มีลักษณะรูปร่างขอบเขตของเซลล์ค่อนข้างใหญ่ เป็นรูปร่างเป็นทรงกลมและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ รวมไปถึงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ลักษณะรูปร่างขอบเขตของเซลล์ค่อนข้างใหญ่ เป็นรูปร่างกลมและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่

เมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Siha มาเลี้ยงพบว่ามีลักษณะรูปร่างของเซลล์เรียว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นกระสวยดังรูปที่ 12

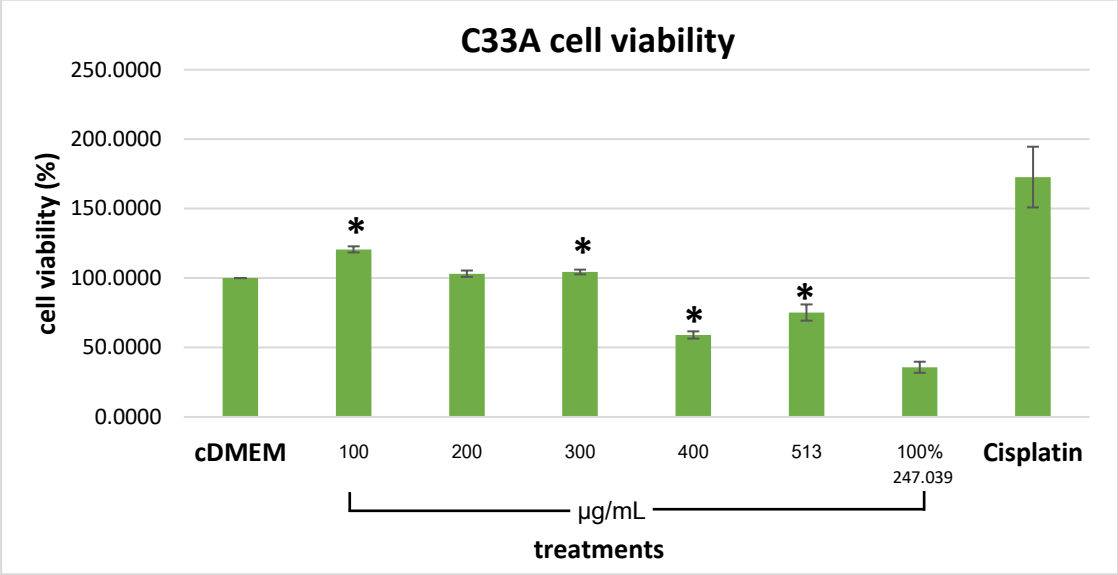


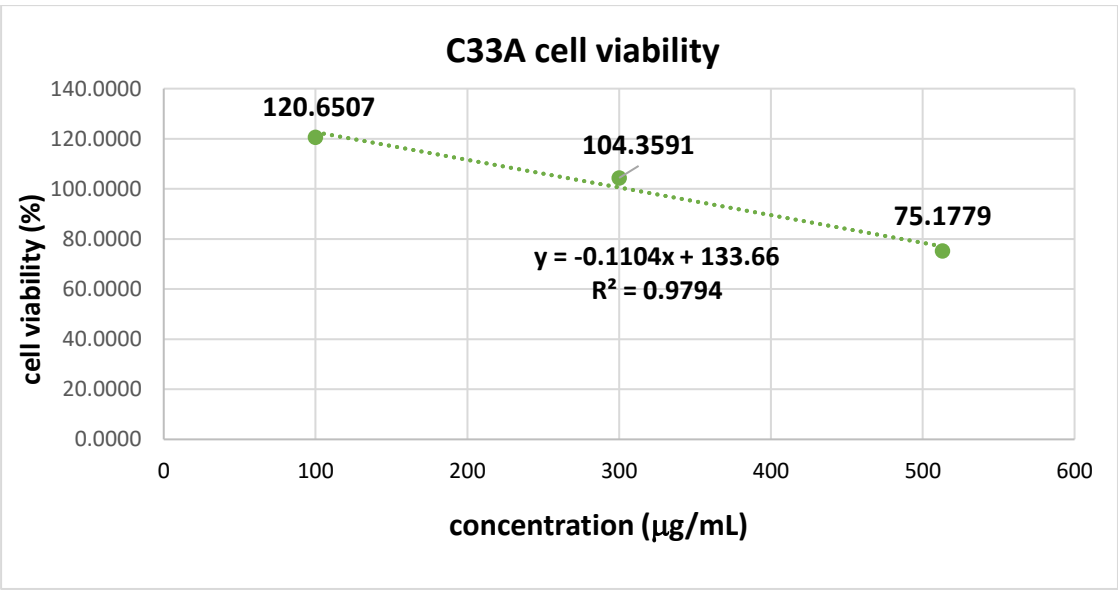
รูปที่ 12 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Siha มาเลี้ยงพบว่ามีลักษณะรูปร่างของเซลล์เรียว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นกระสวย

4.3. การศึกษาผลของสารสกัดผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa, C33A และ เซลล์ไตชนิด HEK-293 ด้วยกระบวนการ MTT assay

