



การยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด
MDA-MB-231 โดยสารสกัดไคคลอโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2566



**INHIBITION OF CELL PROLIFERATION AND MIGRATION OF
MDA-MB-231 CELL LINES BY MYCELIAL
DICHLOROMETHANE EXTRACT FROM
*NEONOTHOPANUS NAMBI***

**BY
SAOWANEE SEANGTHONG**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE
COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE**

**GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2023**

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยสารสกัดไคคโลโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง

โดย

เสาวนีย์ แสงทอง

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2566

ผศ.ดร.ธีราวุฒิ ภูสันติสัมพันธ์
ประธานกรรมการสอบ

ดร.วาลูกา พลาขาม
กรรมการ

ดร.นันทพงศ์ ขำทอง
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.ฉัตรฉัตริน นาสมนต์
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ. ร.ต. หญิง ดร. วรณี สุขสาตร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

13 กันยายน 2566

Thesis entitled

**INHIBITION OF CELL PROLIFERATION AND MIGRATION OF MDA-MB-231
CELL LINES BY MYCELIAL DICHLOROMETHANE EXTRACT FROM
*NEONOTHOPANUS NAMBI***

by

SAOWANEE SEANGTHONG

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University
Academic Year 2023

Asst.Prof. Theerawut Phusantisampan Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Waluga Plaingam, Ph.D.
Member

Nanthaphong Khamthong, Ph.D.
Member and Co-Advisor

Lanlalin Nasomyon, Ph.D.
Member and Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vanee Sooksatra, D.Eng.)

Dean of Graduate School

September 13, 2023

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยเรื่อง การยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยสารสกัดไคคโลโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์ของผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบคุณ ดร.ลัดณ์ลาลิน นาสมนต์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ และ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง อาจารย์ที่ปรึกษารองที่ให้คำปรึกษาด้านการสกัดสารจากเห็ดเรืองแสง ตลอดจนการให้คำปรึกษา ให้ความรู้เพิ่มเติม และคอยแนะนำข้อมูลทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณผศ.ดร.พจนร ไกรดิษฐ์ ที่ให้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเต้านม MDA-MB-231

ขอบคุณวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ วิทยาลัยแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ มหาวิทยาลัยรังสิตที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับงานทดสอบฤทธิ์ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและการย้อมติเอนเอของเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ขอขอบคุณศูนย์รวมเห็ดบ้านอรัญญิก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์หมอบเห็ดเรืองแสงเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ธีราวุฒิ ภูสันติสัมพันธ์ ประธานกรรมการสอบ และดร.วาลูกา พลายงาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แสดงความคิดเห็นที่มีประโยชน์ทำให้การจัดทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสทางการศึกษาจนประสบความสำเร็จในวันนี้ คอยให้กำลังใจในการศึกษา และเป็นที่พึ่งแห่งความสุขตลอดมา ผู้วิจัยจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เสาวนีย์ แสงทอง

ผู้วิจัย

5906939 : เสาวนีย์ แสงทอง
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : การยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยสารสกัดไคคโลโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง
 หลักสูตร : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.ลัดณ์ลาลิน นาสมนนต์
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.นันทพงศ์ ขำทอง

บทคัดย่อ

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่พบบ่อยในสตรีทั่วโลก การใช้ยาต้านมะเร็งในปัจจุบันมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงและการดื้อยา จากรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากพืชและเห็ดหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นพิษและฤทธิ์ของสารสกัดไคคโลโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MDA-MB-231 ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์ โดยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเห็ดเรืองแสงถูกนำไปศึกษาความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยวิธี Wound Healing Assay ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของเห็ดเรืองแสงยับยั้งเซลล์ได้ดีเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากเส้นใยชั้นไคคโลโรมีเทน (MD) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ MDA-MB-231 ได้ดี ขณะที่มิพิยด้าต่อเซลล์ปกติ L-929 สารสกัด MD มีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูง เท่ากับ 9.40 ± 3.79 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ 304.00 ± 0.09 กรัมสมมูลของเคอซีดินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด MD เหนี่ยวนำให้สัณฐานวิทยาของเซลล์เปลี่ยนไปโดยพบการบวมของเซลล์ การหดของเซลล์ การหดตัวของโครมาติน และอะพอพโตติคบอดี นอกจากนี้ พบว่าสารสกัด MD ที่ความเข้มข้น 16.43 ± 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (IC_{50}) สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งที่เวลาต่างๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้จะถูกนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของสารสำคัญจากเห็ดเรืองแสงต่อเซลล์มะเร็งเต้านมต่อไป

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 57 หน้า)

คำสำคัญ: เห็ดเรืองแสง, สารสกัดไคคโลโรมีเทน, เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231, การเพิ่มจำนวนของเซลล์, การเคลื่อนย้ายของเซลล์

ลายมือชื่อนักศึกษา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

5906939 : Saowanee Seangthong

Thesis Title : Inhibition of Cell Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Cell Lines by Mycelial Dichloromethane Extract from *Neonothopanus nambi*

Program : Master of Science in Oriental Medicine

Thesis Advisor : Lanlalin Nasomyon, Ph.D.

Thesis Co-Advisor : Nanthaphong Khamthong, Ph.D.

Abstract

Breast cancer is a common disease in women worldwide. Treatment with anti-cancer drugs can cause adverse effects and drug resistance. Several previous studies have shown that extracts from plants and mushrooms exhibited growth inhibition effect and induction of apoptotic cell death. The aim of this study was to determine the cytotoxicity effect of the dichloromethane extract from mycelium (MD) of *Neonothopanus nambi* against MDA-MB-231 proliferation and migration. Crude extracts from filtrate and mycelium of *N. nambi* were then studied for their cytotoxicity by MTT assay, morphology and inhibition of migration using a wound-healing assay. The results displayed that the crude extracts from both filtrate and mycelium displayed toxicity against MDA-MB-231 in a dose-dependent manner. The MD extract exhibited a good effect on growth inhibition of MDA-MB-231 cells with low toxicity to L-929 normal cells. This extract showed the high total phenolic and total flavonoid content with 9.40 ± 3.79 mg Gallic acid/g extract and 304.00 ± 0.09 mg Quercetin/g extract, respectively. In addition, The MD extract induced the morphology change consisting of membrane blebbing, cell shrinkage, chromatin condensation and apoptotic bodies. Moreover, MD at the concentration of 16.43 ± 0.52 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) also inhibited the migration of cancer cells at different time points. These outcomes of the preliminary study will be further used to explore the molecular mechanism of active compounds from *N. nambi* against breast cancer.

(Total 57 pages)

Keywords: *Neonothopanus nambi*, Dichloromethane Extract, MDA-MB-231, Cell Proliferation, Cell Migration

Student's Signature Thesis Advisor's Signature

Thesis Co-Advisor's Signature

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง / ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ระบาดวิทยาของโรคมะเร็ง	6
2.2 โรคมะเร็งเต้านม	8
2.3 การกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านม	8
2.4 ปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเต้านม (Risk Factors)	9
2.5 อาการของมะเร็งเต้านม	10
2.6 การแบ่งระยะของมะเร็งเต้านม	11
2.7 การรักษา มะเร็งเต้านม	15
2.8 ผลข้างเคียงจากการรักษา มะเร็งเต้านม	16
2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10 เห็ดเรืองแสง (<i>Neonothopanus nambi</i>)	20
2.11 การตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (Apoptosis)	22
2.12 กลไกการเกิด Apoptosis	22
2.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเซลล์ที่เกิด Apoptosis	24
2.14 การแพร่กระจายของเซลล์แบบ Metastasis	24
บทที่ 3	26
ระเบียบวิธีการวิจัย	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	26
3.2 สารเคมี	27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3.4 เซลล์เพาะเลี้ยง	28
3.5 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง	28
3.6 สารสกัดจากเห็ดเรืองแสง	28
3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม	29
3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม	29
3.9 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929	30
3.10 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929 ด้วยวิธี MTT Assay	30
3.11 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์	31
3.12 การตรวจวัดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยวิธี DAPI Staining	31
3.13 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ มะเร็งเต้านมด้วยวิธี Wound Healing Assay	31
3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	33
4.1 สารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสง	33
4.2ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231	34
4.3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดไคคลอโรมินแทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง	36
4.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231	37
4.5 ฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA MB-231 โดยวิธี DAPI Staining	38
4.6 ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ด้วยวิธี Wound Healing Assay	39
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	42
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก การเตรียมสารเคมีและเทคนิคในการทดลอง	51
ประวัติผู้วิจัย	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสง	33
4.2	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสงที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งร้อยละ 50	35
4.3	แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกของสารสกัดไคคลอโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	37



