



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ต่อการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
Effect of product from *Phellinus igniarius* formula 4 on regulation of *IL-19* gene expression in cervical cancer cell.

ชื่อนิสิต นางสาวมลฐิภรณ์ ธิติสิริเวช เลขประจำตัว 6032143023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ต่อการแสดงออกของยีน *IL-19*
ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นางสาวมลฉุกรณ์ ธิติสิริเวช

6032143023

โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

Effect of product from *Phellinus igniarius* formula 4 on regulation of *IL-19* gene expression in cervical cancer cell.

Miss Monthiporn Thitisiriwech

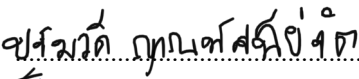
6032143023


A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For the Degree of Bachelor of Science
Genetics program, Department of Botany
Faculty of Science , Chulalongkorn University
Academic Year 2020


ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์(ภาษาไทย)	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ต่อการแสดงออกของยีน <i>IL-19</i> ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์(ภาษาอังกฤษ)	Effect of product from <i>Phellinus igniarius</i> formula 4 on regulation of <i>IL-19</i> gene expression in cervical cancer cell.
ชื่อนิสิต	นางสาวมลฐิภรณ์ ธิติสิริเวช
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์นัยจิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยีทอง
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของภาคการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์นัยจิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยีทอง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ต่อการแสดงออกของยีน <i>IL-19</i> ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	มลฐิภรณ์ ชิตสิริเวช
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐุมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งอันดับที่สองในมะเร็งที่เกิดกับเพศหญิงโดยมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสเอชพีวี การสูบบุหรี่ และภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง อีกทั้งโรคนี้ยังสามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยเห็ดกระถินพิมานเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ และมีการใช้เป็นยาอย่างแพร่หลาย เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมานพบโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้โดยอาจกระตุ้นการฆ่าตัวของเซลล์ การยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ หรือการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน ผู้ศึกษาจึงสนใจนำสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมานได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอกชนแห่งหนึ่งโดยมีสัดส่วนของเห็ดกระถินพิมาน 20% (w/w) มาสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกซึ่งทดสอบด้วย MTT assays พบว่า 50% inhibitory concentration (IC50) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a และ SiHa คือ 429.953 และ 454.379 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a มากที่สุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไต HEK293T น้อยที่สุด เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19* พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์ปากมดลูกชนิด C33a

คำสำคัญ: โพลีแซคคาไรด์, มะเร็งปากมดลูก, เห็ดกระถินพิมาน

Title	Effect of product from <i>Phellinus igniarius</i> formula 4 on regulation of <i>IL-19</i> gene expression in cervical cancer cell.
Student name	Monthiporn Thitisiriwech
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pattamawadee Yanatatsaneejit
Co-Advisor	Assist. Prof. Dr. Patra Yeetong
Academic year	2020

บทคัดย่อ

Cervical cancer is the second common female cancers caused by the Human Papilloma Virus (HPV), smoking and immunodeficiency. The disease is also sexually transmitted. There are natural herb such as mushrooms that can be a medicine. *Phellinus igniarius* is one kind of herb medicine that widely used. The extract from this mushroom consisted of polysaccharide which can inhibit tumor growth in several ways such as inhibit cell cycle and stimulate apoptosis in cancer cells and activate the immune system. In this study, sample is a crude powder that contains with *Phellinus igniarius* at 20% (w/w). Polysaccharide in the sample was extracted by using Soxhlet extractor and distilled water was used as a solvent. From the result in cytotoxicity study by MTT assay, 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the extract for C33a and SiHa cell is 429.953 and 454.379 µg/ml respectively. This extract is the most toxic to C33a follow by SiHa and HEK293T. Gene expression study show that *Phellinus igniarius* at 20% (w/w) does not effect on regulation of *IL-19* gene expression in C33a cells.

Keywords; *Phellinus igniarius*, Polysaccharide, Cervical cancer

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทธา ยี่ทอง ที่ให้คำปรึกษาในการทำโครงการวิทยาศาสตร์ชั้นนี้ ตลอดจนชี้แนะในเรื่องการเขียนเล่มโครงการให้สามารถสำเร็จลุล่วงตามระยะเวลาที่กำหนด

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อสถานที่ รวมถึงเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในโครงการ

ขอขอบพระคุณ บริษัท เนเจอร์ เฮิร์บ อินเตอร์เนชั่นแนล โฮลดิ้ง จำกัด ที่สนับสนุนสมุนไพรสำหรับการทำโครงการวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณบุคลากร รุ่นพี่ และ เพื่อน ๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคน สำหรับคำปรึกษา การให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญตาราง	ญ
บทที่	
1 บทนำ	11
2 การตรวจเอกสาร	13
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน	22
4 ผลการทดลอง	32
5 อภิปรายและสรุปผล	46
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	
ก	52
ข	53

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1 ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จาก <i>Phellinus igniarius</i>	16
2 แผนผังแสดงการทำงานของ IL-19	19
3 แผนผังการทำงานของ IFN- γ signaling pathway	21
4 การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet extraction	24
5 ตำแหน่งการทดลองในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม	26
6 ตำแหน่งการทดลองในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม	28
7 ค่าการยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์ C33a ให้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)	33
8 ค่าการยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa ให้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)	34
9 ค่าการยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์ไต HEK293T ให้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)	35
10 ค่าแสดงระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4	36
11 ค่าการยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์ C33a ให้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4	37
12 ค่าแสดงระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4	38
13 ค่าการยับยั้งความมีชีวิตรอดของเซลล์ SiHa ให้ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4	39
14 ค่าแสดงระดับความมีชีวิตของเซลล์ไต HEK293T	40
15 การแสดงออกของยีน <i>IL-19</i> ในเซลล์ไต HEK293T	41
16 การแสดงออกของยีน <i>IL-19</i> ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a	42

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับการรักษาเมะเร็งปากมดลูก	14
2 ค่า IC50 ของสารสกัดจากหัวข้าวเย็นเหนือ แสดงฤทธิ์การยับยั้งการผลิต TNF- α และ NO	17
3 ผลของสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้ต่อการหลั่งของ NO และ TNF- α	18
4 การย้อมสีเนื้องอกเพื่อดูการแสดงออกของ IL-19	19
5 ลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดของไพรเมอร์ของยีน <i>IL-19</i> , <i>IFNGR1</i> และ <i>GAPDH</i>	29
6 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC50 ที่ช่วงเวลา 48 ชั่วโมงของเซลล์	41
7 ค่าความเข้มข้น	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการงาน

ในปัจจุบันมะเร็งปากมดลูกมีอัตราการเกิดโรคเป็นอันดับที่สองในบรรดามะเร็งที่เกิดกับเพศหญิง โดยร้อยละ 70 มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสเอชพีวี (Human Papilloma Virus; HPV) รองลงมาคือการสูบบุหรี่ และภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง เชื้อไวรัสเอชพีวีสามารถติดต่อได้จากการมีเพศสัมพันธ์ เมื่อได้รับเชื้อแล้วจะไม่วินิจฉัยจนกว่าจะเกิดการก่อตัวเป็นมะเร็ง บางรายเชื้อเอชพีวีใช้เวลาถึง 10 ปี ในการก่อตัวเป็นมะเร็งจึงไม่สามารถรับการรักษาได้ทัน จากการรายงานอัตราการเสียชีวิตของโรคมะเร็งปากมดลูกจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้รายงานว่ามีอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งปากมดลูกสูงถึง 5,200 รายต่อปี และพบผู้ป่วยใหม่ 10,000 รายต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นถึงความต้องการในการใช้ยารักษาที่สูงขึ้นด้วย (ศุภกร พิทักษ์การกุล, 2551)

อีกสาเหตุหนึ่งคือการมีอนุมูลอิสระที่มากเกินไปสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และระบบภูมิคุ้มกัน อนุมูลอิสระทำให้เกิดการเสื่อมถอยของร่างกายและอาจทำให้เกิดโรคร้ายแรงหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ เบาหวาน และมะเร็ง ในปัจจุบันนิยมบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันโรคต่างๆ แต่สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน ต้นทุนการผลิตที่สูง และมีความเป็นพิษสูง ดังนั้นความสนใจจึงมุ่งไปที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติโดยเฉพาะเห็ดที่ใช้เป็นยารักษาโรคที่มีความเป็นพิษ และผลข้างเคียงต่ำ (Muriel and Rivera-Espinosa, 2008)

ปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคอย่างแพร่หลายรวมถึงโรคมะเร็ง ผู้ทดลองจึงสนใจนำสูตรตำรับสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมานมาทำการศึกษาเนื่องจากมีรายงานว่าเห็ดกระถินพิมานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกในหนู โดยการหยุดวัฏจักรของเซลล์ ทำให้มีการตายของเซลล์มะเร็งปอด และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หยุดวัฏจักรของเซลล์เมื่อสารพันธุกรรมเกิดความเสียหายเพื่อให้มีการซ่อมแซมความเสียหายนั้น นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมต่อต้านมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งรังไข่ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Kim et al., 2015) โดยได้รับความอนุเคราะห์สูตรตำรับสมุนไพรมาจากบริษัทเอกชนแห่งหนึ่ง ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวมีทั้งหมด 6 สูตร แต่ละสูตรจะมีสัดส่วนของเห็ดกระถินพิมานที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำสมุนไพรสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) หัวข้าวเย็นเหนือและหัวข้าวเย็นใต้ มาศึกษาผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด คือ SiHa และ C33a และเซลล์ไตปกติ 1 ชนิด คือ HEK293T ด้วยวิธี MTT assay

เนื่องจากการกล่าวอ้างสรรพคุณของสมุนไพรดังกล่าวในด้านความสามารถในการรักษาโรคเบาหวาน ภูมิคุ้มกัน และโรคเมตาบอลิซึม ซึ่งโรคเหล่านี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่ผลของสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ยีน *Interleukin19 (IL-19)* และยีน *IFNGR1* ซึ่ง *IL-19* มีหน้าที่ในการต่อต้านการอักเสบโดยลดการสร้างแอนติเจน (Cuneo, Herrick, and Autieri, 2010) *IL-19* จึงเป็นไซโตไคน์ที่สามารถยับยั้งหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Gallagher, 2010) และยังมีรายงานว่ามีการแสดงออกในมะเร็งปากมดลูกต่ำกว่าในเซลล์ปากมดลูกปกติ นอกจากนี้พบว่าหลายการศึกษานำยีน *IL-19* มาเป็นสิ่งบ่งชี้ในการตรวจหามะเร็งเต้านม (Hsing et al., 2012) และยีน *IFNGR1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่จะถูกแปลรหัสได้โปรตีน IFN- γ 1 โดยโปรตีน IFN- γ 1 เป็น receptor ของ Cytokine ที่มีชื่อว่า IFN- γ ซึ่งถูกสร้างจาก T helper cell (Th1 cell) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญในการปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้น cytokine เพื่อชักนำให้ Phagocyte สามารถกำจัดไวรัสหรือเซลล์มะเร็งที่อยู่ในร่างกายได้ (Ayers et al., 2017) ด้วยเหตุนี้ผู้ทดลองจึงศึกษาการแสดงออกของยีน *Interleukin19* และยีน *IFNGR1* เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพินานด้วยวิธี RT-PCR

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และการแสดงออกของยีน *IL-19* และ *IFNGR1* เมื่อได้รับผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพินานสูตรที่ 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบถึงฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเห็ดกระถินพินานสูตรที่ 4 ว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเปรียบเทียบกับผลการเจริญของเซลล์ปกติ

1.3.2 ค้นพบยีนที่ได้รับผลกระทบจากสารสกัดจากเห็ดกระถินพินาน เพื่อนำไปศึกษาหากลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อไป

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในส่วนล่างของมดลูกที่เชื่อมต่อกับช่องคลอด เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 4 ในมะเร็งที่เกิดกับผู้หญิงทั่วโลก (Brisson et al., 2019) ในประเทศไทยมีอัตราการเกิดโรคมะเร็ง 6,000 รายต่อปี โดยสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกเกิดจาก Human Papilloma Virus หรือ HPV ซึ่งสามารถติดต่อไปยังบุคคลอื่นได้จากการมีเพศสัมพันธ์ กลุ่มของผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกเริ่มในช่วงอายุ 20-29 ปี และมีจำนวนมากผู้ป่วยที่สุดคือช่วงอายุ 55-64 ปี (ภุขงค์ ลิขิตธรรมสมบัติ, 2558)

2.1.1 ปัจจัยเสี่ยงและการป้องกัน

ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เริ่มจากมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย มีคู่นอนหลายคน หรือมีเพศสัมพันธ์กับชายที่มีคู่นอนหลายคน สุกดิบหรือ รับประทานยาคุมกำเนิดติดต่อกันเป็นเวลานานมากกว่า 5 ปี มีประวัติการเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เช่น ซิฟิลิส หนองใน เริม (Small et al., 2017) การป้องกันสำหรับกลุ่มอายุ 9-26 ปีที่ยังไม่เคยมีเพศสัมพันธ์สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัส HPV ได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก (Kessler, 2017) และในกลุ่มอายุ 25-65 ปีที่เคยมีเพศสัมพันธ์ควรเริ่มตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก หลังจากมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรกภายใน 3 ปี สามารถตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกได้ 3 วิธี (Kessler, 2017)

1. การตรวจทางเซลล์วิทยา (cervical cytology) ปัจจุบันสามารถตรวจได้ด้วย 2 เทคนิคคือ conventional Papanicolaou smear และ liquid-based cytology โดยทั้ง 2 เทคนิคใช้อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเยื่อจากบริเวณปากมดลูกเช่นเดียวกัน แต่ liquid-based cytology จะนำเซลล์ทั้งหมดใส่ของเหลวเพื่อนำเข้าเครื่องสำหรับเตรียมเซลล์เยื่อผิวให้ปราศจากสิ่งปนเปื้อนช่วยเพิ่มโอกาสให้พยาธิแพทย์ตรวจพบความผิดปกติได้มากขึ้น ความถี่ระยะการตรวจคัดกรองเป็นทุก ๆ 2-3 ปี

2. การตรวจทางเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาไวรัสเอชพีวี (HPV DNA testing) โดยการตรวจหาเชื้อเอชพีวีมี 2 แบบคือ HPV DNA testing เป็นการตรวจหาเชื้อ high-risk HPV โดยรวม ไม่ระบุสายพันธุ์ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก และ HPV DNA genotyping เป็นการ

ตรวจระบุสายพันธุ์ของเชื้อ HPV ซึ่งจะให้ความสำคัญกับการตรวจหาเชื้อ HPV 16 และ HPV 18 (Smith et al., 2007)

3. การส่องกล้องตรวจความผิดปกติของปากมดลูก (Colposcopy) เมื่อมีผลตรวจแปปสเมียร์ผิดปกติ (Kessler, 2017)

2.1.2 การรักษา

จากตารางแบ่งระยะของโรคมะเร็งปากมดลูกเป็น 4 ระยะโดยบางระยะอาจมีระยะย่อยคือ A และ B ที่ระยะ IA และ IB จะมีลักษณะทางคลินิกเป็นการรุกรานขนาดเล็ก ทำการรักษาโดยการผ่าตัดมดลูกและการรักษาด้วยรังสี ระยะ IB เป็นระยะที่เริ่มมีเนื้องอกไม่เกิน 4 เซนติเมตร จะรักษาโดยการผ่าตัดมดลูก ทำเคมีบำบัด และรักษาด้วยรังสี ระยะ IIA รักษาด้วยการผ่าตัดมดลูก ตัดต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน ให้ยาเคมีบำบัดรวมกับการฉายรังสี ระยะ IIB IIIA IVA และ IVB จะรักษาโดยการประคองอาการและให้ยาเคมีบำบัดรวมกับการฉายรังสี (Waggoner, 2003)

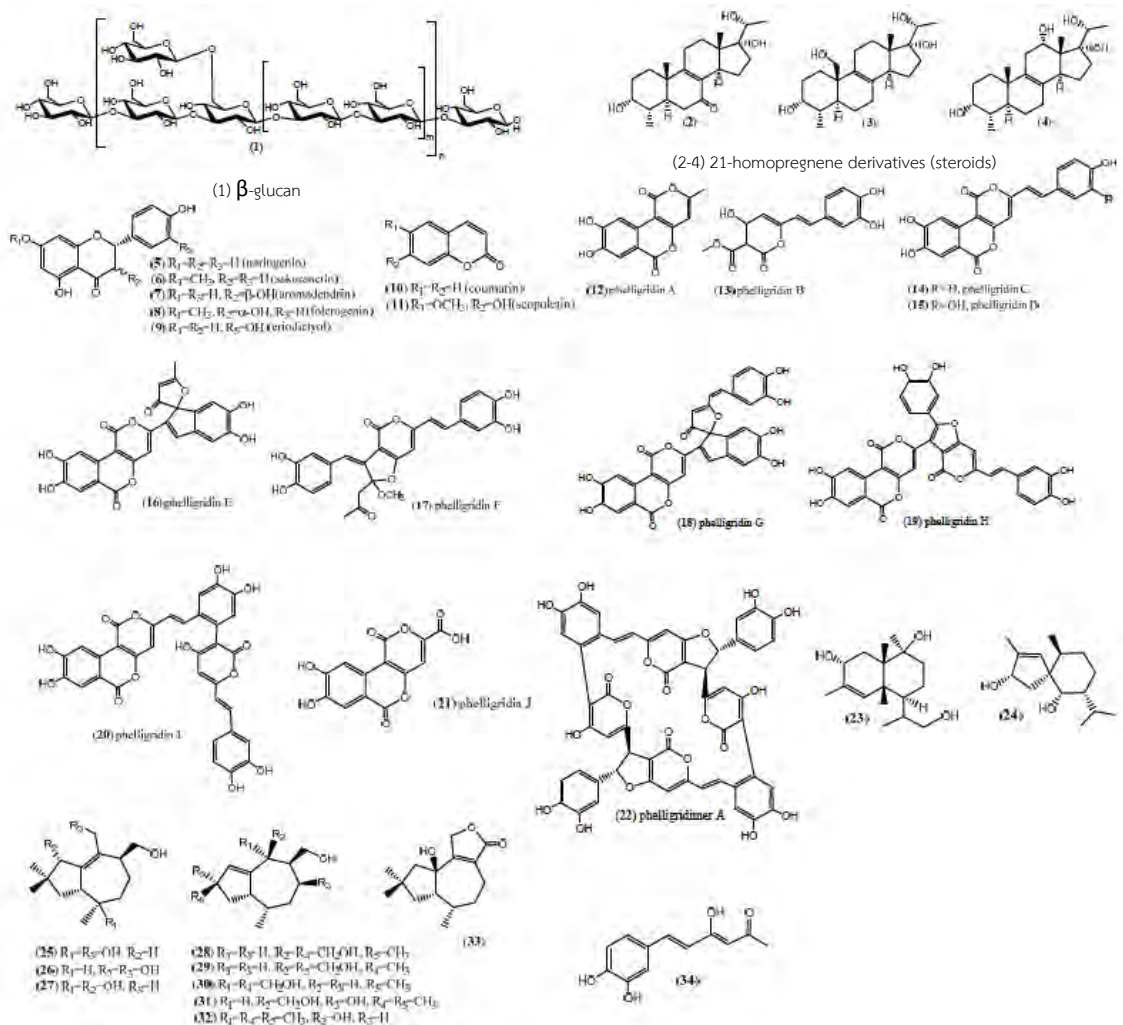
ตารางที่ 2.1 ลำดับการรักษา มะเร็งปากมดลูก (Waggoner, 2003)

ระยะ	ลักษณะทางคลินิก	การรักษา
IA1	การรุกราน ≤ 3 มม. การรุกรานพื้นที่ต่อมน้ำเหลือง	หากผู้ป่วยต้องการมีบุตร : ผ่าตัดปากมดลูก หากไม่ต้องการ : ผ่าตัดมดลูกแบบธรรมดา (ช่องท้องหรือช่องคลอด) การผ่าตัดมดลูกโดยมีหรือไม่มี การตัดต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน
IA2	การรุกราน 3.0-5.0 มม., <7.0 มม.	การผ่าตัดมดลูกด้วยการตัดต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน การรักษาด้วยรังสี
IB1	เนื้องอก ≤ 4 ซม.	การผ่าตัดมดลูกด้วยการตัดต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน รวมกับการทำเคมีบำบัดเพื่อป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำ ปัจจัยทางพยาธิวิทยาที่พยากรณ์โรค การรักษาด้วยรังสี
IB2	เนื้องอก > 4 ซม.	การผ่าตัดมดลูกด้วยการตัดต่อมน้ำเหลืองในอุ้งเชิงกราน รวมกับการให้ยาเคมีบำบัดรวมกับการฉายรังสี การให้ยาเคมีบำบัดรวมกับการฉายรังสี การให้ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสีรวมกับการผ่าตัดมดลูก

ระยะ	ลักษณะทางคลินิก	การรักษา
IIA	2 ใน 3 ของ Upper vagina	การผ่าตัดมดลูกด้วยการตัดต่อมหน้าเหลืองในอุ้งเชิงกราน การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี
IIB	รอยโรคแพร่กระจายไปด้านข้าง	การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี
IIIA	การกระจายลงด้านล่างถึง lower vagina	การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี
IVA	แพร่กระจายในกระดุกเชิงกราน	การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี
IVB	แพร่กระจายระยะไกล	ประคองอาการโดยเคมีบำบัด การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี

2.2 เห็ดกระถินพิมาน

Phellinus igniarius หรือเห็ดกระถินพิมานเป็น polypore mushroom ที่มีประโยชน์เกี่ยวกับทางสุขภาพซึ่งเป็นที่รู้จักกันมาเป็นเวลานาน ในทางการแพทย์เห็ดให้สารที่มีประสิทธิภาพและเป็นเอกลักษณ์ในการส่งเสริมสุขภาพ ถูกใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลายในเอเชียตะวันออก เอเชียใต้ เนื่องจากเห็ดกระถินพิมานแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายเช่นการต่อต้านเนื้องอก ต้านเชื้อแบคทีเรียฆ่าเชื้อรา ฆ่าไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านอาการแพ้ เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและตับ เห็ดกระถินพิมานเจริญเติบโตบนต้นหลิว ต้นเบิร์ช และต้นแอสเพน มีการกระจายตัวรอบโลก เช่น อเมริกาเหนือ ยุโรป จีน และ ญี่ปุ่น มีลักษณะแข็งคล้ายไม้ มีสีน้ำตาลเมื่ออายุน้อย กลายเป็นสีเทาเข้มและดำตามอายุที่มากขึ้น เห็ดกระถินพิมานเป็นเห็ดขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตรหรือมากกว่า เห็ดกระถินพิมานถูกใช้สำหรับรักษาโรคในการแพทย์แผนจีนมายาวนานรวมถึงโรคมะเร็งด้วย (Zapora et al., 2016) เห็ดกระถินพิมานมีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม phenylpropanoid สารกลุ่ม terpenoid และ สารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จากการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าเห็ดกระถินพิมานความสามารถในการต่อต้านการแบ่งเซลล์ (Song et al., 2008) และโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้จากเห็ดกระถินพิมานมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Li et al., 2015) Zapora และคณะได้ศึกษาการแยกสารชีวภาพที่ได้จากเห็ดกระถินพิมานซึ่งแสดงให้เห็นว่าเห็ดกระถินพิมานอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการรักษาโรค ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ (β -glucan 1), steroids (21-homopregnene derivatives 2-4), flavonoids (5-9), coumarins (10 and 11), styrylpyrones (phelligrindines A-J 12 - 21), macrolides (phelligrindimer A 22) (รูปที่ 2.1) (Zapora et al., 2016)



รูปที่ 2.1 ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จาก *Phellinus igniarius* ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ 1 ชนิด steroids 3 ชนิด flavonoids 5 ชนิด coumarins 2 ชนิด styrylpyrones 10 ชนิด macrolides 1 ชนิด และ sesquiterpenes 11 ชนิด (ที่มา Zapora et al., 2016)

มีการแสดงให้เห็นว่าโพลีแซคคาไรด์ที่แยกจาก *P. igniarius* ได้ เช่น hispolon สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเซลล์ได้ และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้ง ในระยะ G0/G1 ของวัฏจักรเซลล์ และการฆ่าตัวตายของเซลล์ในมะเร็งปอด (Kim et al., 2015) และพบว่าสารสกัดจาก *P. igniarius* อาจมีศักยภาพสูงในการรักษาอาการเส้นโลหิตตีบ (Li et al., 2014)

2.3 หัวข้าวเย็นเหนือ

Smilax corbularia Kunth หรือ หัวข้าวเย็นเหนือจัดอยู่ในวงศ์ Smilacaceae เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง มีลำต้นใต้ดินสะสมอาหารในเหง้า ถูกใช้เป็นส่วนผสมสำหรับยารักษาโรคในทางการแพทย์แผนไทยมาอย่างยาวนาน เช่นโรคผิวหนัง โรคมะเร็ง รักษาอาการอักเสบ กามโรคและโรคเรื้อน (Shi-Chao et al., 2006) เหง้าของหัวข้าวเย็นเหนือประกอบด้วย secondary metabolite ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ phenolic compound และ steroid saponin และจากการศึกษาของ Ruangnoo และคณะจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประเทศไทย พบว่าสารสกัดหัวข้าวเย็นเหนือซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิต TNF- α และ NO ในเซลล์ RAW 264.7 (Ruangnoo et al., 2012) ดังตารางที่ 2.2 เนื่องจาก NO เป็นสารตัวกลางในการควบคุมการอักเสบ โดยจะควบคุมการหลั่งของ TNF- α ซึ่ง TNF- α จะทำหน้าที่ในการแบ่งตัวของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ หากมีการหลั่งที่มากเกินไปจะส่งผลให้มีการเกิดมะเร็งได้สองทางคือ 1. การกระตุ้นการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 2. การยับยั้งการตายแบบ apoptosis บริเวณตำแหน่งที่มีการอักเสบซึ่งสัมพันธ์กับระยะ tumor promotion (Pollard, 2004)

ตารางที่ 2.2 ค่า IC50 ของสารสกัดจากหัวข้าวเย็นเหนือที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการผลิต TNF- α และ NO (Ruangnoo et al., 2012)

ผลิตภัณฑ์	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
NO	83.9 \pm 3.8
TNF- α	61.9 \pm 0.9

2.4 หัวข้าวเย็นใต้

หัวข้าวเย็นใต้หรือ *Smilax glabra* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Smilacaceae เช่นเดียวกับหัวข้าวเย็นเหนือ เหง้าของหัวข้าวเย็นใต้ถูกใช้เป็นส่วนผสมสำหรับยารักษาโรคในการแพทย์พื้นบ้านในแถบทวีปเอเชีย หัวข้าวเย็นใต้มีความเป็นพิษต่ออวัยวะภายในไตและอาจมีประโยชน์ในระยะยาวสำหรับโรคที่มีอาการอักเสบเฉียบพลัน เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และตับอักเสบ (Jiang et al., 2003) ในทางการแพทย์แผนจีนมักใช้เพื่อป้องกันโรคฉี่หนู รักษาโรคซิฟิลิส และโรคไตอักเสบ ยิ่งไปกว่านั้นหัวข้าวเย็นใต้ถูกใช้เป็นส่วนผสมสำหรับยารักษาโรคมะเร็งในการแพทย์แผนไทย (Itharat et al., 2004) หัวข้าวเย็นใต้มีองค์ประกอบหลักคือ flavonoids, phenylpropanoid esters และ glycoproteins ซึ่งมีรายงานว่ามียูทิตีต้านไวรัส และต้านการอักเสบ (Galhena, 2012) โดย Lu และคณะจาก Guangzhou University of Chinese Medicine ประเทศจีน ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้าน