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดและเซลล์ไตในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมและทดสอบเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A SiHa และเซลล์ไตชนิด HEK-293 ทั้งหมด 3 ซ้ำ ด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% โดยมี cDMEM และ สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% และ Cisplatin เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่าระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ต่อสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร มีค่าเท่ากับ 120.6507, 103.1526, 104.3591, 59.0311 และ 75.1779 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากรูปที่ 13 (บน) พบว่าผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้น 300 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 13 (ล่าง) หาสมการมาตรฐานได้เป็น $y = -0.1104x + 133.66$ และมีค่า $R^2 = 0.9794$ ซึ่งความสัมพันธ์จะใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ลดลงครึ่งหนึ่ง [IC50 (Inhibitory Concentration)] พบว่ามีระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ลดลงไม่ถึง 50 % ทำให้ไม่สามารถหาค่าดังกล่าวได้ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A



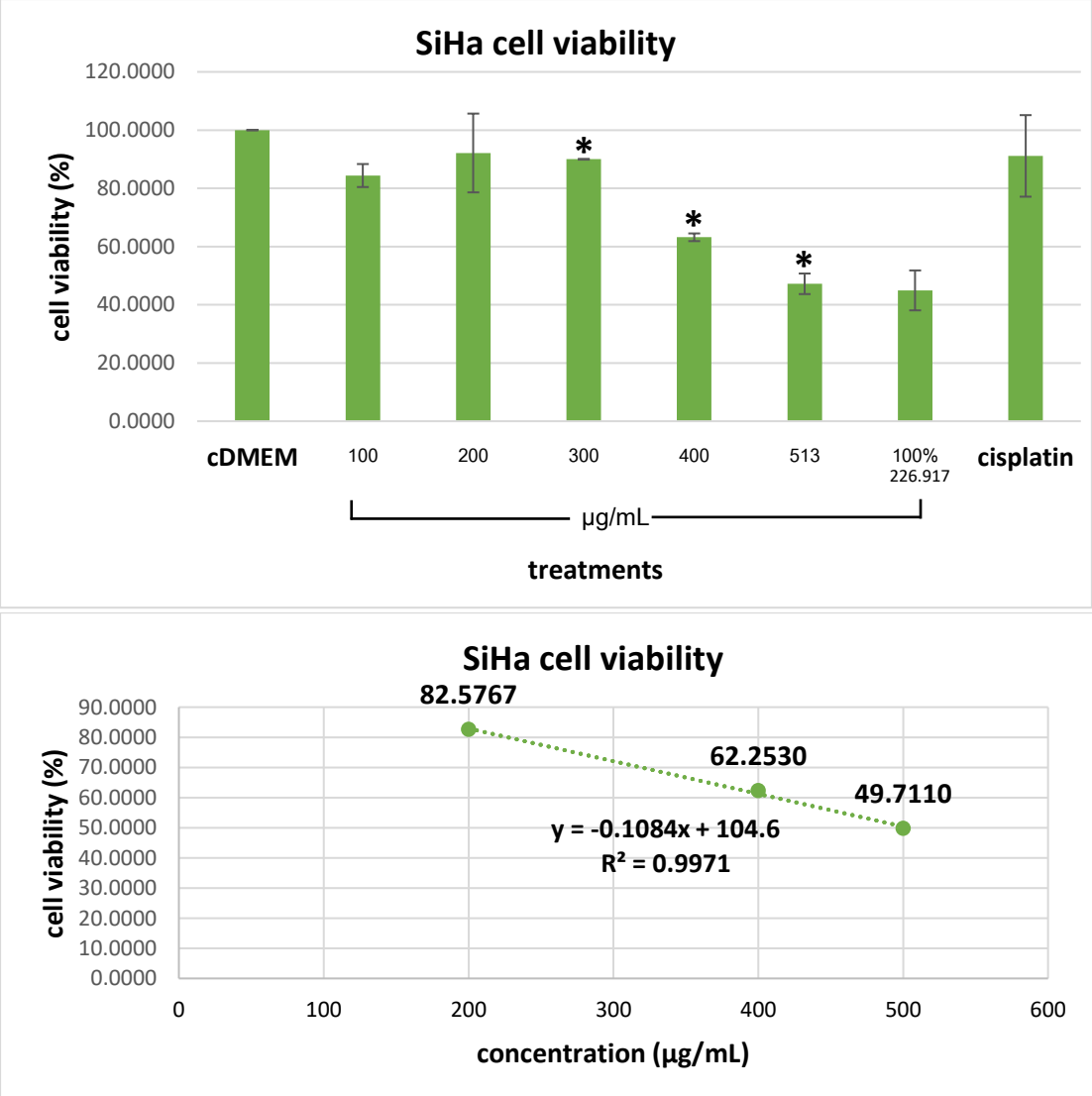


รูปที่ 13 (บน) ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% และยารักษามะเร็ง Cisplatin * ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) (ล่าง) สมการเส้นตรงของระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ต่อสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%

จากรูปที่ 14 (บน) แสดงผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% ต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชนิด SiHa ในการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 84.3973, 92.1448, 89.9905, 63.1883 และ 47.2126 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่14 (ล่าง) หาสมการมาตรฐานได้เป็น y = -0.1084x + 104.6 และมีค่า R^2 = 0.9971 ซึ่งความสัมพันธ์จะใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC50) โดยมีค่าเท่ากับ 493.131 ± 18.439 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