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
1.1	กรอบแนวคิดของการวิจัย	3
2.1	โรคมะเร็งที่พบบ่อย 5 อันดับในเพศชาย	7
2.2	โรคมะเร็งที่พบบ่อย 5 อันดับในเพศหญิง	7
2.3	แสดงลำดับการพัฒนาแบ่งเซลล์จากปกติจนเกิดเป็นมะเร็งเต้านม	9
2.4	มะเร็งเต้านมระยะที่ 1	11
2.5	มะเร็งเต้านมระยะที่ 2	12
2.6	มะเร็งเต้านมระยะที่ 3A	13
2.7	มะเร็งเต้านมระยะที่ 3B	14
2.8	มะเร็งเต้านมระยะที่ 3C	14
2.9	มะเร็งเต้านมระยะที่ 4	15
2.10	แสดงสมการกลไกการจับโลหะของสารฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์	18
2.11	โครงสร้างของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์	18
2.12	เห็นเครื่องหมาย <i>Neonothopanus nimbi</i>	20
2.13	โครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จาก <i>N. nambi</i>	21
2.14	สูตรโครงสร้างของสาร Aurisin A	22
2.15	แสดงการตายของเซลล์แบบ Apoptosis	25
2.16	กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง	25
4.1	ร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231	35
4.2	กราฟแสดงค่าความเป็นพิษเข้มข้นของสารสกัดหยาบเห็นเครื่องหมาย	36
4.3	ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์ MDA-MB-231 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ	38
4.4	ลักษณะเซลล์ MDA-MB-231 ที่ย้อมสี DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์	39
4.5	ฤทธิ์ของสารสกัดเห็นเครื่องหมาย (MD) ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ด้วยวิธี Wound Healing Assay ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ	40
4.6	แสดงร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231	41

สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์

ความหมาย

พ.ศ.

พุทธศักราช

ค.ศ.

คริสต์ศักราช

AlCl_3

อลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum Chloride)

CH_2Cl_2

ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)

Cm

เซนติเมตร (Centimeter)

CO_2

คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide)

DMSO

ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide)

EtOAc

เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)

e.g.

ตัวอย่าง (For Example)

et al.

และอื่นๆ (*Et. Alii* (Latin), and Others)

g

กรัม (Gram)

h

ชั่วโมง (Hour)

IC_{50}

Inhibitory Concentration (IC) ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 50

KH_2PO_4

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate)

KCl

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)

M

โมลาริตี (Molarity)

ml

มิลลิลิตร (Milliliter)

n

จำนวนนับ (Counting Numbers)

nm

นาโนเมตร (Nanometer)

NaCl

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)

NaOH

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

สัญลักษณ์

NaNO_2

Na_2CO_3

Na_2HPO_4

OD

PBS

UV

V/V

W/V

%

$^{\circ}\text{C}$

μ

μ

μ

ความหมาย

โซเดียมไนไตรต์ (Sodium Nitrite)

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate)

ค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density)

สารละลายฟอสเฟต (Phosphate Buffer Saline)

รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)

ปริมาตรต่อปริมาตร (Volume by Volume)

น้ำหนักต่อปริมาตร (Weight by Volume)

เปอร์เซ็นต์ (Percent)

องศาเซลเซียส (Degree Celsius)

ไมโคร (Micro)

ไมโครกรัม (Microgram)

ไมโครลิตร (Microliter)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งถือเป็นปัญหาที่สำคัญในระบบสาธารณสุขระดับโลกที่คุกคามชีวิตประชากรในวัยทำงานไปจนถึงผู้สูงอายุ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2020 พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นมากกว่า 19 ล้านคน และอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นเป็น 9.6 ล้านคน ทั้งนี้พบรายงานผู้ป่วยใหม่และมีสถิติของผู้เสียชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 ในทวีปเอเชีย (World Health Organization, 2020) จากการสำรวจทางสถิติปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยพบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เข้ารับบริการสูงถึง 2,850 ราย 5 อันดับแรกที่พบมากที่สุดได้แก่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มักตรวจพบในระยะที่ 2 เป็นต้นไป โดยพบบ่อยในผู้ป่วยช่วงอายุ 20 ถึง 75 ปี พบมากที่สุดในช่วงวัย 55 ปี (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2562) วิธีการรักษาโรคมะเร็งเต้านมส่วนใหญ่ คือ เคมีบำบัด โดยถือว่าเป็นวิธีที่ตอบสนองต่อการรักษาได้ดีที่สุด แต่มักพบอาการข้างเคียงหลังการรักษา เช่น อาเจียน คลื่นไส้ ผอมลง ปากแห้ง คิดเชื่องช้า ซีดและเลือดออกง่าย (ศิริมาศ กาญจนวาส และ วิจิตรา ทศนียกุล, 2551) และด้วยระยะของโรคที่ดำเนินอยู่ในระยะก้าวหน้า ส่งผลให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร การผ่าตัด และการฉายรังสี มักพบว่าผู้ป่วยมีการกลับมาเป็นซ้ำ ขณะที่การรักษาโดยใช้ยาต้านมะเร็งมักพบปัญหาเรื่องการดื้อยาและมีอาการไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นหลังรักษา จากปัญหาข้างต้นทำให้มีการพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งและศาสตร์ทางการแพทย์ตะวันออก โดยการใช้สมุนไพรที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิสในการรักษาและลดการดื้อยาของผู้ป่วยโรคมะเร็ง เช่น สารสกัดขึ้นเอทานอลและชันน้ำของชาใบขลู่ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ Hela, C33A และ SiHa (ผาณา เอี้ยวชิโป และ ทรงกลด สารภูษิต, 2562) และนุรดินา จารง และคณะ (2561) พบว่า สาร Shogaol ในขิง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยงชนิด SKBR-3 และ MDA-MB-231 ทั้งนี้มีข้อมูลรายงานการศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเห็ด ได้แก่ เห็ดตระกูลหิง *Inonotus obliquus*, *Phellinus rimosus* และ *P. gilvus* เห็ดตระกูลเห็ดหลินจือ เช่น *Ganoderma lucidum* และ *G. tsugae* Murrill เห็ดตระกูลนางรม *Pleurotus florida* *P. eryngii* var.

eryngii, และ *P. pulmonaris* และ (Ajith and Janardhanan, 2007; Chang, Hwang & Rhee, 2008; Tsenga, Yangb & Mau, 2008; Zhao et al., 2008) ปัจจุบันเห็ดจึงถูกนำมาศึกษาวิจัยถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งมากขึ้น เช่นพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือชั้นเมทานอลและชั้นน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ (จริญญา งามขำ, 2560) เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ในด้านการแพทย์พบว่า สารพิษของเห็ดเรืองแสงจากเส้นใยของเห็ดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Sangsopha, et al., 2019) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งลำไส้ Colo205 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela (ฐาปนาวรรณ นาสมนนต์ และคณะ, 2561)

อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการค้นคว้าในเบื้องต้นยังไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของเห็ดเรืองแสงชนิดนี้ว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Triple Negative Breast Cancer (TNBC) หรือเรียกว่าเป็นเซลล์ที่ถึงแม้ไม่มีตัวรับสัญญาณ (Growth Receptors) ก็สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งตัวรับสัญญาณ (Receptor) 3 ชนิด ได้แก่ ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen Receptor, ER) ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone Receptor, PR) และโปรตีน Human Epidermal Growth Factor Receptor-1 (HER-1) (Chavez, Garimella & Lipkowitz, 2010) ซึ่งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด TNBC นี้พบว่ามีประสิทธิภาพดีต่อยาในกลุ่ม Anthracyclines ได้แก่ ยาเคมีบำบัด Doxorubicin และ Epirubicin (Isakoff, 2010) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าถ้าสารสกัดเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ MDA-MB-231 และการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส หรือความสามารถในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Migration) ซึ่งการวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของสารในระดับโมเลกุลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ด้วยตัวทำละลาย Hexane, CH_2Cl_2 และ EtOAc

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

1.2.4 เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและ DAPI ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231

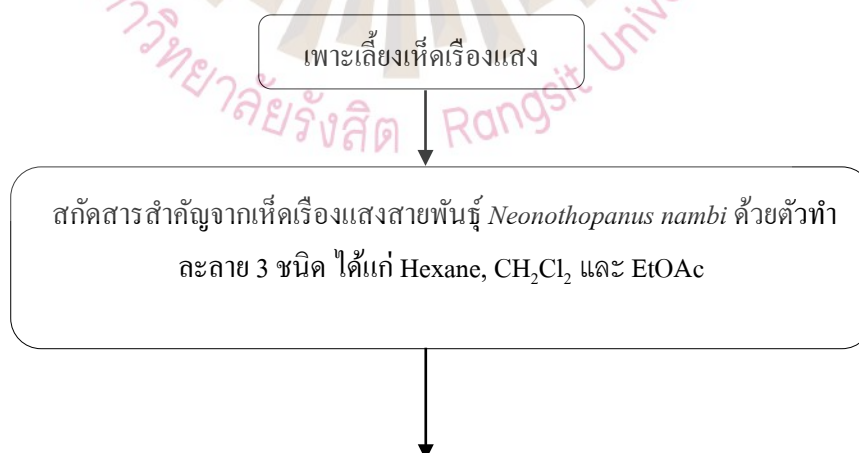
1.2.5 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell Migration) มะเร็งเต้านม ชนิด MDA-MB-231