การอักเสบโดยศึกษาการหลั่งของ NO และ TNF- α ในเซลล์ RAW264.7 เมื่อได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ที่ความเข้มข้น 1.6, 8, 40 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ (Lu et al.,2014) ดังตารางที่ 2.3 พบว่าการหลั่งของ NO และ TNF- α เมื่อได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้

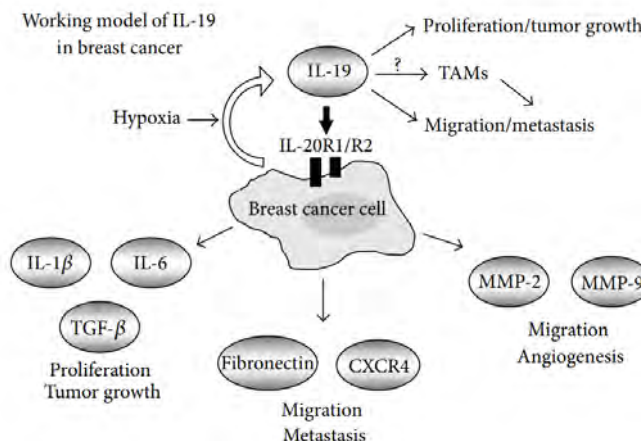
ตารางที่ 2.3 ผลของสารสกัดหัวข้าวเย็นใต้ต่อการหลั่งของ NO และ TNF- α เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ RAW264.7 (Lu et al.,2014)

กลุ่มตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	NO (ng/ml)	TNF- α (pg/ml)
LPS	0.1	9.308 \pm 0.307	3759.263 \pm 496.642
สารสกัดหัวข้าวเย็นใต้	40	5.298 \pm 0.355***	617.741 \pm 197.251***
	8	7.529 \pm 0.410***	1730.369 \pm 325.747 **
	1.6	8.106 \pm 0.323**	2682.134 \pm 349.289*

หมายเหตุ: *, **, และ *** หมายถึง $P < 0.05$, $P < 0.001$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้การกระตุ้นด้วย LPS

2.5 Interleukin19

Interleukin19 หรือ *IL-19* เป็นไซโตไคน์ที่ถูกค้นพบการแสดงออกในหลอดเลือดครั้งแรกในปี ค.ศ. 2005 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ cDNA microarray ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดมนุษย์ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบ (Kelemen, 2005) มีฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด OVCAR-3 (Parrish-Novak, 2002) มีการแสดงออกในเซลล์เนื้องอกหลายชนิดและในมะเร็งเต้านม เมื่อเกิดภาวะการขาดออกซิเจนจะกระตุ้นให้ IL-19 เกิดการจับกับ Interleukin20 Receptor1 (IL-20R1) ประกอบกับ Interleukin20 Receptor2 (IL-20R2) เป็น heterodimer ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณที่อยู่บนเซลล์มะเร็งเต้านมจากนั้นจะส่งสัญญาณโดยตรงกระตุ้นให้เกิดการผลิต IL-6, TNF- α และ TGF- β ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอก กระตุ้นให้เกิดการผลิต Fibronectin และ CXCR4 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดในเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 2.2) (Chen et al., 2013)



รูปที่ 2.2 แผนผังแสดงการทำงานของ IL-19 ที่ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอก การลุกลาม และการสร้างหลอดเลือดในเซลล์มะเร็งเต้านม (Chen et al., 2013)

IL-19 มีกลไกเกี่ยวข้องกับ autocrine ในเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของมะเร็งแสดงให้เห็นว่า IL-19 เป็นตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านม (Chen et al., 2013)

2.5.1 การใช้ไซโตไคน์ IL-19 เป็นสิ่งบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านม

IL-19 แสดงออกในเซลล์เนื้องอกโดยวินิจฉัยจากเนื้อเยื่อด้วยวิธี microarray และ การวิเคราะห์ทางอิมมูโนพยาธิวิทยา กับ anti-IL-19 monoclonal antibody ในเนื้องอก 15 ชนิด (ตารางที่ 2.4) โปรตีน IL-19 ที่ถูกย้อมสีให้ผลเป็นบวกในเซลล์เนื้องอกที่มีชีวิตรอด โดยเฉพาะ squamous cell carcinoma (SCC) ของผิวหนัง ลิ้น หลอดอาหาร ปอด และ invasive duct carcinoma (IDC) ในเต้านม (Hsing et al., 2012)

ตารางที่ 2.4 การย้อมสีเนื้องอกเพื่อดูการแสดงออกของ IL-19 (Hsing et al., 2012)

Tumor Type	IL-19 Immunostaining
Skin, SCC	+
Buccal mucosa, SCC	++
Tongue, SCC	++
Esophagus, SCC	++
Lung, SCC	+
Breast, IDC	++

Tumor Type	IL-19 Immunostaining
Liver, HCC	+
Kidney, RCC	+
Ovary, clear cell carcinoma	+
Bladder, TCC	+/-
Thyroid, papillary carcinoma	+/-
Thymus, thymic carcinoma	+/-
Lymph node, B cell lymphoma	+/-
Stomach, adenocarcinoma	-
Colon, adenocarcinoma	-

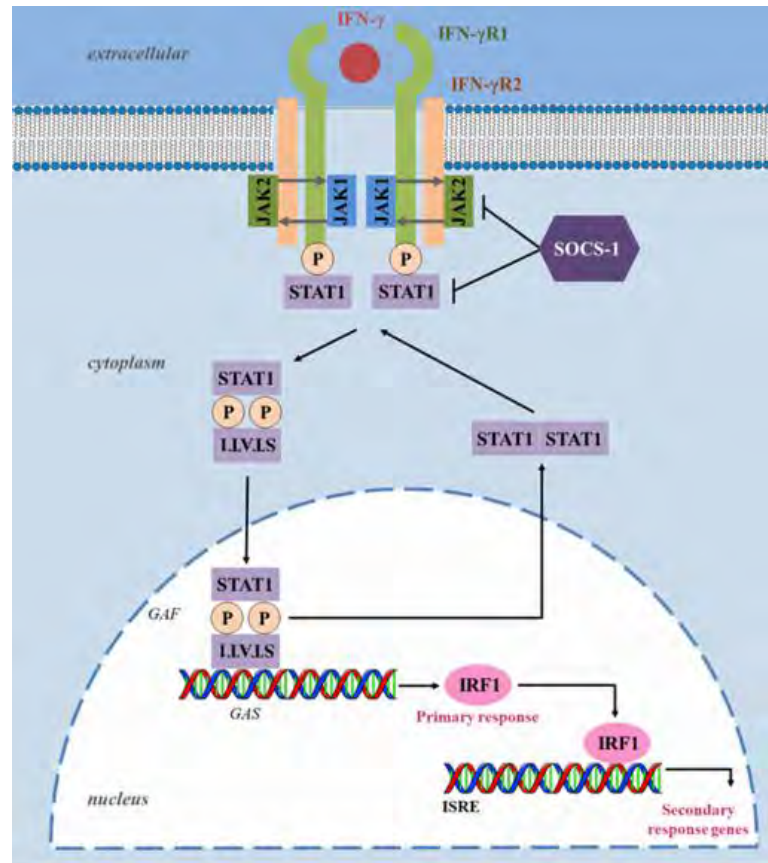
หมายเหตุ : ++ : ติดสีเข้ม , + : ติดสีปานกลาง , +/- : ติดสีอ่อน , - : ไม่ติดสี

SCC : squamous cell carcinoma , IDC : infiltrating duct carcinoma , HCC : hepatocellular carcinoma , RCC : renal cell carcinoma , TCC : transitional cell carcinoma

จากตารางพบว่ามี การย้อมติดสีเข้มในเนื้อเยื่อประเภท Buccal mucosa, Tongue, Esophagus, และ Breast เนื้อเยื่อที่ย้อมติดสีปานกลางได้แก่ Skin, Lung, Liver, Kidney และ Ovary และประเภทเนื้อเยื่อบริเวณที่ย้อมติดสีอ่อน คือ Bladder, Thyroid, Thymus และ Lymph node เนื้อเยื่อที่บริเวณ Colon และ Stomach ย้อมไม่ติดสี (Hsing et al., 2012)

2.6 Interferon gamma receptor 1 (IFN- γ R1)

ยีน *IFNGR1* เมื่อถูกแปลรหัสได้จะได้โปรตีน IFN- γ R1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์โดยจะอยู่เป็น monomer เมื่อมีไซโตไคน์ IFN- γ เคลื่อนเข้ามาใกล้ IFN- γ R1 จะประกบกับ IFN- γ R2 เป็น heterodimer เพื่อจับอย่างจำเพาะกับ IFN- γ (Bernabei et al., 2001) จากนั้น JAKs จะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟสให้กับ STAT1 เกิดเป็น homodimers complex เคลื่อนเข้าสู่ภายในนิวเคลียสและควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านการจับกับ gamma-activated site (GAS) (Decker et al., 1991) และเกิดการตอบสนองของยีน interferon-regulatory factor 1 (IRF1) (Chatterjee-Kishore et al., 2000) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและการชักนำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์ (Rettino and Clarke, 2013) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.2 แผนผังการทำงานของ IFN- γ signaling pathway ผ่านเส้นทาง JAK/STAT (Castro et al., 2018)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

ตู้สำหรับบอบแห้งอุณหภูมิ 60°C

ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator)

ขวดเลี้ยงเซลล์ T-25

ถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม และ 96 หลุม (Corning, USA)

Hemocytometer

ปิเปตต์ดูดจ่ายอัตโนมัติ (Corning, USA)

กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับสำหรับส่องเซลล์ (Inverted microscope) (Motic, Germany)

ไมโครปิเปตต์ : P1000 (0.1-1ml) (Gilson, France)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (NanoDrop 2000 Spectrophotometer) (Thermo Fisher Scientific®, USA)

เครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-HELIX, Taiwan)

เครื่อง gel electrophoresis (BIO-RAD, USA)

เครื่อง Microplate reader (Molecular devices, USA)

3.2 สารเคมีที่ใช้

3.2.1 ผงสมุนไพรที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบจากบริษัทเอกชน โดยใช้สูตรที่ 4 ซึ่งมีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20 % (w/w) และผงสมุนไพรที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100 % (w/w)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

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

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (AMRESCO, USA)

Phosphate Buffered Saline (10X) (PBS) (VISUAL PROTEIN, Taiwan)

Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, USA)

Charcoal Stripped FBS One Shot™ (GIBCO, USA)

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

100X Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, USA)

Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO, USA)

Cisplatin (Gletham, UK)

MTT (Sigma-Aldrich, US)

BrdU (Sigma-Aldrich, US)

cDNA Synthesis Kit (Biotechrabbit, Germany)

TRIzol Reagent (Ambion, USA)

Phenol (Merck, Germany)

2-Propanol (Merck, Germany)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การสกัดสารด้วยวิธี Soxhlet extraction

สกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย 200 ml และใช้ผงสมุนไพรเป็นตัวถูกละลาย 4 g ทำการสกัด 2 รอบเมื่อได้ผลิตภัณฑ์สารสกัดแห้งที่กระถินพิมาน ทำการวัดความเข้มข้นของสารสกัด จากนั้นจึงนำเก็บเข้าตู้เย็นที่ 4 °C



รูปที่ 3.1 การสกัดสารด้วยเครื่อง Soxhlet extraction

3.3.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (cDMEM : complete DMEM)

ผงอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) เติมน้ำ Sodium bicarbonate เพื่อปรับ pH และเติม conc. HCl ให้ได้ pH ประมาณ 7.2 จากนั้นนำ DMEM ที่ได้เติม 100X Antibiotic-Antimycotic 1% (w/v) และ FBS 10% (w/v) ของปริมาณอาหารที่ต้องการเตรียม ได้ผลิตภัณฑ์อาหาร Complete Dulbecco's modified Eagle's medium (cDMEM) นำเก็บเข้าตู้เย็นที่ 4 °C

3.3.2.2 การ subculture เซลล์

เติม cDMEM 5 ml ลงใน T25 flask ใหม่ นำ T25 flask เก่าที่เซลล์มีจำนวนมากกว่า 80% ของพื้นที่ นำอาหารเก่าออกและเติม PBS 5 ml กลั้วให้ทั่วภาชนะเพื่อล้างจากนั้นจึงดูดออก เติม Trypsin-EDTA 500 μ l กลั้วภาชนะเป็นเลข 8 ให้ Trypsin-EDTA สัมผัสกับเซลล์มากที่สุดแล้วนำไปบ่มในตู้ 37 °C ใน 5% CO₂ 3 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาเคาะให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับ T25 flask หลุดออกมามากที่สุด โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin-EDTA ด้วยการเติม cDMEM 1.5 ml ดูดเซลล์ลง T25 flask ใหม่ 100-200 μ l นำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C ใน 5% CO₂