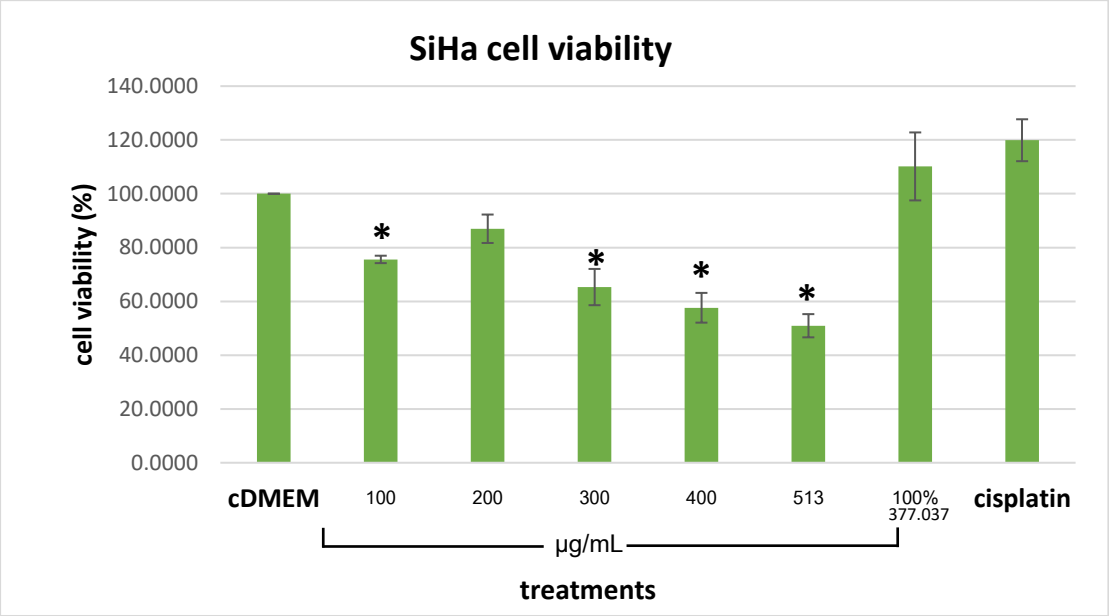


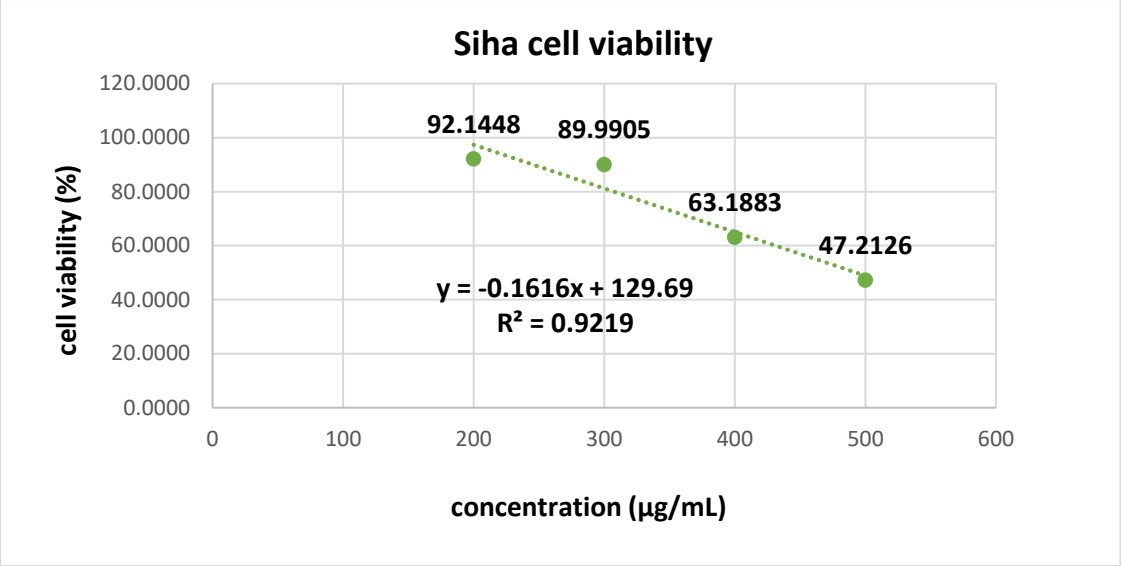
รูปที่ 14 ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้น ในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 1% เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ

กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% และยารักษามะเร็ง Cisplatin * ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05 (ล่าง) แสดงสมการเส้นตรงของระดับการมีชีวิตของเซลล์เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ต่อสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%

จากรูปที่ 15 (บน) แสดงผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ต่อระดับความมีชีวิตของเซลล์ไตชนิด HEK-293 ในการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 75.5915 86.9813 65.3091 57.6105 และ 50.9305 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 15 (ล่าง) หาสมการมาตรฐานได้เป็น $y = -0.1616x + 129.69$ และมีค่า $R^2 = 0.9219$ ซึ่งความสัมพันธ์จะใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC50) โดยมีค่าเท่ากับ 505.549 ± 58.875 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร





รูปที่ 15 ระดับความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ไตชนิด HEK-293 เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% และยารักษามะเร็ง Cisplatin * ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05 (ล่าง) สมการเส้นตรงของระดับการมีชีวิตของเซลล์เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HEK-293 ต่อสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%