1.3 สมมติฐานการวิจัย

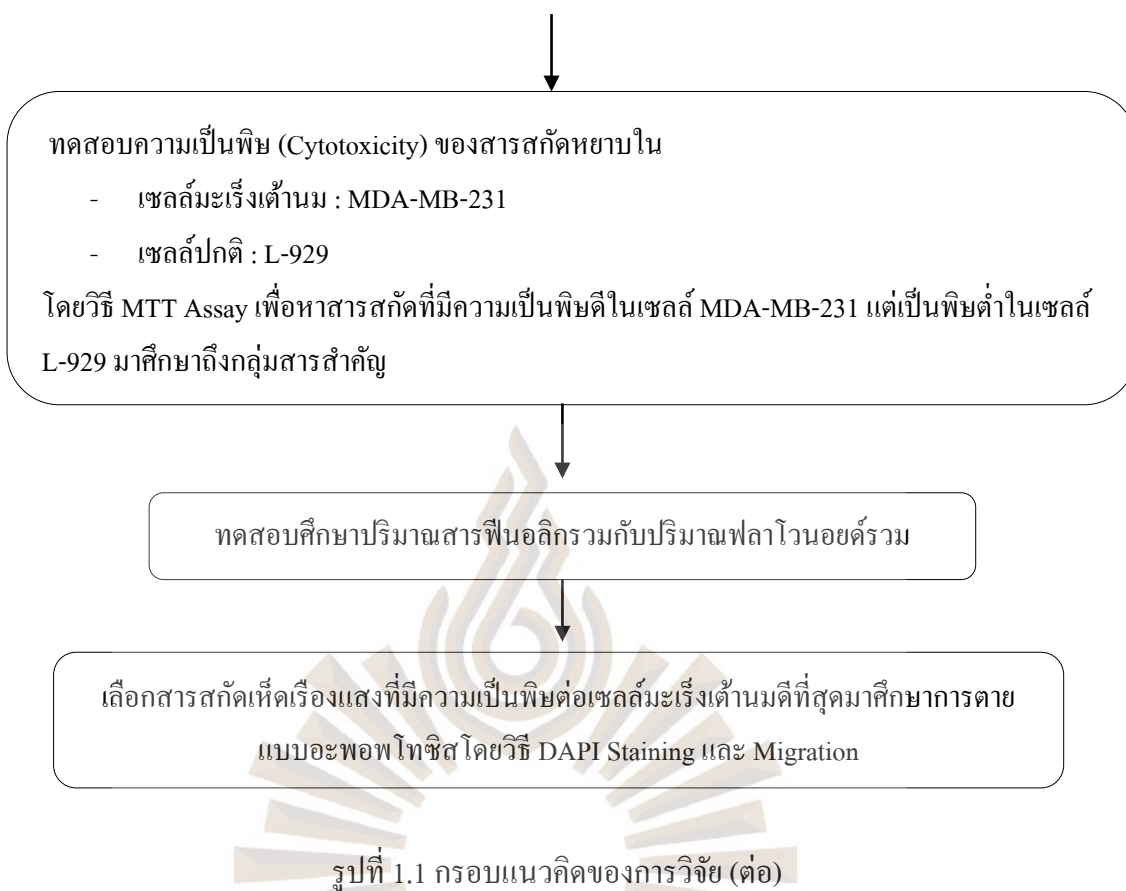
สารสกัดจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

ผู้วิจัยทำการเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* แล้วนำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ Hexane, CH_2Cl_2 และ EtOAc จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นกับเซลล์ MDA-MB-231 เพื่อหาสารสกัดที่มีความเป็นพิษดีในเซลล์ MDA-MB-231 แต่เป็นพิษต่ำในเซลล์ L-929 มาศึกษาถึงกลุ่มสารสำคัญ และการศึกษาการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ร่วมกับการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เบื้องต้น โดยสรุปเป็นแผนผัง ดังนี้



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดของการวิจัย



1.5 นิยามศัพท์

การศึกษาความเป็นพิษด้วยวิธี MTT Assay หมายถึง วิธีการทดสอบความในหลอดทดลองเพื่อดูค่าความเป็นพิษของเซลล์ โดยอาศัยความมสามารถของเอนไซม์ Dehydrogenase และ Co factor ใน Mitochondria ที่จะรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ซึ่งเป็นสารสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นสีม่วงของผลึกฟอร์มazan (Formazan) ดังนั้นถ้าเซลล์มีชีวิตก็จะเห็นผลึกฟอร์มazan ที่มีสีม่วงภายในเซลล์ ในขณะที่เซลล์ที่มีสีใส ไม่มีสีแสดงว่าเป็นเซลล์ที่ตายแล้วเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อละลายด้วยตัวทำละลาย เช่น DMSO จะได้สารละลายสีม่วงที่โดยสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ได้ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่ม Control ซึ่งรายงานความเป็นพิษของสารจากระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (50% Cytotoxic Concentration : CC_{50})

เห็ดเรืองแสง หมายถึง เห็ดเรืองแสงสิรินธรมิ (*Neonothopanus nambi*) เป็นเห็ดเรืองแสงชนิดหนึ่งคล้ายเห็ดนางรม แต่จัดเป็นเห็ดที่มีพิษ ในช่วงเวลากลางวัน ก้าน ดอก และครีบจะมีสีขาว

แต่เวลากลางคืนหรือที่ไม่มีแสง ดอกของเห็ดจะเปล่งแสงสีเขียวอมเหลือง เห็ดชนิดนี้มีการค้นพบในประเทศไทย เมื่อ ปีพ.ศ. 2544 ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช โดยพระราชดำริ ในสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อยู่ที่โลกภูตาคา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น จึงได้รับการพระราชทานชื่อว่า “สิรินธรศรี”

การตายแบบอะพอพโทซิส หมายถึง เป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (Programmed Cell Death) ของเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์ตายอย่างมีแบบแผนที่เฉพาะ หรือคือการที่ทำให้เซลล์มีลักษณะพื้นฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป เช่น เซลล์มีการบวม (Blebbing), เยื่อหุ้มเซลล์หยาบ, นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน, โครมาตินหนาตัวขึ้น, และดีเอ็นเอแตกเป็นชิ้นส่วน กระบวนการกำจัดเศษซากเซลล์ก็จะไม่ก่อให้เกิดเนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหาย ซึ่งต่างกับการตายเฉพาะส่วนหรือเนโครซิส (Necrosis)

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแบบ Metastasis คือ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจากตำแหน่งที่ก่อตัวขึ้นครั้งแรกไปยังส่วนอื่นของร่างกาย ในการแพร่กระจาย เซลล์มะเร็งจะแตกตัวจากเนื้องอกดั้งเดิม เดินทางผ่านระบบเลือดหรือน้ำเหลือง และก่อตัวเป็นเนื้องอกใหม่ในอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของร่างกาย เนื้องอกระยะแพร่กระจายใหม่เป็นมะเร็งชนิดเดียวกับเนื้องอกหลัก ตัวอย่างเช่น หากเซลล์มะเร็งเต้านมที่เป็น Primary Tumor หรือมีต้นกำเนิดที่เต้านม เซลล์ดังกล่าวมีการเคลื่อนที่ (Cell Migration) แล้วแพร่กระจาย (Metastasis) ไปที่ปอด เซลล์มะเร็งที่ไปเจริญเติบโตใหม่ที่ปอดเรียกว่า Secondary Tumor หรือเป็นเซลล์มะเร็งปอดที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็งเต้านม

บทที่ 2

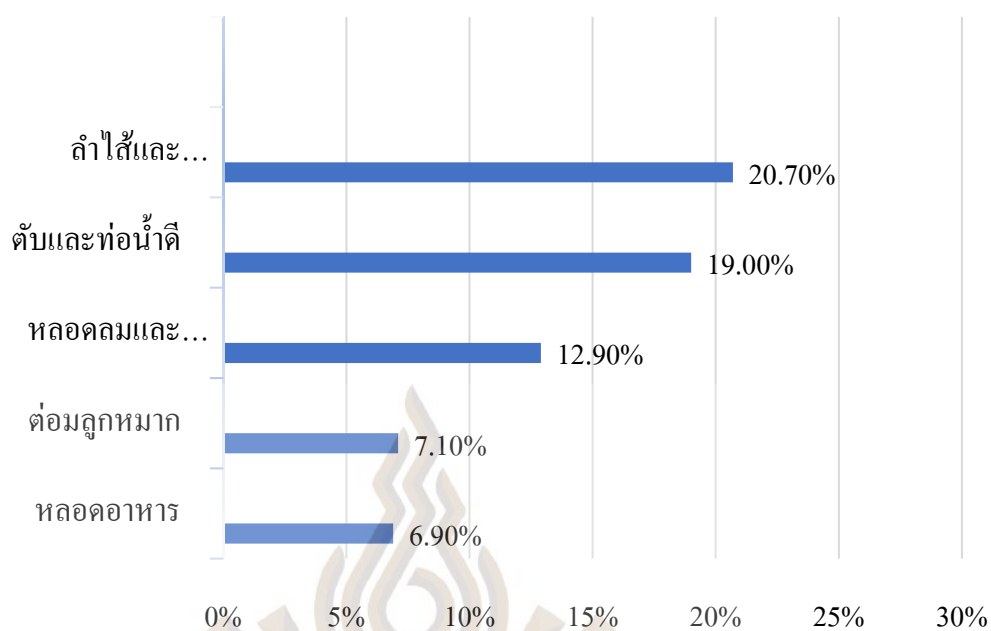
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง / ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบาดวิทยาของโรคมะเร็ง

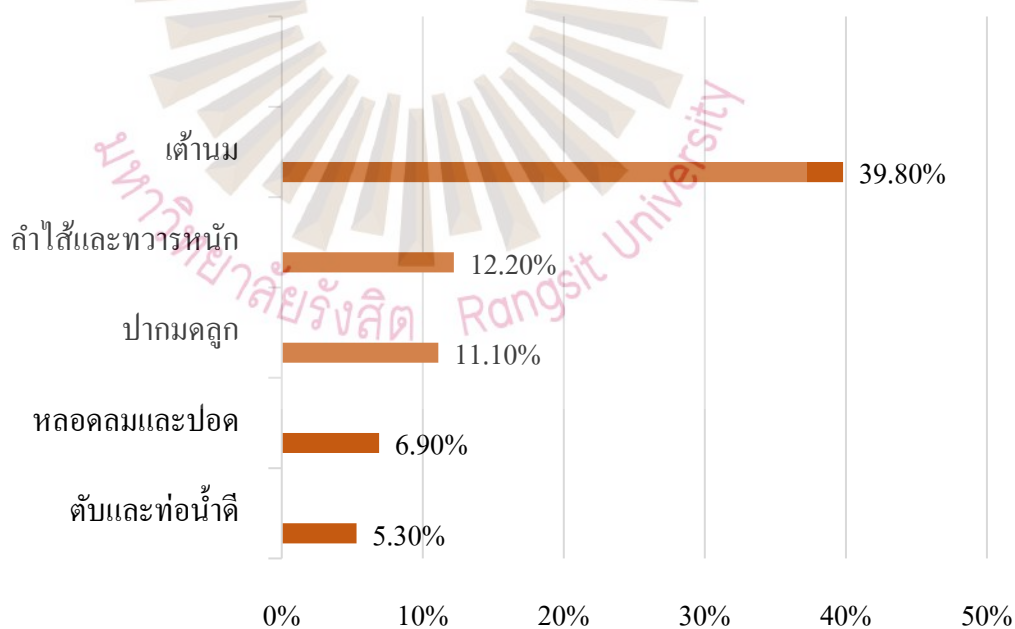
โรคมะเร็ง คือ กลุ่มอาการของโรคที่มีความผิดปกติของสารพันธุกรรม (DNA) ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็วและมีจำนวนมากกว่าปกติ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้องอกที่มีความผิดปกติ และทำให้เซลล์ในก้อนเนื้องอกขาดเลือดไปเลี้ยงจนเซลล์ตาย และยังส่งผลให้เนื้อเยื่อและอวัยวะใกล้เคียงเสียหาย รวมทั้งแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นที่อยู่ไกล โดยเคลื่อนไปตามหลอดเลือดและน้ำเหลือง เรียกว่า การแพร่กระจายของโรค (Metastasis) (วิมลพรรณ วรรณพฤษ, 2552)

รายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) เผยว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุทำให้ประชากรทั่วโลกเสียชีวิตเป็นอันดับต้น ๆ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในปี พ.ศ. 2563 มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่จำนวน 19.3 ล้านคน และมีแนวโน้มมากขึ้น อาจเนื่องจากการสถานการณ์การแพร่ระบาดโควิด 19 ทำให้ผู้ป่วยมาเข้ารับการรักษาน้อยลง ส่งผลให้ระยะของโรคลุกลามไปไกลกว่าจะได้เข้ารับการรักษา แม้ว่าโรคมะเร็งหลายชนิดมีโอกาสรักษาหายหากได้รับการวินิจฉัยในระยะแรก อีกทั้งผู้ป่วยมะเร็งยังอยู่ในกลุ่มเสี่ยงที่มีโอกาสรับเชื้อโควิด 19 ได้สูงขึ้นจึงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้น (World Health Organization, 2020)

ข้อมูลสถิติโรคมะเร็งประเทศไทยปี พ.ศ. 2563 จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าผู้ป่วยรายใหม่ 1,890 คน เป็นเพศชายจำนวน 1,145 คน และเพศหญิง 1,645 คน 5 อันดับแรกของโรคมะเร็งที่พบมาก ในชายไทย ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และหลอดอาหาร (รูปที่ 2.1) ส่วนมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกในหญิงไทย ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งหลอดลมและปอด (รูปที่ 2.2) เมื่อเปรียบเทียบอันดับและอัตราการเกิดโรคมะเร็งกับปี พ.ศ. 2548 พบว่า มะเร็งที่พบสูงสุด 3 อันดับแรกทั้งชายและหญิงยังคงเดิม แต่อัตราการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 2.1 โรคกระเพาะที่พบมาก 5 อันดับในเพศชาย
ที่มา : สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2562



รูปที่ 2.2 โรคกระเพาะที่พบมาก 5 อันดับในเพศหญิง
ที่มา : สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2562

2.2 โรคมะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านม เกิดจากเยื่อเซลล์ท่อน้ำนมส่วนปลาย (Terminal Duct Lobular Unit) มีการแบ่งตัวของเซลล์มากขึ้นผิดปกติขึ้นจนโตเป็นก้อนและมีการลุกลามแพร่กระจายไปสู่อวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย (รพีพรรณ สุรสักดิ์วรกุล, 2551)

การก่อตัวของมะเร็งเริ่มจากความผิดปกติภายในเซลล์ในระดับโมเลกุลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ของดีเอ็นเอ เซลล์ที่ผิดปกติไม่สามารถซ่อมแซมการกลายพันธุ์และเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้มีการย่อยทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงเพื่อที่จะสามารถเคลื่อนตัวออกไปได้ทุกทิศทาง เกิดการลุกลามออกไปสู่ที่อื่น แพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง หลอดเลือดไปสู่อวัยวะต่าง ๆ โดยสาเหตุที่ทำให้เซลล์แรก เกิดการแบ่งตัวแบบผิดปกติขึ้นมา สันนิษฐานว่า มะเร็งเต้านมเกิดจากหลาย ๆ สาเหตุร่วมกัน โดยความผิดปกติต้นเหตุแรก คือ การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ และมีการกระตุ้นการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องจากสารกระตุ้นต่าง ๆ (หะสัน มูหาหมัด, 2555)

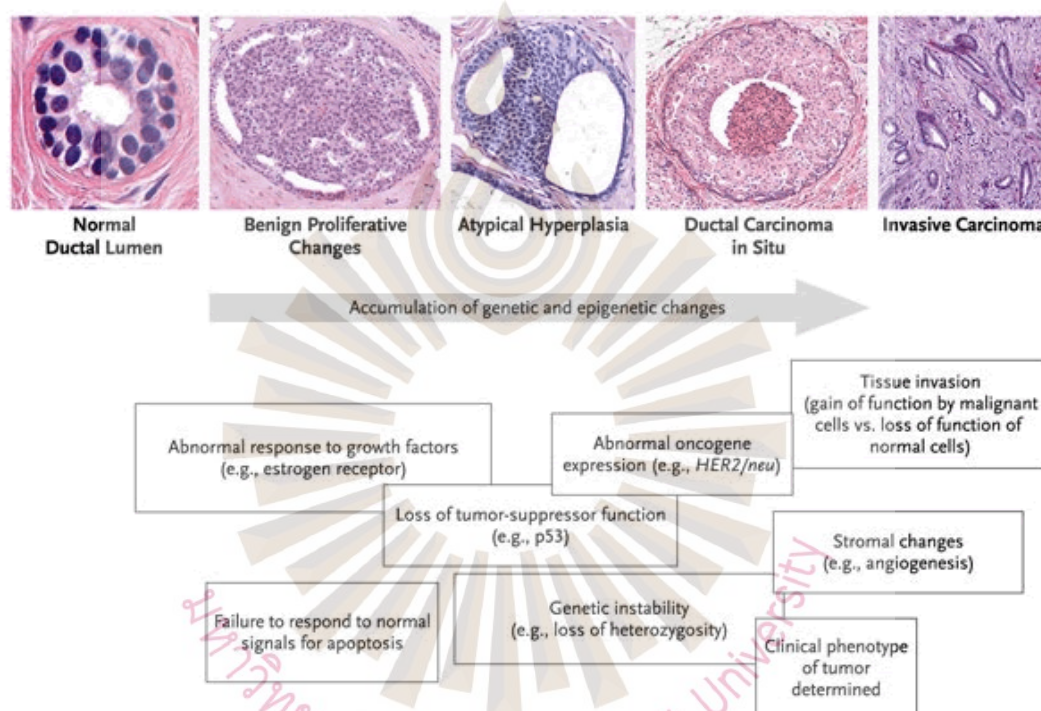
2.3 การกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นสาเหตุของมะเร็งเต้านม