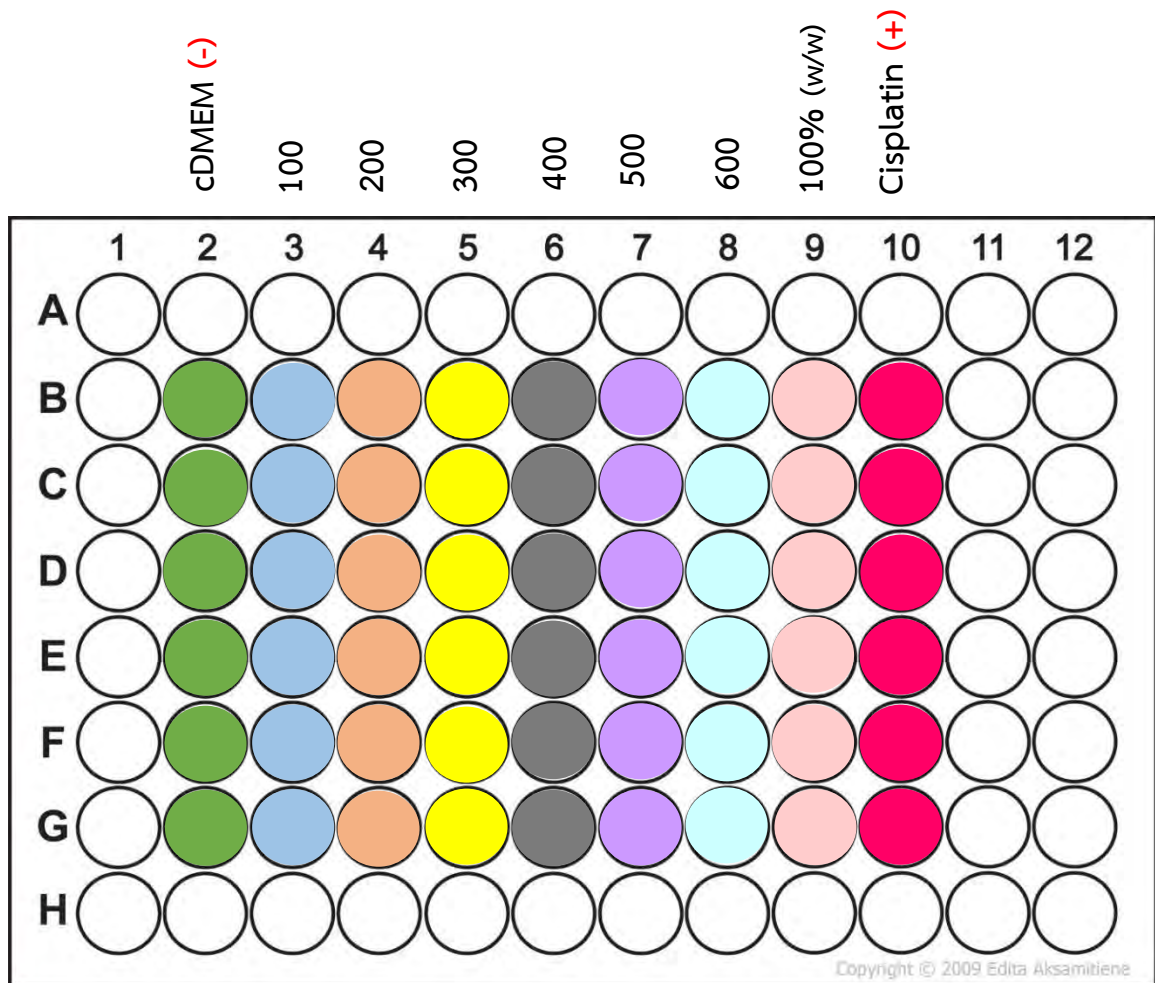
3.3.3 การวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay (Sylvester, 2011)

ใช้เวลาทดสอบติดต่อกัน 4 วัน แบ่งการทดสอบตามวันเป็นวันที่ 1 ถึงวันที่ 4

วันที่ 1 seed cell ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม

ภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมด้วย Poly-D-lysine หลุมละ 200 μ l เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้น ดูดออกและทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที นำ T25 flask ที่เซลล์มีจำนวนมากกว่า 70-80% ของพื้นที่ นำอาหารเก่าออกและเติม PBS 5 ml กลั้วให้ทั่วภาชนะเพื่อล้างจากนั้นจึงดูดออก เติม Trypsin-EDTA 500 μ l กลั้วภาชนะเป็นเลข 8 ให้ Trypsin-EDTA สัมผัสกับเซลล์มากที่สุดแล้วนำไป บ่มในตู้ 37 °C ใน 5% CO₂ 3 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาเคาะให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับ T25 flask หลุดออกมามากที่สุด โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin-EDTA ด้วยการเติม cDMEM 1.5 ml ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออกและเติม cDMEM 5 ml เจือจางสารละลายที่ได้ 10 เท่า เพื่อนำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemocytometer

เมื่อทราบจำนวนเซลล์ในสารละลายแล้วจะคำนวณเพื่อหาปริมาณของสารละลายที่จะใส่ 6,000 เซลล์ ต่อ 200 μ l ต่อ 1 หลุมสำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a และ เซลล์ไต HEK293T ส่วนเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa 3,000 เซลล์ ต่อ 200 μ l ต่อ 1 หลุม การทดลองนี้ออกแบบให้ใช้ทั้งหมด 54 หลุมเตรียมเมื่อ 6 หลุม ใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมด 360,000 เซลล์ สำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a และ เซลล์ไต HEK293T เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ใช้จำนวนเซลล์ทั้งหมด 180,000 เซลล์ สารละลายปริมาตรรวม 12 ml แบ่งใส่หลุมละ 200 μ l โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังรูปที่ 3.2 จากนั้นนำไปเข้าตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C ใน 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาคผนวก ก)



รูปที่ 3.2 ตำแหน่งการทดลองในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดย cDMEM คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมาน 20% (w/w) ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ, 100%(w/w) คือ ชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมาน 100% (w/w) ที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นค่า IC50 ของเซลล์ C33a, SiHa และ HEK293T เมื่อได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมาน 100% (w/w) และ Cisplatin คือ ชุดการทดลองที่ได้ยารักษาโรคมะเร็งใช้เป็น positive control ความเข้มข้น 3 μM

วันที่ 2 ใส่สารสกัดให้กับเซลล์

เตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารสกัดตั้งตำแหน่งในชุดการทดลอง (รูปที่ 3.2) โดยเจือจางสารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีองค์ประกอบของเห็ดกระถินปริมาณ 20% (w/w) ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ เจือจาง Cisplatin ซึ่งจะใช้เป็น Positive control ความเข้มข้น 3 μM (ภาคผนวก ก) และเจือจางสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ให้ได้ความเข้มข้น 247.039, 192.503 และ 181.401 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับเซลล์ C33a, SiHa และ HEK293T ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) ใส่ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมบ่มไว้ที่ 37 °C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วันที่ 3

บ่มภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 5% CO_2

วันที่ 4 MTT assay

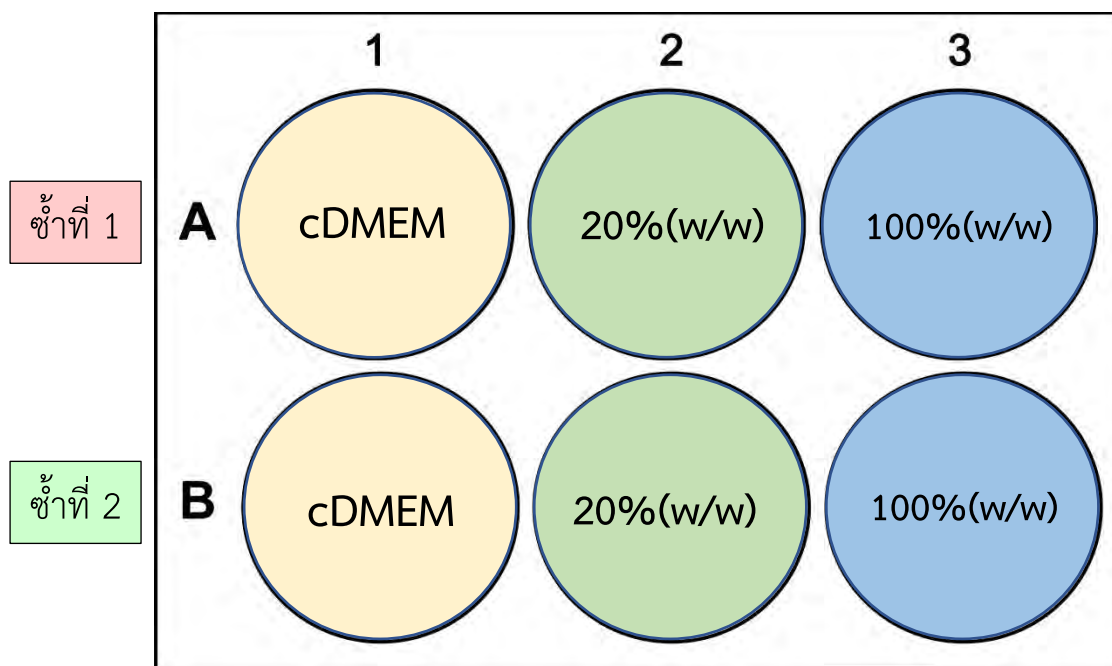
เตรียมสารละลาย MTT 100 μl ต่อหลุม โดยมีอัตราส่วน MTT : DMEM = 1 : 9 จากนั้นดูดอาหารเก่าออกจากภาดเลี้ยงเซลล์แล้วใส่สารละลาย MTT ที่เตรียมหลุมละ 100 μl ปิดด้วยฟอยล์ บ่มในตู้ที่ 37 °C ใน 5% CO_2 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาจะเห็นผลึกตกตะกอนให้ดูดส่วนใสทิ้ง เติม DMSO หลุมละ 100 μl จากนั้นนำไปวัด absorbance ที่ 570 nm เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วจึงนำไปคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอด (ภาคผนวก ก)

3.3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19*

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ใน T25 flask เมื่อเซลล์มีจำนวนมากกว่า 70-80% ของพื้นที่หน้าตัด T25 flask จึงทำการย้ายลงในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a จำนวน 150,000 เซลล์ บ่มในตู้ที่ 37 °C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะทำการเจือจางสารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นค่า IC50 สารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นค่า IC50 และเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ cDMEM สำหรับใช้เป็น negative control ใส่สารสกัดให้กับเซลล์โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง (รูปที่ 3.3) จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่ 37 °C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.4.1 การสกัด RNA

เมื่อครบเวลาจึงดูดอาหารออกจากภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ที่ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ด้วย cDMEM, สารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็นดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นค่า IC50 และสารสกัดที่มีเห็นดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นค่า IC50 ดังภาพ



รูปที่ 3.3 ตำแหน่งการทดลองในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม

ล้างด้วย PBS 5 ml จากนั้นดูดออกใส่ trypsin-EDTA 500 μ l บ่มไว้ที่ 37 $^{\circ}$ C ใน 5% CO₂ เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาเคาะและหยุด trypsin reaction โดยใส่ cDMEM 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยง 500 g 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ใส่ TRIzol 1000 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตต์ รอให้แยกชั้น 5 นาที ใส่ chloroform 200 μ l กลับ tube ขึ้นลงด้วยมือ รอให้แยกชั้น 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C 15 นาที และเตรียม tube แชน้ำแข็งไว้สำหรับใส่ RNA เมื่อครบ 15 นาทีนำมาดูดส่วนใสให้ได้ประมาณ 400-500 μ l ใส่ Isopropanal 500 μ l กลับ tube ขึ้นลงด้วยมือและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 75% EtOH 1 ml กลับ tube ขึ้นลงด้วยมือ ปั่นเหวี่ยง 7500 g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นคว่ำ tube บนทิชชูเพื่อทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC 20 μ l ปิเปตต์ขึ้นลง ใช้น้ำ type I เป็น Blank จากนั้นดูด RNA 1 μ l วัดด้วยเครื่อง NanoDrop

3.3.4.2 การสังเคราะห์ cDNA

เตรียม Master mix ทั้งหมด 7 reaction ด้วยชุด Biotechrabbit kit โดยใส่ dNTP 14 μ l RNase Inhibitor 3.5 μ l Oligo(dT) 3.5 μ l 5X cDNA synthesis 28 μ l และ Reverse transcriptase 7 μ l จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตต์ แบ่งออกเป็นทั้งหมด 6 tube โดย tube ที่ 1 ซึ่งจะเป็น RNA ที่ไม่ได้รับสกัด จะใส่ RNA 6.24 μ l และ RNase free water 5.76 μ l และ 5 tube ที่เหลือจะใส่ RNA 12 μ l เนื่องจากมีความเข้มข้นของ RNA น้อย นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิ 55 °C 60 นาที 1 รอบ และ 99 °C 5 นาที จึงจะได้ cDNA จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *IL-19* และยีน *IFNGR1* ที่ใช้สำหรับการทำ PCR โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาจากฐานข้อมูล EnsemblASIA ใน NCBI แล้วออกแบบให้ครอบคลุมบริเวณของ Intron เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างขนาดของ PCR product ของ RNA กับ PCR product ของ DNA ได้ โดย PCR product ของ RNA มีขนาด 206 และ 307 bp เมื่อใช้ไพรเมอร์ยีน *IL-19* และยีน *IFNGR1* ตามลำดับ และคำนวณ %GC content และ annealing temperature โดยใช้โปรแกรม Oligo Calculator version 3.27

3.3.4.4 เทคนิค PCR

เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Forward primer และ Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีน *IL-19* และยีน *IFNGR1* และใช้ไพรเมอร์ยีน *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* เป็น internal control ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดของไพรเมอร์ของยีน *IL-19*, *IFNGR1* และ *GAPDH*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาด PCR product ของ RNA (bp)
<i>IL-19</i>	F: 5' GAAGTTACAGTGTGTTCCCTT 3'	206
	R: 5' TTAATGATCTGCAGAGTCTCC 3'	
<i>IFNGR1</i>	F: 5' AATTGGACCACCTAAACTGG 3'	307
	R: 5' AGTTGTAACACCCACACAT 3'	

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาด PCR product ของ RNA (bp)
GAPDH	F: 5' TGAAGGACTCATGACCACAG 3'	163
	R: 5' TTCAGCTCAGGGATGACCTT 3'	

เตรียม PCR Master mix โดยใส่ Distilled water 7 μ l 10X Taq buffer 1X MgCl₂ 0.4 mM dNTP 0.2 mM Taq DNA polymerase 0.1X Forward primer 0.15 μ l Reverse primer 0.15 μ l นำมาผสมกับ cDNA 1 μ l จะได้ปริมาตรรวม 10 μ l ต่อ 1 reaction โดยเตรียมทั้งหมด 10 reaction จากนั้นนำไปเข้ากระบวนการ PCR โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน Initial denaturation 95 °C เป็นเวลา 3 นาที PCR cycle 30 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และเข้าสู่ขั้นตอน Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Holding ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อได้ PCR product แล้วจะนำไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธี Gel Electrophoresis