จากผลการศึกษาโดยการทำ MTT assay ภายในเซลล์ปากมดลูกชนิดทั้งสอง C33A SiHa ตามลำดับ และเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 ในการบ่มเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่า IC50 (เปอร์เซ็นต์ค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (Inhibitory Concentration : IC50) พบว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยค่า IC50 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ในการวัด MTT assay มีค่าน้อยกว่าเซลล์ไตปกติชนิด HEK293T ยกเว้นค่า IC50 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ไม่สามารถหาค่าได้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (Inhibitory Concentration : IC50) ระหว่างเซลล์มะเร็งปากมดสองลูกชนิด C33A SiHa และเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293

ชนิดของเซลล์	IC50±SE (µg/mL)	R-Squared
เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A	หาค่าไม่ได้	หาค่าไม่ได้
เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa	493.131 ± 18.439[a]	0.9971
เซลล์มะเร็งไตปกติชนิด HEK-293	505.549 ± 58.875[b]	0.9219

[a,b] คือค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

4.3. การพิสูจน์การแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A เพื่อศึกษาผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%

4.3.1. ผลจากการออกแบบไพร์เมอร์ของยีน *FOXP3* ดังตารางดังนี้

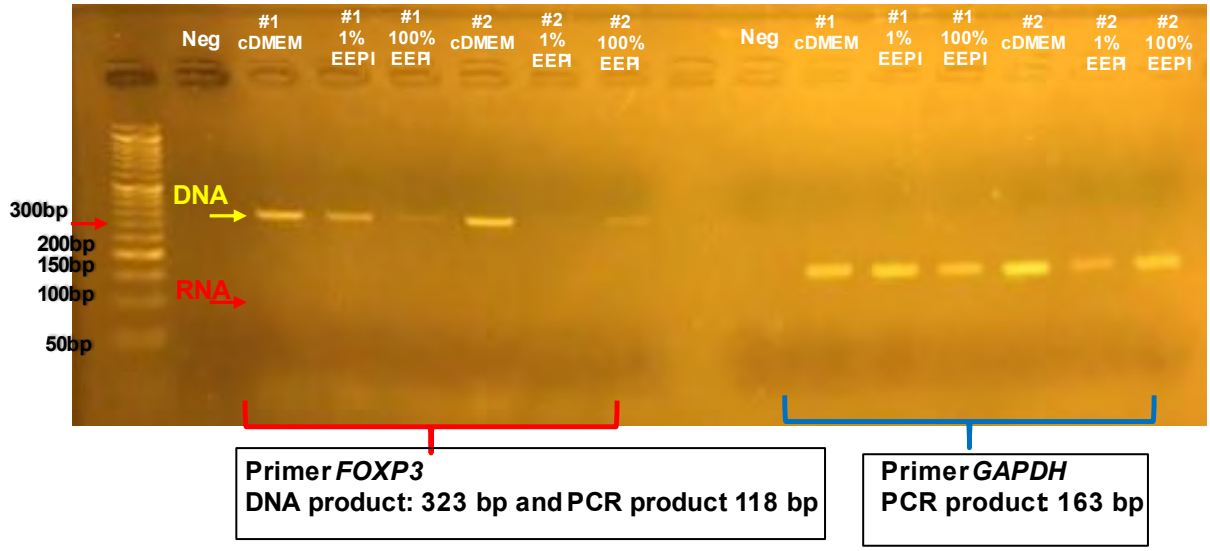
ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ Melting temperature และ ค่าเปอร์เซ็นต์ GC ของ Forward และ Reverse Primer ในยีน *FOXP3*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	Tm (°C)	% GC
FOXP3	F: 5’ ACAATGTCTCCTCCAGAGAGA 3’	55.5	47.6
	R: 5’ AGCCTTGGTCAGTGCCATTTT 3’	58.4	47.6

4.3.2. พิสูจน์การแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A

เมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มาใส่สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่ค่าใกล้เคียง IC50 เท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ที่ค่า IC50 เท่ากับ 247.037 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) นำมาสกัด RNA มาเข้ากระบวนการ PCR เพื่อทำให้เป็น cDNA ต้นแบบ มาเพิ่มปริมาณยีน *FOXP3* แล้วนำ PCR Product ผ่านการทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อตรวจสอบว่าสารสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็น

องค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* หรือไม่ ผลจากการทดลองดังรูปที่ 15 ผลที่ได้คือพบ band ที่เป็น DNA จาก PCR product ของยีน *FOXP3* ขนาด 323 bp และพบ band ที่เป็น RNA จาก PCR product ของยีน *GAPDH* ขนาด 163 bp ที่มีความเข้มของ band ที่ไม่เท่ากัน เมื่อทดสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกทดลองด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% และอาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM)



รูปที่ 16 ผลการแสดงออกของยีน *FOXP3* และ *GAPDH* จาก cDNA ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A จากการให้สารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% (สูตรที่ 6) โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดย Neg คือ Negative control, cDMEM คือ อาหารเลี้ยงเซลล์, 1% และ 100% EEPI คือ สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและ สรุปผลการดำเนินการ