หะสัน มูหาหมัด (2555) ได้อธิบายสาเหตุการเกิดมะเร็งเต้านมสามารถแบ่งออกเป็น 2 กรณี ดังนี้

2.3.1 การกลายพันธุ์ของยีนที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Oncogene) ทำให้เซลล์ที่มียีนที่กลายพันธุ์นั้นๆอยู่ เกิดการแบ่งตัวขึ้นเรื่อย ๆ ไร้ซึ่งจากการควบคุม มีการกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวตลอดเวลา ตัวอย่างของ Oncogene ในมะเร็งเต้านม ได้แก่ erbB-1 หรือ HER-1/neu และ c-myc, Cyclin D1 เป็นต้น

2.3.2 การสูญเสียการทำหน้าที่ของยีนต้านมะเร็ง (Tumor Suppressor Gene) ยีนต้านมะเร็งทำหน้าที่ระงับการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ หรือการแบ่งเซลล์ที่มากเกินไป ผ่านกลไกหลาย ๆ อย่าง เช่น กำหนดให้เซลล์ตาย (Apoptosis) หรือสร้างสารยับยั้งการแบ่งเซลล์ เช่น ยีน BRCA1 และ BRCA2 สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม หากเกิดการกลายพันธุ์จะเป็นสาเหตุหลัก

ของการเกิดมะเร็งเต้านมในคนอายุน้อย นอกจากนี้ก็มียีน p53 ซึ่งปกติมีหน้าที่คอยตรวจสอบความผิดปกติของ DNA ภายในเซลล์ และระงับการแบ่งตัวของเซลล์นั้น หาก p53 ทำหน้าที่ผิดปกติ ก็จะทำให้มะเร็งเกิดง่ายขึ้น เมื่อยีนที่ควบคุมการแบ่งเซลล์กลายพันธุ์ จนไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ เซลล์ก็จะถูกกระตุ้นจากสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวไปเรื่อย ๆ จนเกิดเป็นก้อนเนื้อมะเร็งขึ้นในที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงลำดับการพัฒนาแบ่งเซลล์จากปกติจนเกิดเป็นมะเร็งเต้านม โดยเซลล์ท่อน้ำนมปกติ (Normal Ductal Lumen) เซลล์เยื่อบุผิวมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Atypical Hyperplasia) จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งภายในท่อน้ำนมแต่ยังไม่มีการลุกลาม (Ductal Carcinoma in Situ) และเข้าสู่ระยะลุกลามไปยังอวัยวะอื่น (Invasive Carcinoma)

ที่มา : หะสัน มุหาหมัด, 2555

2.4 ปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเต้านม (Risk Factors)

ปัจจัยเสี่ยงให้เกิดมะเร็งเต้านมมีหลายประการที่เกี่ยวข้อง (ชญาวลี ศรีสุโข, 2552) ดังนี้

1) เพศหญิง

- 2) ช่วงอายุ 60-79 ปี มีโอกาสป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมมากที่สุด (รพีพรรณ สุรศักดิ์วรกุล, 2551)
- 3) ผู้ที่เคยเป็นโรคมะเร็งเต้านม สามารถกลับมาเป็นซ้ำอีก (รพีพรรณ สุรศักดิ์วรกุล, 2551)
- 4) จากประวัติครอบครัว มีคนเป็นมะเร็งเต้านม โดยเฉพาะในช่วงวัยที่ยังมีประจำเดือน
- 5) ผู้ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเสริม หรือรับประทานเนื้อสัตว์ที่เสริมฮอร์โมนเอสโตรเจน รวมทั้งการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนยาฆ่าแมลงดีดดี
- 6) ดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ
- 7) โรคอ้วน
- 8) การบริโภคอาหารที่ไม่หลากหลาย สารอาหารไม่ครบ หรือไขมันสูง
- 9) การสูบบุหรี่

2.5 อาการของมะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านม อาการเริ่มแรก คือ มีก้อนที่เต้านม และอาการอื่น ๆ นอกจากก้อนที่เต้านม (ชญวลี ศรีสุโข, 2551) ดังนี้

- 1) มีเลือดหรือน้ำเหลืองไหลออกจากหัวนม
- 2) มีความผิดปกติที่เต้านม เช่น ขนาดใหญ่กว่าอีกข้าง ห้อยย้อยลงกว่าอีกข้าง
- 3) รูปร่างของเต้านมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม
- 4) มีความแข็งผิดปกติที่บริเวณเต้านม
- 5) มีผื่นคล้ายขุยน้ำ เล็ก ๆ สีแดงส้มที่หัวนม
- 6) ผิวหนังบริเวณเต้านมมีสีแดงเหมือนมีการอักเสบ
- 7) พบรอยบุ๋มคล้ายเปลือกส้ม ผิวหนังบริเวณเต้านมหยาบกร้าน
- 8) หัวนมบุ๋มเหมือนถูกดึงรั้งทั้งที่ไม่เคยเป็น

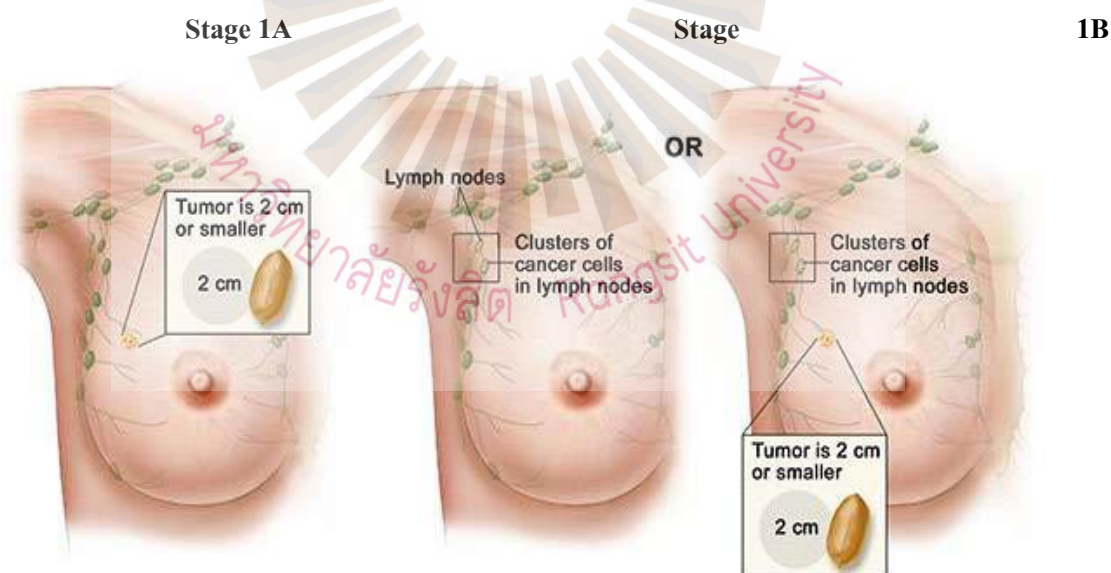
2.6 การแบ่งระยะของมะเร็งเต้านม

การแบ่งระยะของโรคมะเร็งเต้านมมีความสำคัญทางการแพทย์ เพราะสามารถวินิจฉัยและพิจารณาการให้การรักษาของผู้ป่วยได้ ซึ่งสามารถบอกได้ถึงขอบเขตการแพร่กระจายของโรค โดยพิจารณาจากขนาดก้อนเนื้อ การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง การแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ที่เรียกว่าระบบที่เอ็นเอ็ม (TNM) โดย ที (T-Tumor Size) หมายถึง ขนาดของก้อนเนื้อที่ตรวจพบ เอ็น (N-Node Involvement) หมายถึง เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง เอ็ม (M-Metastasis) หมายถึง การกระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะที่ไกลออกไป

ซึ่งสามารถแบ่งแยกระยะของมะเร็งเต้านมได้เป็น 5 ระยะ ดังนี้ (สุรพงษ์ สุภาภรณ์ และคณะ, 2547)