3.3.4.5 Gel Electrophoresis

ทำการเตรียมเจลโดยใช้ ผง agarose 0.8 g ผสมกับ 1X TBE buffer 40 ml เข้าไมโครเวฟ 1 นาทีโดยคอยดูหากเกิดฟองให้รอจนฟองยุบแล้วจึงนำขวดรูปชมพู่ออกมาวนเป็นวงกลม ทำประมาณ 5 ครั้งจนสารละลายใส แล้วนำออกมาใส่ red safe 1.4 μ l รอให้ความร้อนระเหยจนพอใช้มือจับขวดได้จึงเทลงแม่พิมพ์ รอให้เจลแข็งตัวและนำไปใส่เครื่อง Bio-Rad จากนั้นใส่ 1X TBE buffer ให้ท่วมเจล นำ PCR product ที่ได้ปริมาตร 5 μ l มาผ่าน Gel Electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบแถบ RNA ด้วยเครื่อง Electrophoresis chambers (Bio-rad, USA)

3.3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางการทดลองทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a, SiHa และเซลล์ไต HEK293T ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็นดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ว่ามีความแตกต่างจากที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็นดกระถินพิมาน (cDMEM) ซึ่งเป็น negative control อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์หรือไม่ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำโดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของแต่ละคู่ความเข้มข้นภายในเซลล์ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์หรือไม่ โดยใช้ least significant difference (LSD) และเปรียบเทียบค่า IC50 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a และ SiHa เมื่อได้รับสารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์หรือไม่ โดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดและความเข้มข้นที่ได้จากสารที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน

เมื่อนำผงสมุนไพรสูตรที่ 4 มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน 20 % (w/w) และผงสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน 100 % (w/w) เข้าอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ผงสารสกัดที่มีสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำมาสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor จึงได้สารละลายที่มีสีน้ำตาล แบ่งสารละลาย 10 ml ใส่ 3 ปีกเกอร์อบจนน้ำหนักคงที่ เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างของน้ำหนักก่อนอบและหลังอบของทั้ง 3 ปีกเกอร์ จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน 20 % (w/w) เท่ากับ 7370 µg/ml และสารสกัดสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเห็ดกระถินพิมาน 100 % (w/w) มีค่าความเข้มข้น 2570 µg/ml

4.2 การวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay

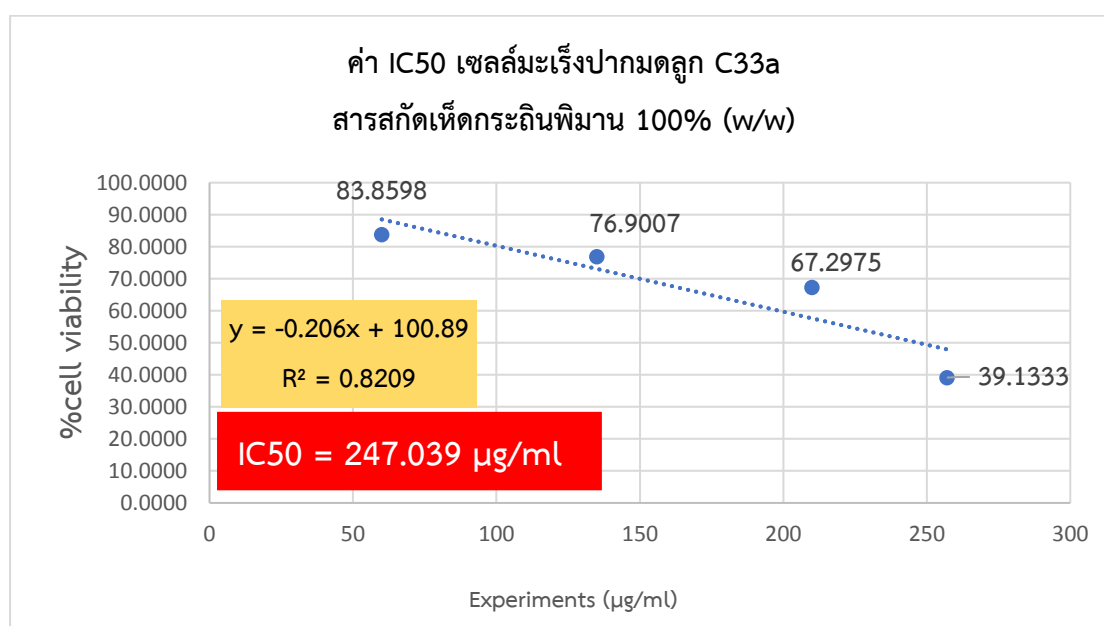
จากการทดสอบการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a, SiHa และเซลล์ไต HEK293T ในหลอดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Cisplatin ความเข้มข้น 3 µM ซึ่งใช้เป็น Positive control และ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เพื่อหาค่า half Inhibitor concentration (IC50)

4.2.1 ผลการหาค่า IC50 ของเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

จากการทดสอบการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a, SiHa และเซลล์ไต HEK293T ในหลอดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างในการทดลองขั้นต่อไป

4.2.1.1 การวัดความสามารถในการยับยั้งความมีรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ให้ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมเมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ความเข้มข้น 0, 60, 135, 210 และ 257 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a กับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เพื่อหาค่า half Inhibitor concentration (IC₅₀) ได้ดังรูปที่ 4.1 โดยสามารถคำนวณ IC₅₀ ได้จากสมการ $y = -0.206x + 100.89$ ซึ่งมีค่าความแม่นยำของสมการคือ 0.8209 สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ได้เท่ากับ 247.039 $\mu\text{g/ml}$

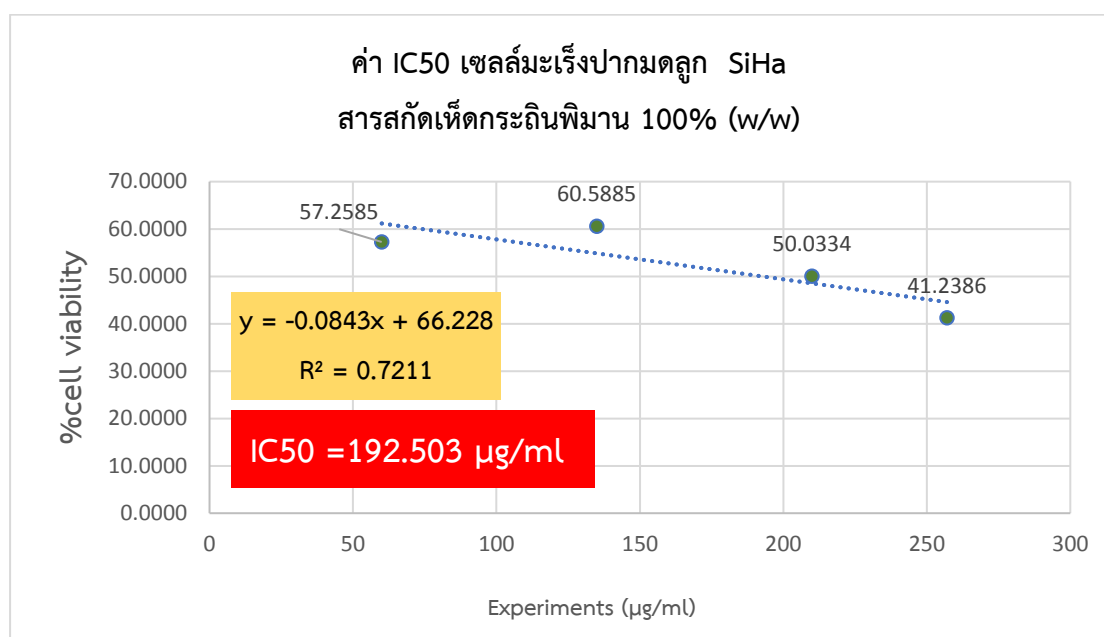


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงค่า IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

4.2.1.2 การวัดความสามารถในการยับยั้งความมีรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ให้ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมเมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ความเข้มข้น 0, 60, 135, 210 และ 257 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี

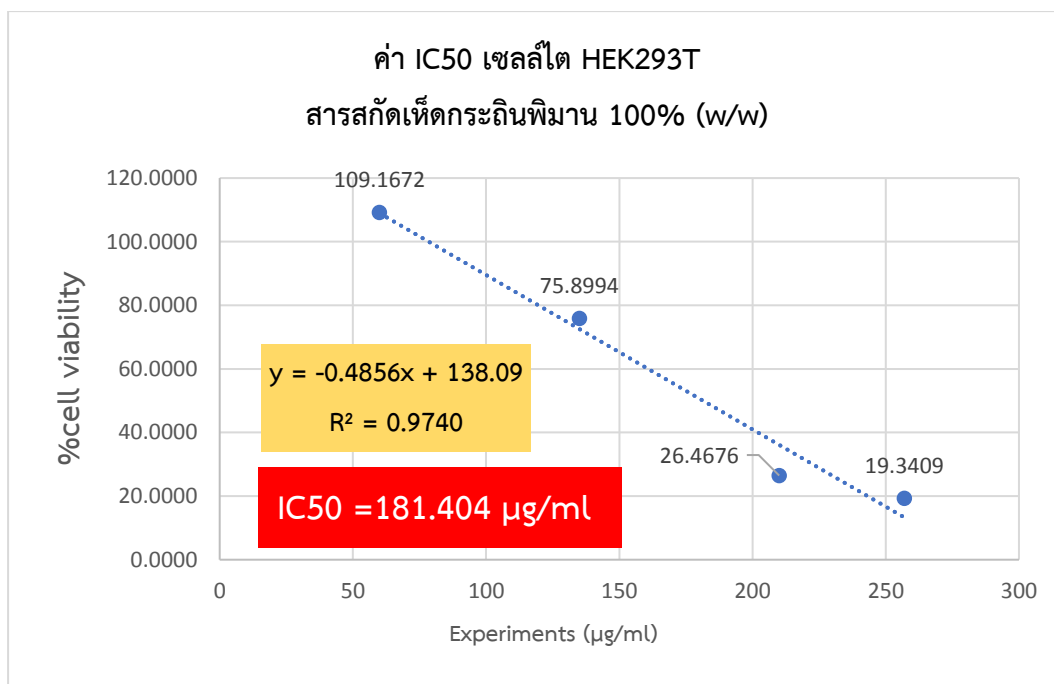
MTT assay นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชนิด SiHa กับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เพื่อหาค่า half Inhibitor concentration (IC₅₀) ได้ดังรูปที่ 4.2 โดยสามารถคำนวณ IC₅₀ ได้จากสมการ $y = -0.0843x + 66.228$ ซึ่งมีค่าความแม่นยำของสมการคือ 0.7211 สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้เท่ากับ 192.503 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่า IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

4.2.1.3 การวัดความสามารถในการยับยั้งความมีรอดของเซลล์ไต HEK293T ให้ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

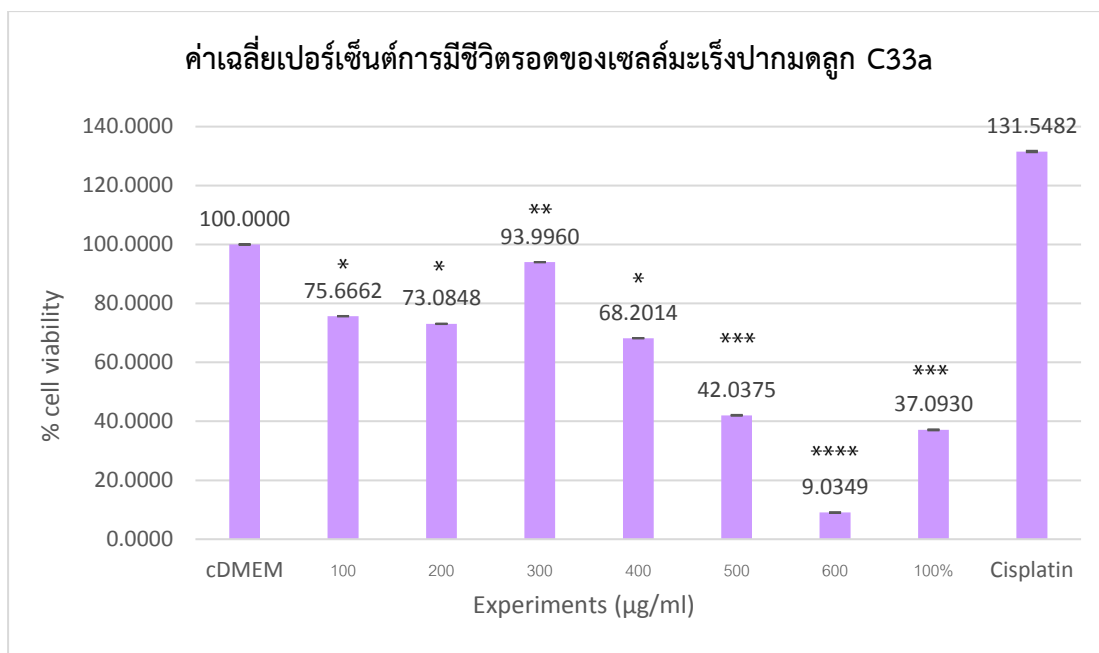
จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293T ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมเมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ความเข้มข้น 0, 60, 135, 210 และ 257 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไต HEK293T กับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เพื่อหาค่า half Inhibitor concentration (IC₅₀) ได้ดังรูปที่ 4.3 โดยสามารถคำนวณ IC₅₀ ได้จากสมการ $y = -0.4856x + 138.09$ ซึ่งมีค่าความแม่นยำของสมการคือ 0.9740 สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ของเซลล์ไต HEK293T ได้เท่ากับ 181.404 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่า IC50 ของเซลล์ไต HEK293T เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