5.1. อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ส่งผลต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวทั้งในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิด C33A และ SiHa ตามลำดับ รวมไปถึงเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 ด้วยเช่นกัน อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ที่ส่งผลต่อการต่อต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้ดีกว่าเซลล์ไตปกติชนิด HEK-293 เมื่อเทียบจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเซลล์ที่ลดลงครึ่งหนึ่ง (Inhibitory Concentration : IC50) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในช่วงเวลาการบ่มที่เท่ากัน เนื่องจากเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งผ่านทางระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงมีความสามารถในการกระตุ้นผ่านกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์มะเร็ง (Dong et al., 2015) แต่ไม่สามารถหาค่า IC50 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A อาจเป็นผลจากสารละลายที่สกัดได้ถูกนำมาใช้ต่างช่วงเวลากันและถูกแช่เย็นโดยเก็บไว้ในสถานะของเหลวเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดการเสื่อมประสิทธิภาพของสารละลายของเหลวที่สกัดได้ อีกทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ อาจถูก subculture ไม่มากพอส่งผลทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A มากกว่าปกติ

จากการศึกษาของ Luo et al. 2015 พบว่าเมื่อมีการแสดงออกของยีน *FOXP3* อาจทำให้เซลล์มีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็งมากขึ้น เนื่องมาจากมีความสามารถในการกดภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ regulatory T cell ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ Effector T cell เช่น CD helper T cells, Cytotoxic T cells เป็นต้น (Verma et al., 2019) จึงสันนิษฐานว่ายีนดังกล่าวควรเกิดการแสดงออกมากขึ้นภายในเซลล์มะเร็งปากมดลูกปกติชนิด C33A เนื่องจากไปมีผลกระตุ้นให้หลั่งสาร cytokine ชนิด IL-10 และ TGF-β ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแพร่กระจายมากขึ้น (Verma et al., 2019) แต่เมื่อนำมาศึกษาผลการทดลองโดยจำลองสภาพภายในเซลล์ พบว่าเมื่อนำเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ที่ไม่ได้ทดลองด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% เมื่อนำมาทดสอบ พบว่าไม่เกิดการแสดงออกของยีน *FOXP3* จึงได้นำมาเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็ง

ปากมดลูกชนิด C33A ที่ถูกทดลองด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์ทั้งสองสูตรข้างต้น ผลการทดลองที่ได้คือไม่ปรากฏการแสดงออกของยีน *FOXP3* ทำให้คาดว่าอาจไม่เกิดการแสดงของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A อาจเนื่องมาจากปัจจัยจากการแสดงออกของโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น CD39 CD73 เป็นต้น (Dai et al., 2016) รวมถึงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) อาจสันนิษฐานว่าไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จึงเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบอาจทำให้ไม่สามารถทำนายการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ เนื่องจากเกิดข้อจำกัดของกระบวนการ PCR โดยไม่สามารถทำ PCR Reaction ให้เป็น duplex ได้ซึ่งเป็นวิธีที่ควรใช้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *FOXP3* และ *GAPDH* เพื่อใช้เปรียบเทียบ ซึ่งใช้ยีน *GAPDH* เป็นยีน house keeping เพราะพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในทุกเซลล์ที่มีชีวิต แต่เลือกใช้เป็นการทำ PCR Reaction เป็นแบบ Simplex แทน ผลการทดลองที่ได้คือ ไม่ปรากฏ band ที่เป็น RNA product แต่ขึ้น band ที่เป็น DNA product ของยีน *FOXP3* เมื่อนำมาหาค่า optical density ในตัวอย่างที่ได้มากจากการสกัด RNA พบว่ามีค่าในตัวอย่างไม่ใกล้เคียงค่ามาตรฐาน ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัด RNA แต่ปรากฏ band ของยีน *GAPDH* ที่เป็นขนาดของ RNA product โดยความเข้มของ band ไม่เท่ากัน คาดว่าอาจเกิดจากการเสื่อมของ RNA รวมไปถึง ข้อจำกัดในการทำ conventional PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่สามารถระบุได้ว่ารอบที่เท่าใดเป็นรอบแรกในการแสดงของ band ที่ปรากฏ จึงเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบอาจทำให้ไม่สามารถทำนายการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้

ดังนั้นข้อเสนอแนะสำหรับแนวทางในการศึกษาต่อไป ควรศึกษาในกระบวนการ BrDu assay เพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อทดลองด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% เพื่อใช้เปรียบเทียบกับค่า IC50 ที่ได้จากการวัดระดับการมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิด หากไม่สามารถทำกระบวนการ BrDu assay ได้โดยตรงอาจสามารถวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดต่างๆ ทางอ้อมด้วยกระบวนการ MTT assay ที่เวลาหลังจากเซลล์ถูกเลี้ยงในสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% เป็นเวลา 48, 54 และ 56 ชั่วโมง เพื่อดูแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมกลูดและเซลล์ไตปกติ อีกทั้งควรทำการทดลองโดยทดสอบรอบของการทำ PCR ในช่วงที่น้อยกว่า 30 รอบ เพื่อให้สามารถระบุได้ว่า band ที่ขึ้นไม่ได้เป็นผลมาจากการขึ้นที่คงที่ของ band ใน PCR Product นอกจากนั้นควรศึกษาการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์มะเร็ง