ระยะที่ 0 พบว่าก้อนมะเร็งขนาดเล็ก เซลล์มะเร็งยังอยู่ในชั้นผิวของเนื้อเยื่อเต้านม

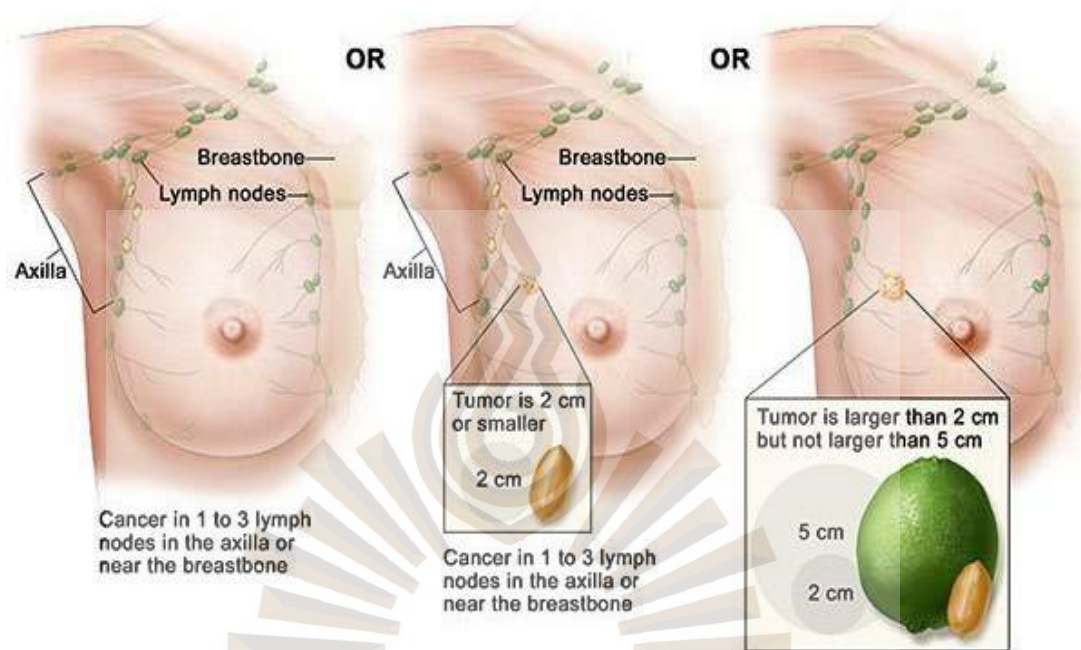
ระยะที่ 1 ขนาดก้อนมะเร็งไม่เกิน 2 เซนติเมตร ไม่กระจายเข้าไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 มะเร็งเต้านมระยะที่ 1 ก้อนเนื้อขนาดเล็กและไม่ลามเข้าต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ (ระยะที่ 1A - Stage IA) หรือ ลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ (ระยะที่ 1B - Stage IB) ยังไม่พบก้อนมะเร็งหรือขนาดไม่เกิน 2 เซนติเมตร

ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553

ระยะที่ 2 ขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 - 5 เซนติเมตร ไม่ลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองรักแร้ หรืออาจลุกลามเข้าไปที่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้แล้ว แต่ตรวจไม่พบก้อนมะเร็ง ดังแสดงในรูปที่ 2.5

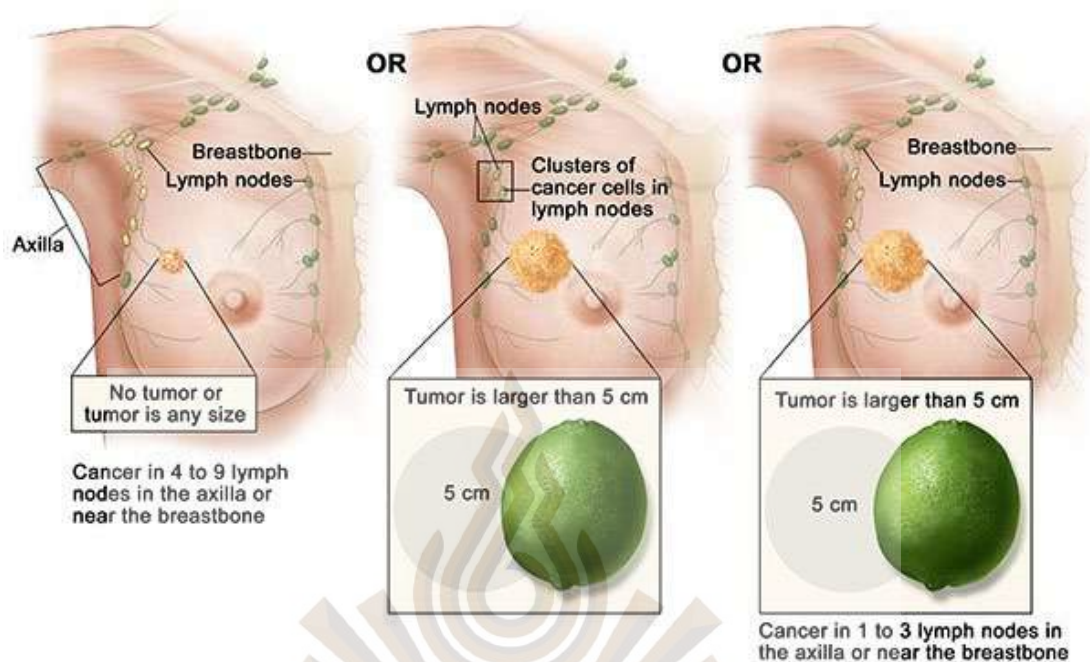


รูปที่ 2.5 ระยะที่ 2 ของมะเร็งเต้านม พบการลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณใต้รักแร้ แต่ไม่พบก้อนมะเร็ง หรือเป็นระยะที่ก้อนมะเร็งขนาดเล็กไม่เกิน 2 เซนติเมตร แต่มีลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ 1-3 ต่อมน้ำ หรือเป็นระยะที่ก้อนมะเร็งที่โตกว่า 2 เซนติเมตร แต่ไม่เกิน 5 เซนติเมตร แต่ยังไม่เข้าไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้

ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553

ระยะที่ 3 แบ่งออกเป็น 3 แบบดังนี้

ระยะที่ 3A (Stage IIIA) : พบก้อนมะเร็งใหญ่กว่า 5 เซนติเมตรและลุกลามไปต่อมน้ำเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 2.6

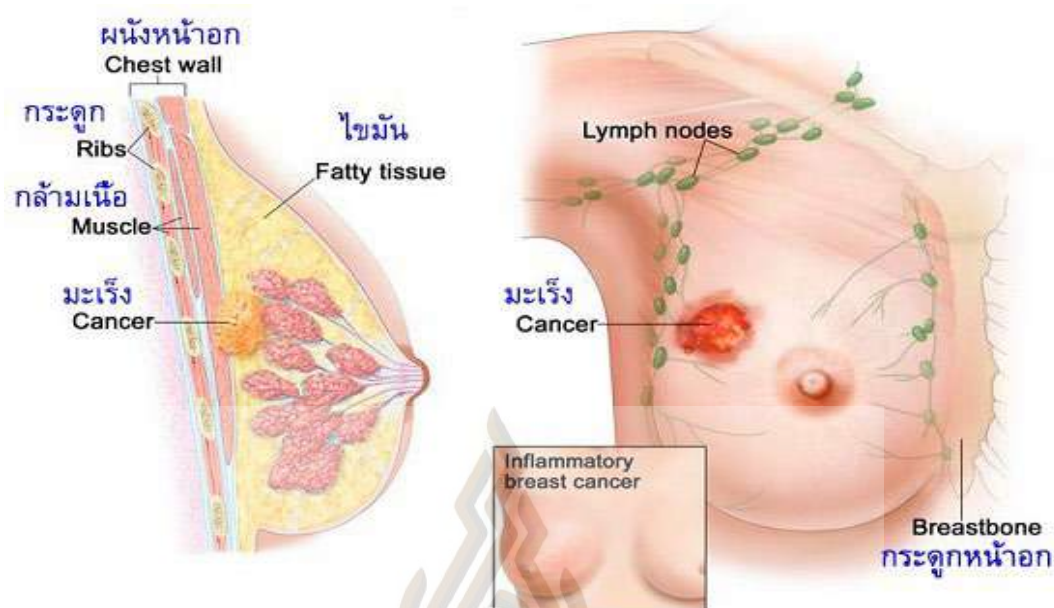


รูปที่ 2.6 มะเร็งเต้านมระยะที่ 3A ตรวจไม่พบก้อนมะเร็งหรือพบก้อนมะเร็ง และมะเร็งได้ลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ 4-9 ต่อม หรือพบก้อนมะเร็งที่ขนาดมากกว่า 5 เซนติเมตร และลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ (เป็นเซลล์มะเร็งกลุ่มเล็ก ๆ) หรือลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ 1-3 ต่อม

ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553

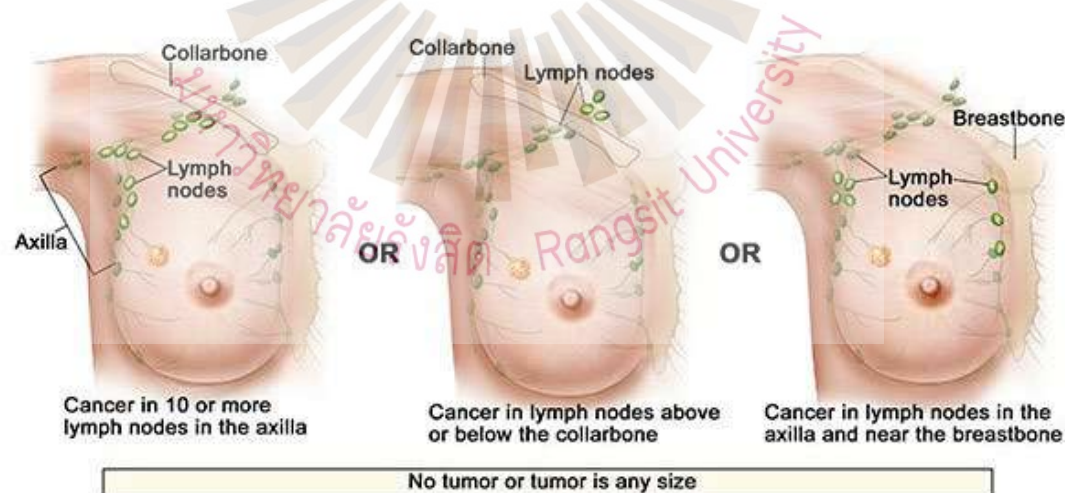
ระยะที่ 3B พบก้อนมะเร็งที่เต้านม และลามไปผิวหนังของเต้านมจนก่อให้เกิดภาวะบวมและอาจลามเข้าไปต่อมน้ำเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 2.7

ระยะที่ 3C พบก้อนมะเร็งที่เต้านม โดยที่มะเร็งได้ลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ ไหล่บ่า หรือต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้กับกระดูกหน้าอก ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.7 มะเร็งเต้านมระยะที่ 3B ตรวจพบก้อนมะเร็ง และลุกลามไปผนังหน้าอก หรือผิวหนังของเต้านมจนทำให้เกิดการบวม และอาจกระจายเข้าไปต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้หรือต่อมน้ำเหลืองใกล้กับกระดูกหน้าอก

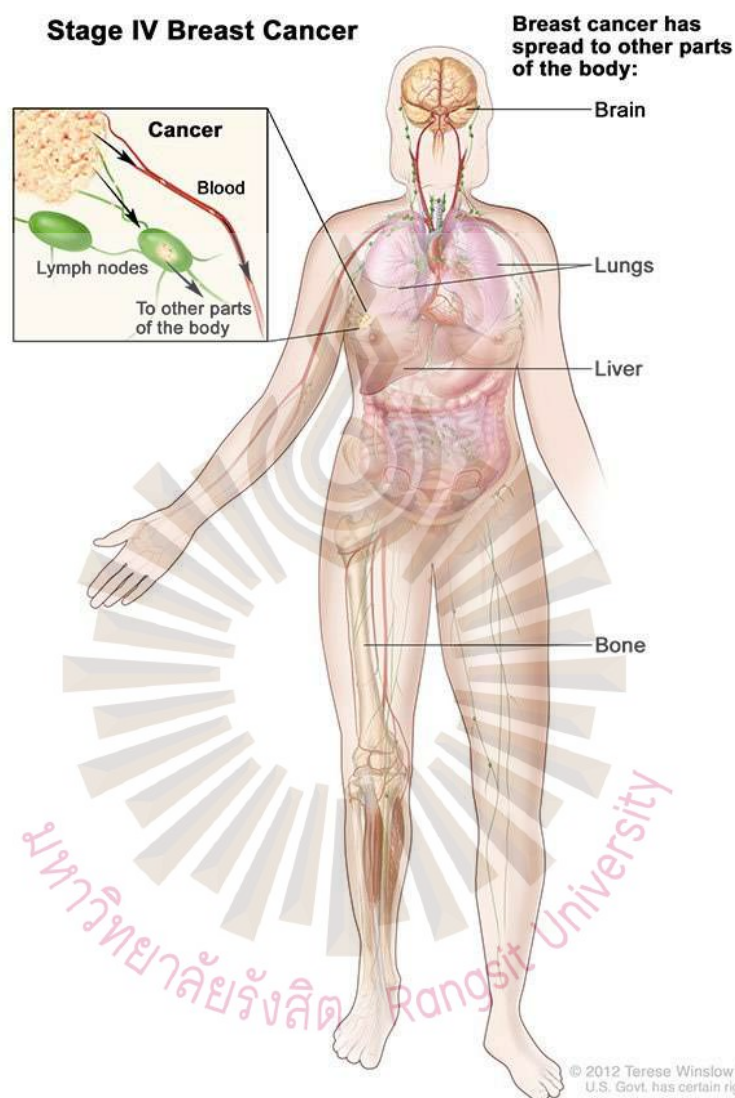
ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553



รูปที่ 2.8 แสดงระยะที่ 3C พบก้อนมะเร็งที่ และมะเร็งได้ลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้มากขึ้น หรือลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณไหปลาร้า หรือลุกลามเข้าไปต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้กับกระดูกหน้าอก

ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553

ระยะที่ 4 มะเร็งได้แพร่กระจายเข้าไปในหลอดเลือดและนุกรุกไปอวัยวะอื่น ๆ โดยมักตรวจพบได้บ่อย ได้แก่ สมอง ปอด ตับ กระดูก และไขกระดูก ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ระยะที่ 4 ของโรคมะเร็งเต้านม พบการลุกลามและแพร่ไปยังอวัยวะอื่น
ที่มา : พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553

2.7 การรักษา มะเร็งเต้านม

วิธีรักษามะเร็งเต้านมมาหลายวิธี เพื่อการรักษาที่ดีมักใช้ร่วมกันมากกว่าหนึ่งวิธี (อรุณโรจนสกุล,บุรณี กาญจนถวัลย์, ชัยณู พันธุ์เจริญ,อุษา ทิสยากร และอดิสร ภัทราดุลย์, 2550; ชัยวุฒิ ศรีสุโข, 2552) ดังนี้

- 1) ผ่าตัด เอาเต้านมออกทั้งหมด หรือผ่าตัดเพื่อเก็บเต้านมไว้ โดยการผ่าตัดต่อน้ำเหลืองรักแร้ด้านเดียวกันออก
- 2) เคมีบำบัด ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็งขนาดมากกว่า 1 เซนติเมตร หรือมีการลุกลามของมะเร็งเต้านมสู่ต่อมน้ำเหลือง หรือเข้ากระแสโลหิตแล้ว
- 3) รังสีรักษา มักใช้หลังการผ่าตัดและเคมีบำบัด โดยจะมีการฝังสี และการฉายรังสี
- 4) การใช้ฮอร์โมนบำบัด ในกรณีที่มะเร็งนั้นถูกกระตุ้นจากฮอร์โมนที่เพิ่มมากขึ้น แพทย์จะให้ยาที่เข้าไปลดการผลิตฮอร์โมนนั้น (พวงทอง ไกรพิบูลย์, 2553)
- 5) ภูมิคุ้มกันบำบัด จะใช้ในกรณีที่ก้อนมะเร็งมากกว่า 1 เซนติเมตร เพื่อลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำ และใช้ในผู้ที่ต้องการใช้เคมีบำบัด

2.8 ผลข้างเคียงจากการรักษามะเร็งเต้านม

หลังการรักษามะเร็งที่อาจเกิดอาการข้างเคียงขึ้นได้แก่

- 1) การผ่าตัด มักมีความเสี่ยงต่อการดมยาสลบ และผู้ป่วยอาจเสียเลือด สูญเสียเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ
- 2) การใช้รังสีรักษา ทำให้เกิดแผลถลอกบริเวณผิวหนังที่ฉายรังสี คล้ายแผลไฟไหม้ ผุพอง แผลอาจมีขนาดใหญ่ และอาจส่งผลให้เกิดการติดเชื้อได้
- 3) เคมีบำบัด อาจก่อให้เกิดอาการผื่นร่วง เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน มือเท้าชา อ่อนเพลีย เกิดภาวะซีด เม็ดเลือดขาวต่ำมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย มีเลือดออกได้ง่ายจากภาวะเกล็ดเลือดต่ำ การทำงานของไตลดลง เป็นต้น
- 4) ฮอร์โมนบำบัด อาจทำให้ผู้ป่วยมีภาวะตกขาวโดยไม่มีการติดเชื้อหรือมีเลือดออกผิดปกติทางช่องคลอด มีอาการปวดข้อ และเสี่ยงเป็นมะเร็งเยื่อบุมดลูก
- 5) ยารักษาตรงเป้า อาจทำให้เกิดลิ้นอักเสบ หรือทั้งใบหน้า และการได้รับยาบางกลุ่มอาจเกิดภาวะเลือดออกได้ง่าย แผลสมานยากหากเกิดบาดแผลและอาจเกิดภาวะผนังลำไส้ทะลุ ผลข้างเคียงที่กล่าวมานี้จะสูงและรุนแรงมากขึ้น ในกรณีที่ใช้วิธีรักษามากกว่าหนึ่งวิธี หรือผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวที่เรื้อรัง เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยสูบบุหรี่ และดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