4.2.2 การวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

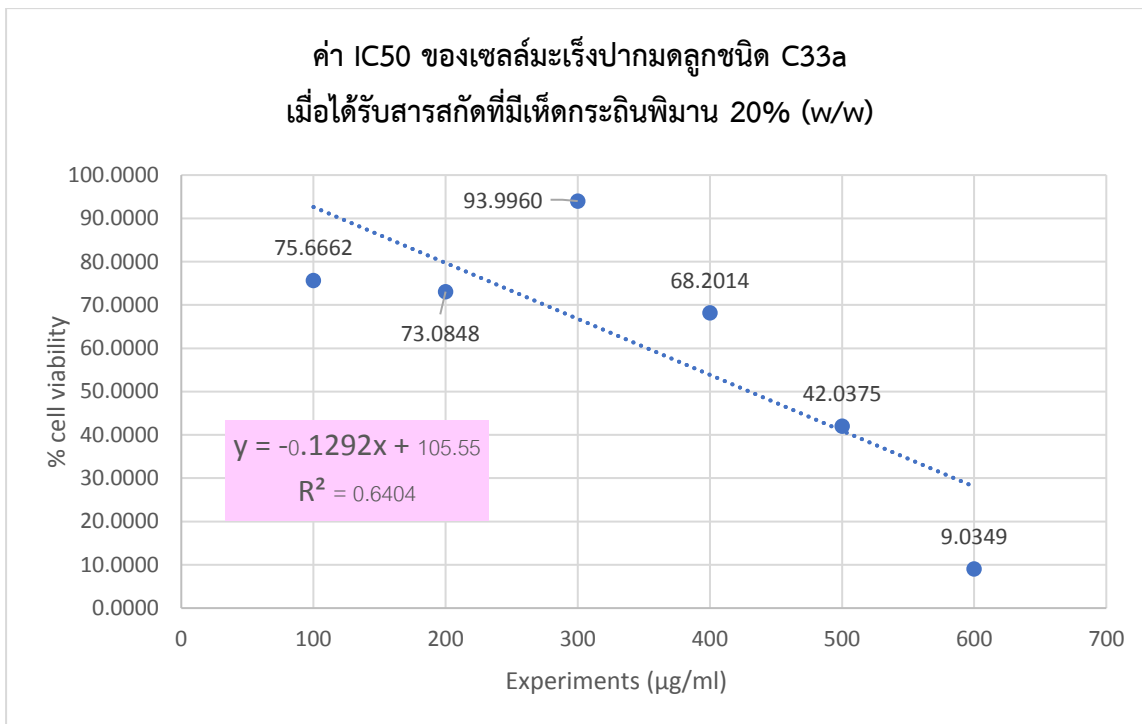
จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่เข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่ความเข้มข้น 247.039 µg/ml และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a กับความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน พบว่าที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a คือ 75.666, 73.085, 93.996, 68.201, 42.038 และ 9.035 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดเห็ดกระถินปริมาณซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 (cDMEM)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย *, **, ***, **** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยชุดการทดลอง 100, 200 และ 400 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 300, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 300 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 400, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 500 และ 100% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 300, 400 และ 600 ชุดการทดลอง 600 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 300, 400, 500 และ 100%

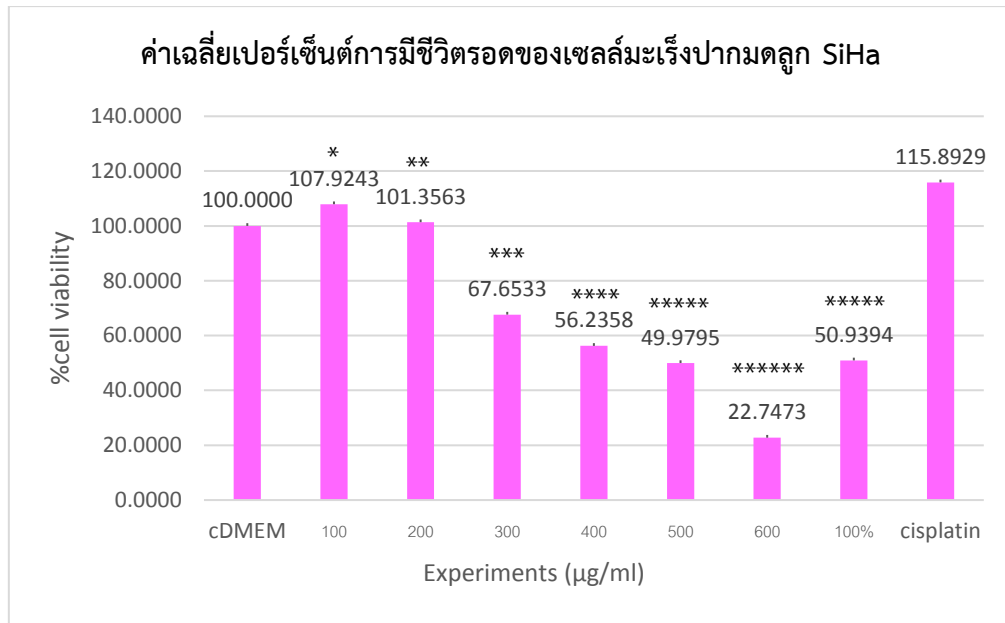
เมื่อทำการทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ซึ่งมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 400-500 µg/ml สามารถคำนวณ IC₅₀ ได้จากสมการ $y = -0.1292x + 105.55$ ซึ่งมีค่าความแม่นยำของสมการคือ 0.6404 (รูปที่ 4.5) สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ได้เท่ากับ 429.953 µg/ml



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่า IC50 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูงสุดที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w)

4.2.3 การวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

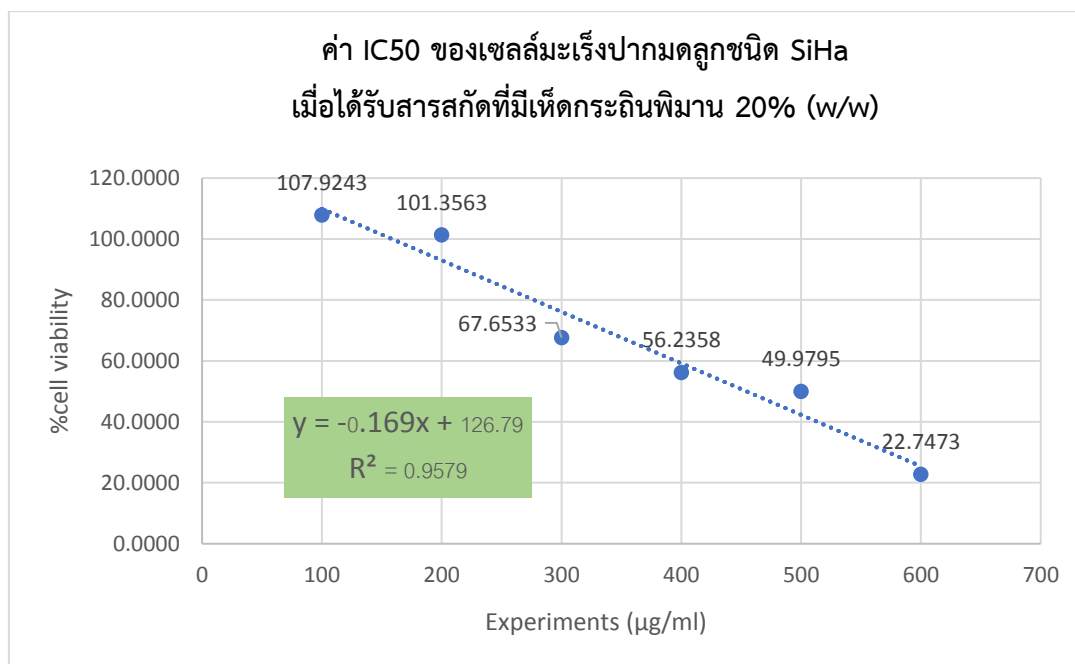
จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูงสุดที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่เข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดเห็ดกระถินปริมาณซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่ความเข้มข้น 192.503 µg/ml และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa กับความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณพบว่าที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa คือ 107.924, 101.356, 67.653, 56.236, 49.980 และ 22.747 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อได้รับสารสกัดแห้งที่กระถินปริมาณสูตรที่ 4 ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดแห้งที่กระถินปริมาณซึ่งมีให้กระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ที่ไม่ได้รับสารสกัดแห้งที่กระถินปริมาณสูตรที่ 4 (cDMEM)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย *, **, ***, ****, ***** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยชุดการทดลอง 100 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 200, 300, 400, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 200 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 300, 400, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 300 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 400, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 400 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 300, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 500 และ 100% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 300, 400 และ 600 ชุดการทดลอง 600 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 200, 300, 400, 500 และ 100%

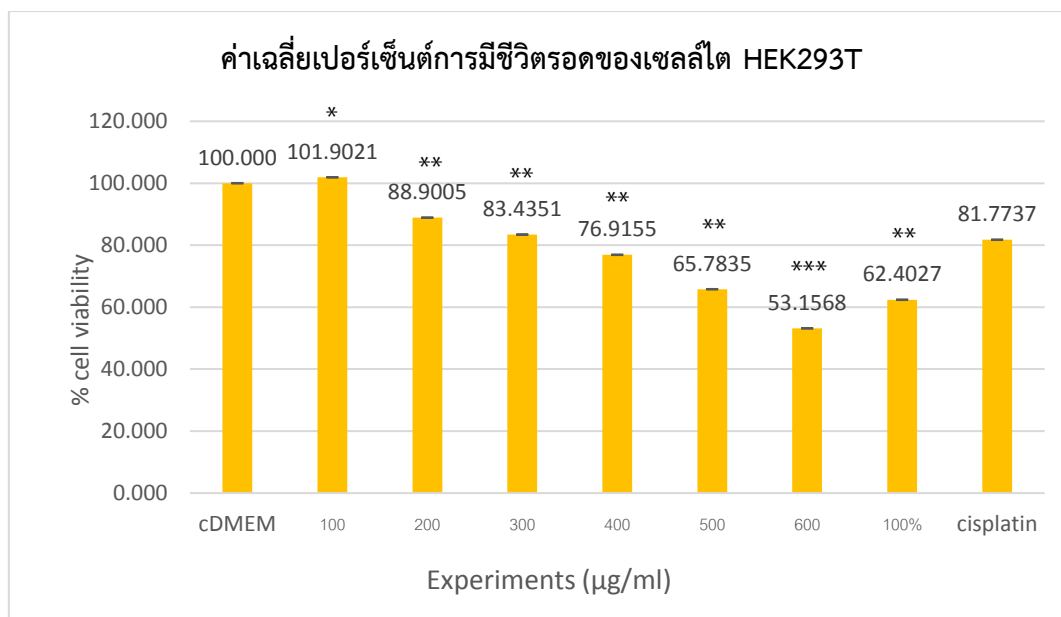
เมื่อทำการทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีให้กระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ซึ่งมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 400-500 µg/ml สามารถคำนวณ IC₅₀ ได้จากสมการ $y = -0.169x + 126.79$ ซึ่งมีค่าความแม่นยำของสมการคือ 0.9579 (รูปที่ 4.7) สามารถคำนวณค่าเฉลี่ย IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa ได้เท่ากับ 454.379 µg/ml



รูปที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานเป็นส่วนประกอบ 20% (w/w)

4.2.4 การวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ไต HEK293T

จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไต HEK293T ในสภาพเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่เข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดเห็ดกระถินพิมานซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่ความเข้มข้น 181.404 µg/ml และ Cisplatin เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ไต HEK293T กับความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน พบว่าที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ไต HEK293T คือ 101.902, 88.901, 83.435, 76.916, 65.784 และ 53.157 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไต HEK293T เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 µg/ml สารสกัดเห็ดกระถินปริมาณซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) เปรียบเทียบกับเซลล์ไต HEK293T ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 (cDMEM)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย *, **, *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยชุดการทดลอง 100 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 200, 300, 400, 500, 600 และ 100% ชุดการทดลอง 200, 300, 400 และ 500 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลอง 100, 600 และ 100%

เมื่อทำการทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 600 µg/ml มีอัตราความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่มากกว่า 50% หมายความว่าต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 600 µg/ml จึงจะสามารถคำนวณหาค่า IC₅₀ ของเซลล์ HEK293T เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ได้

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไต HEK293T น้อยที่สุดเนื่องจากมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) มากกว่า 600 µg/ml และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a มากที่สุดซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่งที่ 429.953 µg/ml (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC50 ที่ช่วงเวลา 48 ชั่วโมงของเซลล์ต่าง ๆ

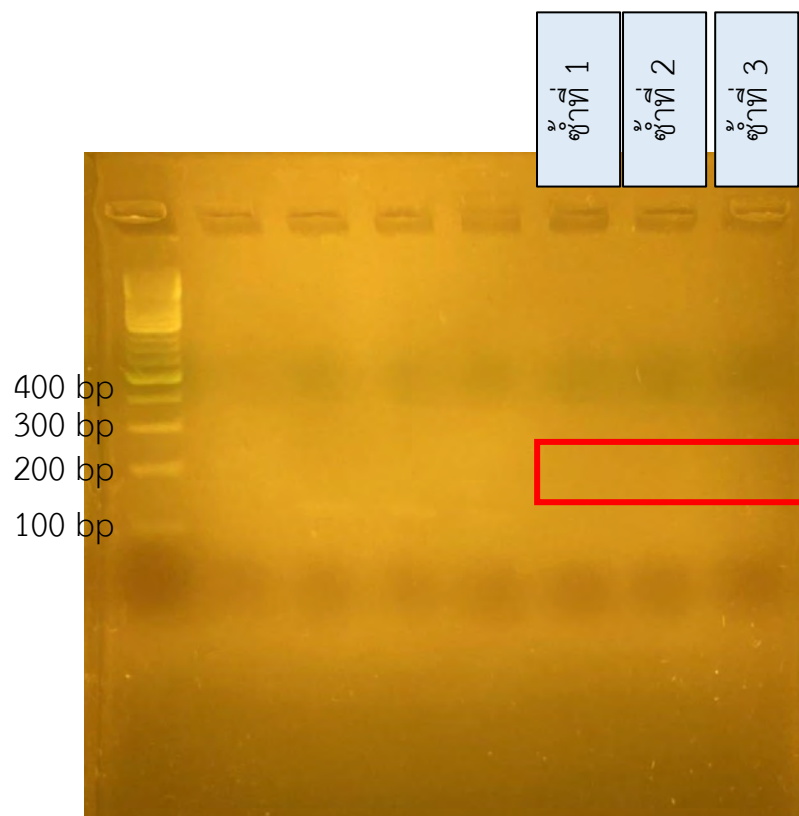
เซลล์	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
C33a	429.953*
SiHa	454.379*
HEK293T	> 600