หลากหลายชนิดที่ไม่ถูกให้สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ก่อนเพื่อเปรียบเทียบกับการทดลองเมื่อให้สารสกัดดังกล่าวว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยควรศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เนื่องจากมีการติดเชื้อไวรัส HPV (Xu et al., 2015) อาจกระตุ้นให้ส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยคาดว่าเมื่อนำเซลล์ SiHa มาทดสอบด้วยสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% อาจทำให้ทราบถึงกลไกการแสดงออกของยีน *FOXP3* ได้เข้าใจมากขึ้น อีกทั้งควรศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์ไตปกติ HEK-293 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เป็นต้น เพื่อยืนยันบทบาทหน้าที่ในการแสดงออกของยีน *FOXP3* ทั้งในเซลล์ปกติ เซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ที่ไม่ได้ถูกทดลองและถูกทดลองด้วยสารสกัดมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1%

5.2. **สรุปผลการดำเนินการ**

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิดได้แก่ C33A SiHa และเซลล์ไตปกติ HEK-293 เพื่อต้องการศึกษาผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% (สูตรที่ 6) สามารถส่งผลต่อการมีชีวิตในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ จากผลการทดลองแบบจำลองสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ (*In Vitro*) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นในช่วง 100 200 300 400 และ 513 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการมีชีวิตของเซลล์ปากมดลูกและเซลล์ไตปกติลดลงตามความเข้มของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ส่งผลให้เห็นว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์ไตปกติเมื่อเทียบจากค่า IC50 (Inhibitory Concentration) เท่ากับ 488.376 ± 18.438 และ 505.549 ± 58.875 ตามลำดับ ในช่วงความเข้มข้นที่เท่ากัน ผลการทดลองของสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ต่อการแสดงออกของยีน *FOXP3* ในเซลล์ปากมดลูกชนิด พบว่าสารสกัดอาจไม่สามารถสรุปได้ว่าส่งผลต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าว ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ ดังนั้นสำหรับการใช้สารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% เพื่อนำมาใช้เป็นยาในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกหรือผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันอื่นๆ จะต้องมีการตรวจสอบประสิทธิภาพของไตในการกรองของเสียเพิ่มขึ้น เนื่องจากผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวส่งผลต่อการลดลงของเซลล์ไตเช่นกัน จึงต้องควรอยู่ภายใต้คำแนะนำของแพทย์ เนื่องจากการรักษาด้วยยาสมุนไพรดังกล่าวสามารถส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

พงศกร เชื่อมไมตรี. 2556. เซลล์หน่วยความจำและภูมิคุ้มกันของร่างกาย. *เชียงใหม่สัตวแพทย์สาร* 11(1): 87-104

อนุสิษฐ์ เกื้อกูล. ชนิดของสสารและการจำแนก [ออนไลน์]. 2017, แหล่งที่มา: https://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/8798-2018-09-21-02-09-12. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ [19 พฤศจิกายน 2563]

Ajith, T.A. and Janardhanan, K.K. 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, Phellinus rimosus (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3): 157-162.

Al-Daraji, W.I. and Smith, J.H. 2009. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2(1): 48.

Bandukwala, H. S., et al. 2011. Structure of a domain-swapped *FOXP3* dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* 34(4): 479-491.

Bhatla, N., et al. 2019. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 145(1):129-135.

Brisson, M. and Drolet. M. 2019. Global elimination of cervical cancer as a public health problem. *The Lancet Oncology* 20(3): 319-321.

Bruni L., et al. 2019. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Thailand Summary Report *17* (June 2019): 1-76.

Chen, H., et al. 2016. Traditional uses, fermentation, phytochemistry and pharmacology of *Phellinus linteus*: a review. *Fitoterapia*, 113: 6-26.

Chu, R., et al. 2015. Inhibition of *Foxp3* in cancer cells induces apoptosis of thyroid cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 399: 228-234.

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

Dai, R., Wang, L., and Shi, G. 2016. The role of *CD39* and *CD73* expressed by regulatory T cell in the pathogenesis of asthma in mice. *European Respiratory Journal*. 48: 1399-3003.

Dong, Y., et al. 2015. Ultrahigh performance liquid chromatography with synapt high-definition mass spectrometry and a pattern recognition approach to characterize chemical constituents and rat metabolites after the oral administration of Phellinus igniarius. *Journal of Separation Science 38*(7): 1137-1148.

Gao, W., et al. 2017. Antitumor and immunomodulating activities of six *Phellinus igniarius* polysaccharides of different origins. *Experimental and therapeutic medicine* 14(5): 4627-4632.

Hayatsu, N., et al. 2017. Analyses of a mutant Foxp3 allele reveal BATF as a critical transcription factor in the differentiation and accumulation of tissue regulatory T cells. *Immunity*, *47*(2): 268-283.

Kuranaga, E. 2012 Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells* 17, 83–97

Lee, I. K., et al. 2011. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *phellinus* and *inonotus spp*. and their medicinal importance. *The Journal of Antibiotic* 64: 349–359.

Leung, A.Y., 2006. Traditional toxicity documentation of Chinese Materia Medica1 an overview. *Toxicologic Pathology* 34(4): 319-326.

Li, S.C., et al. 2015. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. *Carbohydrate Polymers* 133: 24-30.

Lombard, Y. J. 1994. A new method for studying the binding and ingestion of zymosan particles by macrophages. *The Journal of Immunological Methods* 174: 155–163.

Luo Q., et al. 2015. Roles of *FOXP3* in the occurrence and development of cervical cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8: 8717-8730.

Mao, X. L. 2000. The macrofungi in China. Zhengzhou. *Henan: Science and Technology Press*, 483-96.

Martin, F., et al. 2010. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 29(29): 4121-4129.

Medicalhealthguides. Staging of Cervical Cancer. Gynecology [Online]. 2019. Available from: http://medicalhealthguides.blogspot.com/2015/08/staging-of-cervical-cancer.html [2021, July 26]

Seifi, M., et al. 2012. Overview of real-time pcr principles. *Polymerase Chain Reaction*, pp. 39.

Shon, Y. H., and Nam, K. S. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology* 77(1): 103-109.

Song, T. Y., et al. 2008. Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linnearus: Fries) quelet. *Journal Ethnopharmacol* 115: 50–56.

Stoddart, M. J. Cell viability assays: chapter 3: estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. In, Methods in molecular biology, pp.13. Clifton, N.J., 2011.

Sylvester, P.W. Optimization of tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In, Methods in Molecular Biology, pp.157-168. Clifton, N.J., 2011.

Ultimatemushroom. About the *Phellinus igniarius* Mushroom [Online]. Avalible from : https://ultimate-mushroom.com/poisonous/175-phellinus-igniarius.html [2021, July 26]

Verma, A., et al. 2019. T-regulatory cells in tumor progression and therapy. *Cancer management and research* 11:10731.

Wang, F. F., et al. 2018. Medicinal mushroom *Phellinus igniarius* induced cell apoptosis in gastric cancer SGC-7901 through a mitochondria-dependent pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102: 18-25.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258-274.

Xu, F., et al. 2015. Integration of the full-length HPV16 genome in cervical cancer and Caski and Siha cell lines and the possible ways of HPV integration. *Virus Genes* 50(2): 210-220.

Yan, D. D., et al. 2019. Prognostic value of the 2018 FIGO staging system for cervical cancer patients with surgical risk factors. *Cancer Management and Research* 11: 5473.

Yan, J. K., et al. 2017. Advances in antitumor polysaccharides from *Phellinus* Sensu lato: Production, isolation, structure, antitumor activity, and mechanisms. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition* 57(6): 1256-1269.

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 And Technology* 18(1): 4–19.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1.1. เตรียมผง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 ซอง แล้วเทลงขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำที่ผ่านการautoclave 900 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.2. ชั่งผงโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปริมาณ 3.7 กรัม ลงในขวดข้อ 1.1

1.3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

1.4. หยดกรดไฮโดรคลอริก วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH Meter ให้ค่าอยู่ประมาณ 7.20

1.5. นำไปกรองด้วยเครื่องกรอง

1.6. เก็บเพื่อใช้ต่อไป

2. การเตรียม Complete DMEM (500 ml)

2.1. เติมDMEM จากที่เตรียมไว้ ปริมาตร 445 มิลลิลิตร ลงในขวด 500 มิลลิลิตร

2.2. เติม Fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดข้อ 2.1.

2.3. เติม Antibiotic-Antimycotic (100x) 5 มิลลิลิตร

3. Cell trypsinization

3.1. ทำการเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า (media) ภายในขวดเลี้ยงเซลล์ T25 ทิ้งไป

3.2. ล้างขวดเลี้ยงเซลล์ T25 ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) 5 มิลลิลิตร

3.3. เติมสารละลาย trypsin ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

3.4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 3-5 นาที

3.5. นำขวดเลี้ยงเซลล์ T25 มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์ไม่หลุดให้เคาะเล็กน้อย ให้เซลล์มีลักษณะแยกตัวกันเป็นเซลล์เดี่ยวไม่เกาะกลุ่มกัน

3.6. หยุดปฏิกิริยาของสาร trypsin ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) 1.5 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงให้สารผสมเข้ากัน

3.7. นำมาใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ T25 ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) 5 มิลลิลิตร ตามปริมาณที่ต้องการให้เซลล์เจริญเติบโตในแต่ละการทดลอง

4. การนับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer

4.1. หลังจากการ Cell trypsinization นำสารละลายเซลล์ใส่ลงในหลอด 2 มิลลิลิตร

4.2. นำไป spin-down เป็นเวลา 5 นาที

4.3.ดูดส่วนใสออก (supernantant) ประมาณ 750 ไมโครลิตร

4.4.เจือจางสารละลายเซลล์โดยใส่ประมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) 4 มิลลิลิตร

4.5.นำสารละลายที่มีเซลล์อยู่หลังจากเจือจางมา 10 ไมโครลิตร กับอาหารเลี้ยงเซลล์ (cDMEM) 90 ไมโครลิตร

4.6. นำสารละลายที่มีเซลล์อยู่ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย trypan blue stain 10 ไมโครลิตร

4.7.นำสารที่ผสมเข้ากันดีแล้วมา 10 ไมโครลิตร ใส่ใน hemocytometer glass

4.8. นับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เครื่องนับจำนวน

4.9. คำนวณปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{จำนวนเซลล์ (cell/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้}}{5} \times 10 \times 2 \times 10^4$$

คำนวณปริมาณสารละลายที่บรรจุปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้

$$\text{ปริมาณสารละลาย(มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ}}{\text{ปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร}}$$