หมายเหตุ: เครื่องหมาย* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน

4.3.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์ HEK293T

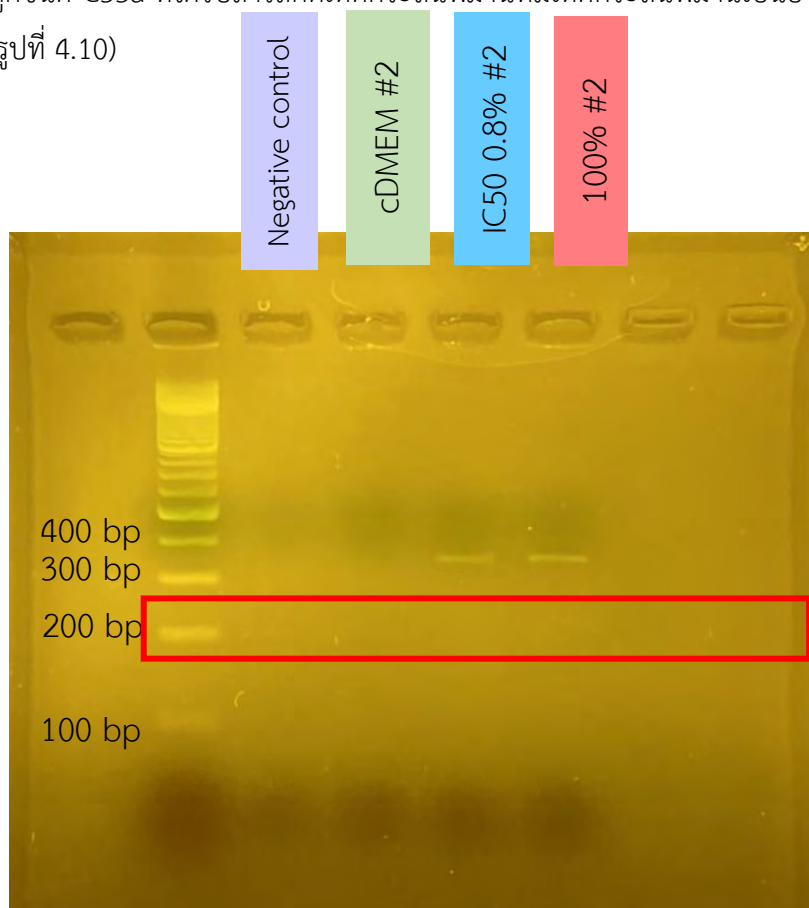
หลังจากได้ทำการทดสอบการศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19* โดยใช้เซลล์ HEK293T ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน (cDMEM) พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์ HEK293T (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 gel electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *IL-19* ในเซลล์ HEK293T

4.3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์ไต HEK293T จึงได้เปลี่ยนตัวอย่าง cDNA เพื่อดูการแสดงออกของยีน *IL-19* โดยนำตัวอย่าง cDNA ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ซึ่งได้รับสารสกัดที่มีเห็นตระณิพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) และสารสกัดที่มีเห็นตระณิพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ที่นำมาใช้ในการทดสอบกับยีนพบว่ามีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* แล้วพบว่ามีการแสดงออกที่ลดลงในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดทั้ง 2 สูตร (ประกายทิพย์ สมจิตต์, โครงการงานวิทยาศาสตร์ 2563) หลังจากทำการทดลองพบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็นตระณิพิมาน (cDMEM) ตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดจากเห็นตระณิพิมาน 0.8% (w/w) และตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดเห็นตระณิพิมานที่มีเห็นตระณิพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 gel electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *IL-19* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ในตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็นตระณิพิมาน (cDMEM), ตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดจากเห็นตระณิพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็นตระณิพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) ความเข้มข้น 589.249 $\mu\text{g/ml}$ และตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดเห็นตระณิพิมานที่มีเห็นตระณิพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ความเข้มข้น 247.039 $\mu\text{g/ml}$

4.3.3 การศึกษาการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% และ 20% (w/w)

เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a จึงได้นำยีน *IFNGR1* ที่ทำการทดสอบแล้วว่ามีแสดงออกในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a (ประกายทิพย์ สมจิตต์, โครงการวิทยาศาสตร์ 2563) มาเปรียบเทียบการแสดงออกใน 4 ตัวอย่างประกอบด้วย เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน (cDMEM) 3 ซ้ำ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่ความเข้มข้น 461.886 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งหมด 2 ซ้ำ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ซึ่งมีค่าความเข้มข้น 247.039 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 3 ซ้ำ และเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) ที่ความเข้มข้น 589.249 $\mu\text{g/ml}$ 1 ซ้ำ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความเข้มแบนด้วยโปรแกรม GelAnalyzer 19.1 แล้วได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มแบนซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GelAnalyzer 19.1

ตัวอย่าง	cDMEM	IC50 20%	IC50 0.8%	100%
ค่าความเข้มแบน	2.079	-	-	1.464

หมายเหตุ: cDMEM คือ ตัวอย่างที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมาน IC50 ตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) IC50 0.8% คือ ตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) และ 100% คือตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)

จากตารางพบว่ามีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน (cDMEM) ซึ่งมีค่าความเข้มแบน 2.079 และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ซึ่งมีค่าความเข้มแบน 1.464 และไม่พบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20%

(w/w) และเซลล์ ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 การศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

การวัดระดับความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a, SiHa และเซลล์ไต HEK293T เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a มากที่สุดซึ่งมีค่า IC₅₀ 429.953 µg/ml รองลงมาคือเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa ซึ่งมีค่า IC₅₀ 454.379 µg/ml และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไต HEK293T น้อยที่สุดซึ่งมีค่า IC₅₀ มากกว่า 600 µg/ml ถึงแม้จะมีความเป็นพิษน้อยที่สุดแต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าปลอดภัยสำหรับใช้ในการรักษาหรือไม่ จากการศึกษาภาวะความเป็นพิษต่อไตเมื่อได้รับยาเคมีบำบัดจากการศึกษาของอัญมณี ลาภมาก และคณะจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการศึกษายาเคมีบำบัดในปัจจุบันคือ cisplatin ต่อภาวะความเป็นพิษต่อไต จากการศึกษาพบว่าการเกิดพิษต่อไตจะแปรผันตามขนาดของยาสะสมที่ผู้ป่วยได้รับ ระยะเวลาการเกิดพิษต่อไตส่วนใหญ่จะเริ่มเมื่อได้รับยา cisplatin ไม่เกิน 1 สัปดาห์ โดยพบการเพิ่มขึ้นของระดับ blood urea nitrogen ซึ่งบ่งชี้การทำงานของไตที่ลดลง และการเพิ่มขึ้นของ serum creatinine ซึ่งมักพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคไต อีกทั้งยังสามารถตรวจพบน้ำตาลกลูโคสและโปรตีนในปัสสาวะซึ่งแสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นที่ proximal tubule โดยส่วนใหญ่ไตจะกลับมาทำงานใกล้เคียงหรือเทียบเท่าปกติได้ภายใน 2-4 สัปดาห์หลังจากหยุดยา cisplatin โดยความเป็นพิษต่อไตขึ้นกับขนาดของยา ความถี่ของการได้รับยา และขนาดของยาสะสม (อัญมณี ลาภมาก และคณะ, 2563) เช่นเดียวกับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) หากต้องการนำไปใช้ในการรักษาคนไข้ ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณยาที่เหมาะสม ความถี่ในการรับยา และขนาดการสะสมของยาและเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์เกี่ยวกับผลของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 4 ที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ที่มีต่อเซลล์ต่าง ๆ จึงควรศึกษาทั้งความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay การฆ่าตัวตายของเซลล์ และความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย BrdU assay ซึ่งเมื่อมีการแบ่งตัวของเซลล์ BrdU ซึ่งเป็น derivative ของ dUTP จะจับกับ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ และสามารถตรวจสอบปริมาณของ BrdU ได้ด้วย anti-BrdU antibody ซึ่งติดกับสี fluorescence วัดด้วยเครื่อง Microplate photometer (ELISA reader) (Crane and Bhattacharya, 2013) แต่เนื่องด้วยเครื่อง Microplate photometer เกิดปัญหาขัดข้องซึ่งอยู่ในระหว่างการซ่อมจึงทำให้ไม่สามารถวัดการดูดกลืนแสงเพื่อดูอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย

BrdU assay เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) ได้

จากผลของควมมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อได้รับ Cisplatin รูปที่ 4.4, 4.6 และ 4.8 พบว่า Cisplatin ซึ่งใช้เป็น positive control ที่ความเข้มข้น 3 μM ไม่สามารถยับยั้งควมมีชีวิตรอดให้เหลือครึ่งหนึ่งได้ จากการศึกษาของ Liu และคณะจาก Chosun University ประเทศเกาหลีใต้ ได้ศึกษาผลของ Cisplatin ต่อควมมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และ CaSki โดยทำการทดลองทั้งหมด 9 ความเข้มข้นประกอบด้วย 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 μM จากการศึกษาพบว่าช่วงความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และ CaSki มีค่าควมมีชีวิตรอดลดลงเหลือครึ่งหนึ่งคือ 10-12 และ 8-10 μM ตามลำดับ (Liu et al., 2019) จึงอาจสรุปได้ว่าการที่ Cisplatin ไม่สามารถยับยั้งควมมีชีวิตรอดให้เหลือครึ่งหนึ่งได้เนื่องจากการเลือกใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป

5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *IL-19* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a (รูปที่ 4.10) พบว่าในตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณ (cDMEM) ไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* และเมื่อให้สารสกัดเห็ดกระถินปริมาณเพื่อดูการแสดงออกของยีน *IL-19* ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินปริมาณ 0.8% (w/w) และตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) พบว่ายังคงไม่มีการแสดงออกของยีน *IL-19* เช่นเดียวกับตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณ (cDMEM) อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *IL-19*

จากการศึกษาการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 0.8% และ 20% (w/w) (ตารางที่ 4.2) พบว่ายีน *IFNGR1* มีการแสดงออกมากที่สุด ในตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณ (cDMEM) รองลงมาคือตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณ 100% (w/w) และไม่มีการแสดงออกในตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 4 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) และไม่มีการแสดงออกในตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดกระถินปริมาณสูตรที่ 5 ซึ่งมีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) อาจเป็นผลมาจากสารสกัดสูตรที่ 4 ที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 20% (w/w) และสารสกัดสูตรที่ 5 ที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 0.8% (w/w) มีองค์ประกอบของสมุนไพรอื่นรวมอยู่ด้วยเช่น หัวข้าวเย็นเหนือและหัวข้าวเย็นใต้ ต่างจากสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) ซึ่งจะมีเห็ดกระถิน

พืมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิต TNF- α ในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสารสกัดจากหัวข้าวเย็นเหนือของ Ruangnoo และคณะจาก มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากหัวข้าวเย็นเหนือซึ่งเป็นค่า IC50 ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการผลิต TNF- α คือ 61.9 $\mu\text{g/ml}$ (Ruangnoo et al., 2012) และจากรายงานการศึกษาของ Lu และคณะจาก Guangzhou University of Chinese Medicine ประเทศจีน ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยศึกษาการหลั่งของ TNF- α ในเซลล์ RAW264.7 เมื่อได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ที่ความเข้มข้น 1.6, 8, 40 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ พบว่าการหลั่งของ TNF- α เมื่อได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นสูงชันเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ (Lu et al., 2014) จากทั้ง 2 การศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของหัวข้าวเย็นเหนือ และสารสกัดของหัวข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งของ TNF- α และจากการศึกษาของ Kobelt และคณะจาก Charité Universitätsmedizin Berlin and Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association ประเทศเยอรมัน ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ TNF- α และ IFN- γ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้องอก และการแพร่กระจายผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ ยีน Metastasis-Associated in Colon Cancer 1 หรือ *MACC1* ซึ่งยีน *MACC1* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้ โดยทำการทดสอบในเซลล์เยื่อผิวของมะเร็งลำไส้ HCT116 เพื่อดูปริมาณของ TNF- α และ IFN- γ ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ ยีน *MACC1* ซึ่งความเข้มข้นของ TNF- α และ IFN- γ ที่จะใช้ในการทดสอบคือ 1, 10 และ 100 ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดการแสดงออกของ ยีน *MACC1* ด้วยเทคนิค qRT-PCR พบว่า TNF- α มีผลเหนี่ยวนำยีน *MACC1* อย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 ng/ml จะมีการแสดงออกของยีน *MACC1* มากที่สุด และ IFN- γ มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *MACC1* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่มีการแสดงออกของยีน *MACC1* น้อยกว่า TNF- α (Kobelt et al., 2020) สอดคล้องกับการศึกษาของโครงการซึ่งไม่มีการแสดงออกของยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดที่มีให้ดกระถินพืมานเป็นองค์ประกอบ 0.8% และ 20% (w/w) ซึ่งมีส่วนประกอบของสมุนไพรหัวข้าวเย็นเหนือและหัวข้าวเย็นใต้ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- α

เอกสารอ้างอิง

- ประกายทิพย์ สมจิตต์. 2563. ฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานสูตรที่ 5 ต่อการแสดงออกของ ยีน *IFNGR1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก. *โครงการงานวิทยาศาสตร์*. หน้า: 1-37.
- ภูซงค์ ลิขิตธรรมสมบัติ. 2558. มะเร็งปากมดลูก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.rama.mahidol.ac.th/cancer_center/th/protfolio/knowledge/gyne/servix [29 พฤษภาคม 2564].
- ศุภกร พิทักษ์การกุล. 2551. มะเร็งปากมดลูก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.nci.go.th/th/File_download/thanong/01/cervical%20cancer%20ศุภกร.pdf [15 พฤษภาคม 2563].
- อัญมณี ลาภมาก และ กิตติ์วี กฤษณ์เมธาภักย์. 2563. ภาวะพิษต่อไตที่เกิดจากยาเคมีบำบัดและยา มุ่งเป้า. *วารสารอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 6:11-24
- Ayers M., et al. 2017. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *The Journal of Clinical Investigation* 127: 2930–2940.
- Bernabei P., et al. 2001. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol*. 70:950–60.
- Brisson M., and Drolet M. 2019. Global elimination of cervical cancer as a public health problem. *Lancet Oncol*, 20(3):319-321.
- Castro F., et al. 2018. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology*. 9:1-19
- Chatterjee-Kishore M., et al. 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *The EMBO Journal*. 19:4111–22
- Chen Y.Y., et al. 2013. Interleukin-19 in Breast Cancer. *Clinical and Developmental Immunology*.1-9

- Crane A.M., and Bhattacharya S.K. 2013. The Use of Bromodeoxyuridine Incorporation Assays to Assess Corneal Stem Cell Proliferation. *Method in Molecular Biology*. 1014:65-70.
- Cuneo A. A., Herrick D., and Autieri M. V. 2010. IL-19 reduces VSMC activation by regulation of mRNA regulatory factor HuR and reduction of mRNA stability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(4): 647-654.
- Decker T., et al. 1991. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *The EMBO Journal*. 10:927–32.
- Galhena P.B. et al. 2012. Anti-inflammatory activity is a possible mechanism by which the polyherbal formulation comprised of *Nigella sativa* (seeds), *Hemidesmus indicus* (root), and *Smilax glabra* (rhizome) mediates its antihepatocarcinogenic effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 11.
- Gallagher G. 2010. Interleukin-19: multiple roles in immune regulation and disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 21(5): 345-352.
- Hsing C.H., et al. 2012. Upregulated IL-19 in breast cancer promotes tumor progression and affects clinical outcome. *Clinical Cancer Research*. 18(3):713–725
- Itharat A., et al. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer, *The Journal of Ethnopharmacology*. 90: 33–38.
- Jiang J., and Xu Q. 2003. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvantinduced arthritis in rats. *The Journal of Ethnopharmacology*. 85 :53–59.
- Kelemen S. F., Eisen H. J., and Autieri M. V. 2005. Expression of the FAST-1 transcription factor in coronary artery transplant vasculopathy and activated vascular smooth muscle cells. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. vol. 24, no. 3, pp. 246–250
- Kessler T.A., 2017. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Seminars in Oncology Nursing*. 33(2): 172-183

- Kim J.H., et al. 2015. A water-ethanol extract from the willow bracket mushroom, *Phellinus igniarius* (Higher Basidiomycetes), reduces transient cerebral ischemia-induced neuronal death. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17, 879-889.
- Kobelt D., et al. 2020. Pro-inflammatory TNF- α and IFN- γ Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of *MACC1*. *Frontiers in Immunology*. 11:980
- Li L., et al. 2014. A mushroom extract Piwep from *Phellinus igniarius* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting immune cell infiltration in the spinal cord. *BioMed Research International*. 218-274
- Li S.C., Yang X.M., Ma H.L., Yan J.K., and Guo D.Z. 2015. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. *Carbohydrate Polymers*. 133: 24-30
- Liu H., et al. 2019. Effects of genistein on anti-tumor activity of cisplatin in human cervical cancer cell lines. *Obstet Gynecol Sci*. 62(5):322-328
- Lu, Zhu, Wang, Xu, and Lu. 2014. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic-Enriched Extracts of *Smilax glabra*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-8
- Muriel P., Y. and R.E. 2008. Beneficial drugs for liver diseases, *Journal of Applied Toxicology* 28: 93-103.
- Parrish-Novak J., et al. 2002. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes: differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 277, no. 49, pp. 47517-47523
- Pollard JW. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 4:71-8.

- Rettino A., and Clarke NM. 2013. Genome-wide identification of IRF1 binding sites reveals extensive occupancy at cell death associated genes. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*. S6-009:2157–518.
- Ruangnoo S., et al. 2012. An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by antiinflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 30(4):268-74
- Waggoner SE. 2003. Cervical cancer. *The Lancet* 361: 2217-2225.
- Shi-Chao, et al. 2006. A phylogenetic analysis of the Smilacaceae based on morphological data, *Acta Phytotaxon*. 44: 113-125.
- Small W., et al. 2017. Cervical Cancer: A Global Health Crisis. *Cancer*. 123:2404-12.
- Smith J.S., et al. 2007. Human papillomavirus type distribution invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis updates. *International Journal of Cancer*. 121:621-32.
- Song T.Y., Lin H.C., Yang N.C., and HU M.L. 2008. Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanol extract of *Phellinus igniarius* (Linneaus: Fries) Quelet, *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 50-56.
- Sylvester P.W. 2011. Optimization of tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in Molecular Biology* 716: 157-168.
- Zapora E., Wolkowycki M., Bakier S., and Zjawiony K. J. 2016. *Phellinus igniarius* : A pharmacologically active polypore mushroom. *Natural Product Communications*. 11: 1043-1046.

ภาคผนวก ก

1. การคำนวณปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตร

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

การคำนวณปริมาณสารละลายที่บรรจุปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้

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

2. เตรียมสารละลายสำหรับใช้ในชุดการทดลอง (รูปที่ 3.2)

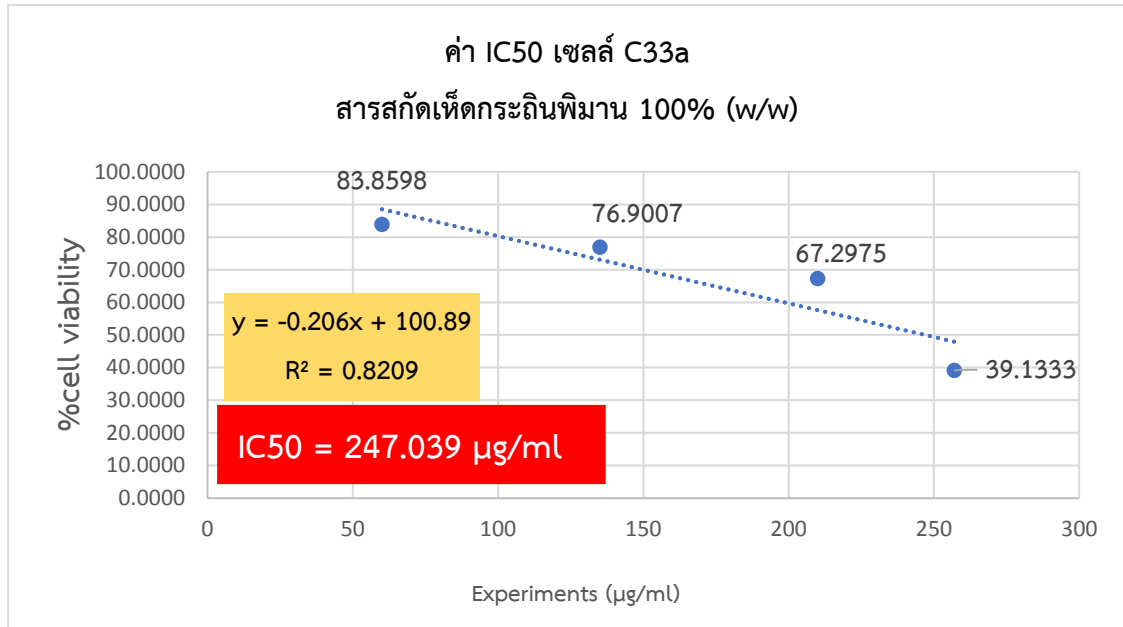
เจือจางสารสกัดสูตรที่ 4 ซึ่งมีองค์ประกอบของเห็ดกระถินพิมาน 20 % (w/w) กับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 และ 6000 µg/ml สารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w) กับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 2470, 1925 และ 1814 µg/ml ซึ่งเป็นค่า IC50 สำหรับเซลล์ C33a, SiHa และ HEK293T ตามลำดับ และเจือจาง Cisplatin กับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 30 µM ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ สัดส่วนสารสกัดหรือ cisplatin : cDMEM เป็น 1:9 เพื่อให้เซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่เท่ากันในทุกชุดการทดลอง

3. การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอด

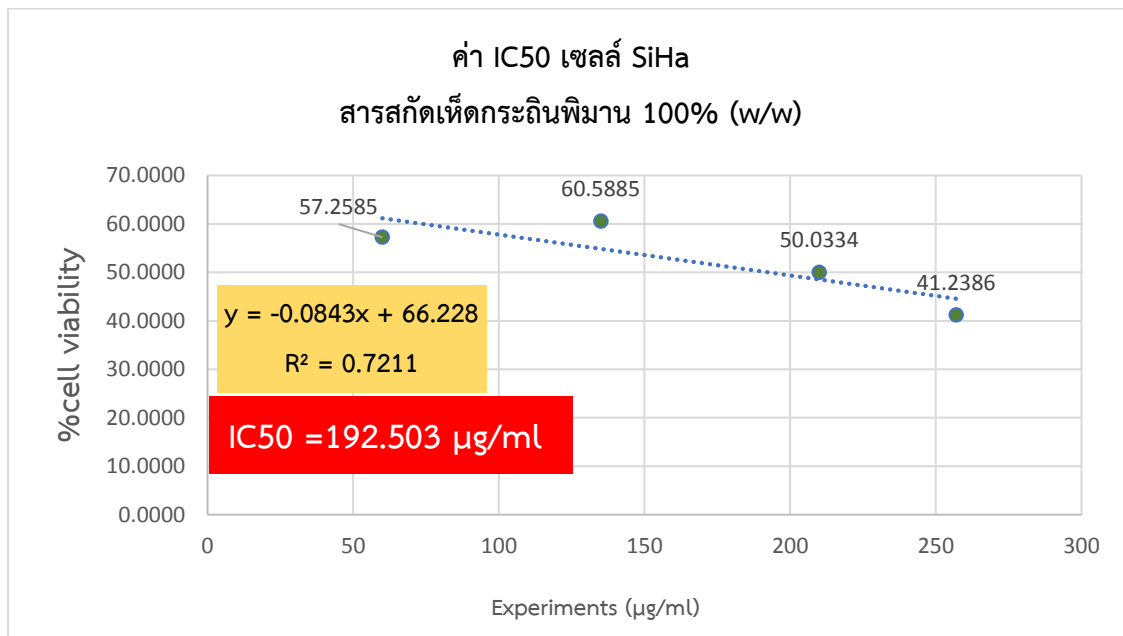
$$\% \text{cell viability} = \left(\frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของcell}) - (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของblank})}{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของcDMEM}) - (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของblank})} \right) \times 100$$

หมายเหตุ: blank คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์เลี้ยงอยู่

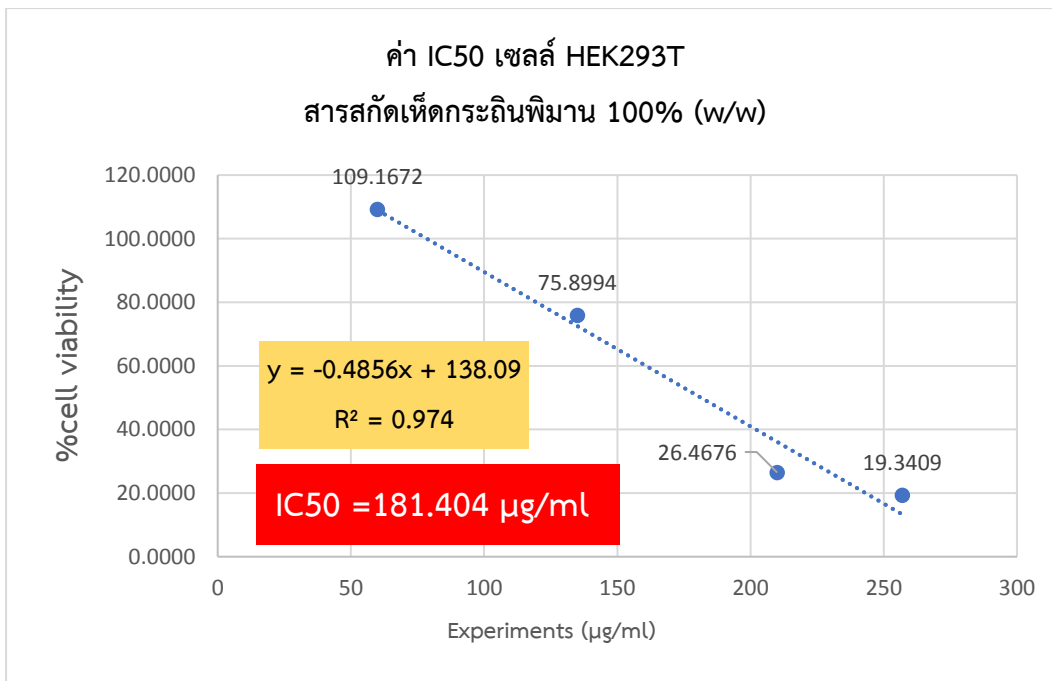
ภาคผนวก ข



ภาพผลของการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)



ภาพผลของการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินปริมาณเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)



ภาพผลของการมีชีวิตรอดของเซลล์ไต HEK 293T เมื่อได้รับสารสกัดที่มีเห็ดกระถินพิมานเป็นองค์ประกอบ 100% (w/w)