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

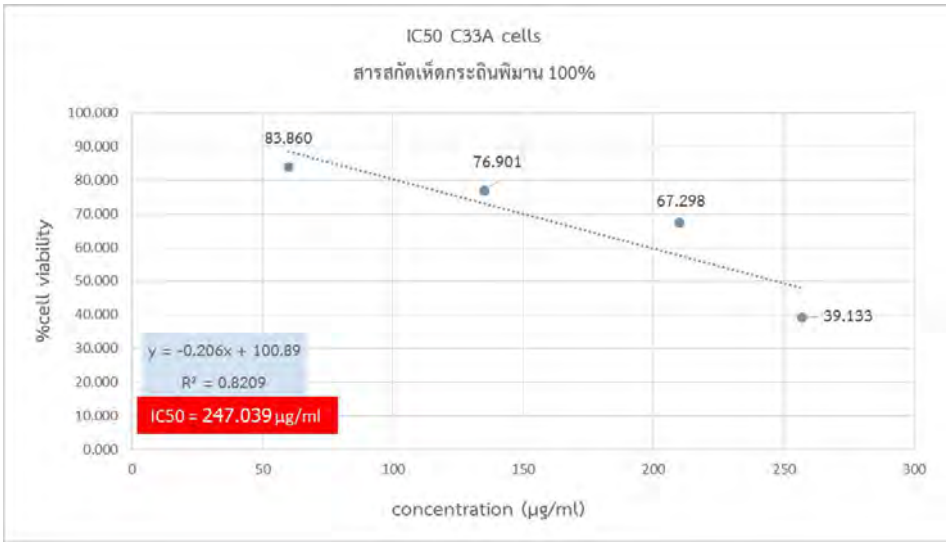
ชนิดของสาร	ความเข้มข้นที่ปริมาตรสุดท้าย	ปริมาตร
dNTP Mix	1 mM	2
RNase Inhibutor	1U/µl	0.5
Oligo $(dT)_{12-18}$	0.25 µM	0.5
5x Reverse Transcriptase Buffer	1x	4
RNA template	100ng	12 µg
RevertUP™ II Reverse Transcriptase	10U/µl	1
	ปริมาตรรวม	20 µl

ตารางที่ 5 ตารางค่า Obtical Density ของการสกัด RNA จากเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A ต่อสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% และสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100%

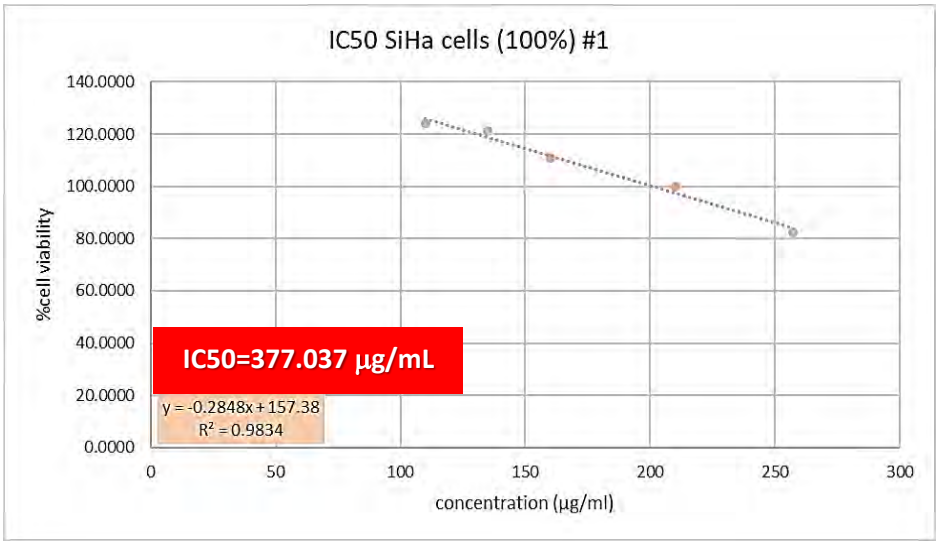
ตัวอย่าง	A260	A280	O.D. 260/280
	ng/µl		
C33A เมื่อถูกเลี้ยงในให้สาร cDMEM ซ้ำ 1	6.804	3.789	1.80
C33A เมื่อถูกให้สาร cDMEM ซ้ำ 2	8.455	4.245	2.00
C33A เมื่อถูกเลี้ยงในสารสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซ้ำ 1	0.231	0.143	1.62
C33A เมื่อถูกเลี้ยงในสารสารสกัดของผลิตภัณฑ์สูตรที่ 6 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 1% ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซ้ำ 2	0.256	0.135	1.90
C33A เมื่อถูกเลี้ยงในสารสารสกัดของผลิตภัณฑ์เห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซ้ำ 1	0.432	0.276	1.57

C33A เมื่อถูกเลี้ยงในสารสารสกัดของผลิตภัณฑ์เห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% ที่ความเข้มข้น 247.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซ้ำ 2	0.245	0.114	2.15

ภาคผนวก ข



ภาพกราฟผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33A



ภาพกราฟผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

ภาพกราฟผลของสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเห็ดกระถินพิมาน 100% ต่อระดับการมีชีวิตของเซลล์ไตชนิด HEK-293