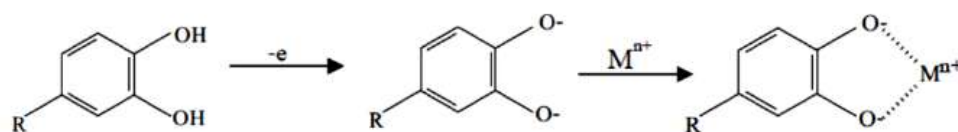
2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด

การใช้ประโยชน์จากเห็ดเพื่อเป็นอาหาร ยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพมียาวนานในหลายประเทศ เช่น จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินเดีย ทิเบต เนปาล รวมทั้งประเทศไทย ปัจจุบันเห็ดถูกนำมาสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางยา โดยพบว่ามี การนำไปใช้เกี่ยวกับ ภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy) โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ เลคติน (Lectin) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) โปรตีน (Protein) และพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) มีการเพาะเลี้ยงเห็ดในโรงเรือนที่ให้ผลผลิตมากขึ้น และลดการใช้ทรัพยากรจากธรรมชาติโดยตรง แต่ได้ปริมาณสารน้อยกว่าเห็ดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากเห็ดที่เพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาถึงโมเลกุลเป้าหมาย (Molecular Targets) ของเห็ดที่มีฤทธิ์ทาง การแพทย์มากมาย เช่น สารสกัดเห็ดไมตาเกะ ซึ่งมีสารสำคัญคือสาร β -glycan สามารถลดความ เสี่ยงการเกิดมะเร็งเต้านม และยับยั้งการแพร่กระจายและยับยั้งการโตของก้อนมะเร็งในหนูทดลอง ได้ (Roldan-Deamicis, Alonso, Brie, Braico & Balogh, 2016) ส่วน สารสกัดจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma Lucidum*) สามารถลดขนาดก้อนเนื้อร้ายที่เต้านมในหนูทดลองได้เช่นกัน และยังลด การแพร่กระจายของมะเร็งไปที่ปอด โดยสารในกลุ่ม Triterpenes และ Polysaccharides ที่มีฤทธิ์ ด้านมะเร็งผ่าน 5 กลไกหลัก ได้แก่ การเพิ่มภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อมะเร็ง (Enhance Anti-Tumor Immunity) การลดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้อยู่ในระยะ G1 และระยะ G2/M (G1 or G2/M Cell Cycle Arrest) การยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Anti-Angiogenesis) การชักนำให้เซลล์ ตายแบบอะพอพโทซิสผ่านวิถี Mitochondrial Dependent Pathway และการยับยั้งการอักเสบ Anti-Inflammation (Loganathan et al., 2014)

สารสำคัญที่พบในเห็ดชนิดต่าง ๆ กับการออกฤทธิ์ทางการแพทย์ เช่น

2.9.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) เป็นวงแหวนอะโรมาติก มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ซึ่งคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่ยังไม่มียารายงาน ยืนยันที่ชัดเจนถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารต่างชนิดกัน การออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้มีหลายกลไก เช่น

1) เป็นสารคีเลต คือ มีโครงสร้างเป็น Ortho-Dihydroxyl Group โดยจะไปจับกับ โลหะทรานซิชัน เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งขั้นตอนการจับกับโลหะของ ฟีนอลิกหรือ ฟลาโวนอยด์เป็น ดังสมการ



รูปที่ 2.10 แสดงสมการจับกันของโลหะของสารฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์

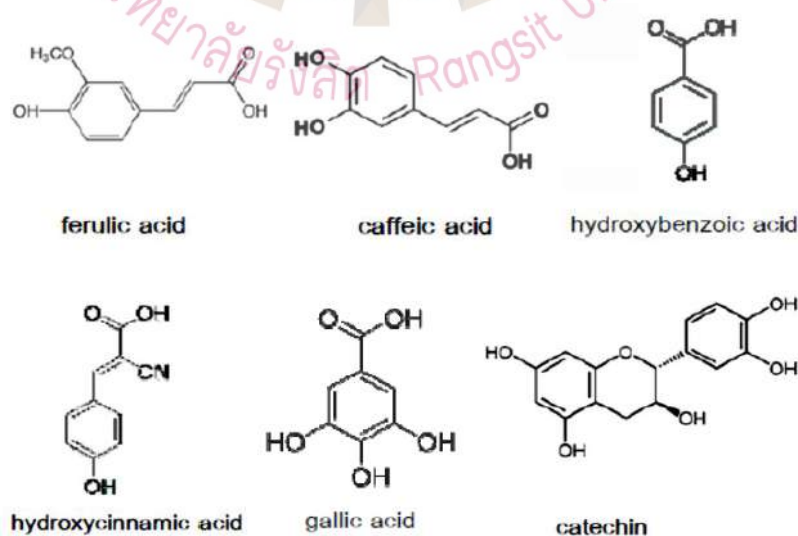
ที่มา : ลือชัย บุตุกุล, 2555

2) ด้านอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) สารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้โดยให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระใหม่ที่มีความเสถียร

3) เสริมฤทธิ์ (Synergism) ของวิตามินอี โดยการที่วิตามินอีให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($\text{ROO}^\bullet$) จะเปลี่ยนเป็นอนุมูลวิตามินอี จากนั้นสารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกจะทำการรีดิวส์ ให้อนุมูลวิตามินอีกลับมาเป็นวิตามินอีอีกครั้ง โดยจะมีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อีก

สารฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช ซึ่งจำแนกได้เป็นกลุ่ม ได้แก่

- 1) Gallic Acid ที่มาจาก Hydroxybenzoic Acids
- 2) Coumaric Acid และ Ferulic ที่มาจาก Hydroxycinnamic Acid ได้แก่
- 3) กลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Flavone, Isoflavones, Flavonol และ Anthocyanins
- และ 4) กลุ่มลิกนินส์ ได้แก่ Catechin, Proanthocyanidins และ Anthocyanidins



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก

ที่มา : ลือชัย บุตุกุล, 2555

2.9.2 โพลีแซคคาไรด์ สารพืชม มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ช่วยเพิ่มการบีบตัวให้กล้ามเนื้อหัวใจ โดยมีปฏิกิริยา ผ่านระบบภูมิคุ้มกันแล้วไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะทำงานร่วมกับ แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่ทำหน้าที่คุ้มกัน โดยออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อและ จับกับโพลีแซคคาไรด์ที่เกาะพาอาหาร และนำไปส่งเซลล์คุ้มกันอื่น โดยไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ ร่างกาย นอกจากนี้โพลีแซคคาไรด์ยังทำหน้าที่ให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ต่อต้านเชื้อไวรัส HIV ูสวัด และเริม ซึ่งช่วยลดผลข้างเคียงจากการให้เคมีบำบัดและรังสีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง สารที่มี คุณสมบัติเป็นยา เช่น กาโนเดอเรนส์ และสารเบต้ากลูแคน ได้แก่ Lentinan ที่สามารถยับยั้ง การ แพร่กระจายของเนื้องอกได้ (Sakai & Chihara, 1995)

2.9.3 สารไตรเทอร์ปีนอยด์ เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายไขมันแต่ไม่ใช่ไขมัน มีรสขม พบ มากในดอกและก้าน ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดหลินจือ โครงสร้างทางเคมีของสาร ไตรเทอร์ปีนอยด์มีความสำคัญที่นำมาใช้รักษาโรค ได้แก่ กรดกาโนเดอริก (Ganoderic Acid A, B, AM1, C1, C2, D-K & R-Z) กรดลูซิเดนิก (Lucidenic Acid) และกรดกาโนเดอร์มิก (Ganodermic Acid) (Yang, Wang, Guan, & Xia, 2007; Sye, 1991) โดยหน้าที่ของสารในกลุ่มนี้ได้แก่

1) ยับยั้งการหลั่งสารฮิสตามีน (Antihistamine) เมื่อเม็ดเลือดขาวชนิด Mast Cell ที่ ผิวหนัง ปอด หลอดลม และทางเดินหายใจ เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้แพ้ร่างกาย ก็จะมีการ หลั่งสารฮิสตามีน ซึ่งเป็นสารก่อแพ้ จากนั้นไตรเทอร์ปีนอยด์ก็จะทำหน้าที่ไปจับกับฮิสตามีน ทำให้อาการแพ้ลดลง

2) ปรับสมดุลของความดันโลหิตให้กลับสู่ปกติ

3) ลดการอุดตันของโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหลอดเลือด (Jeong et al., 2010)

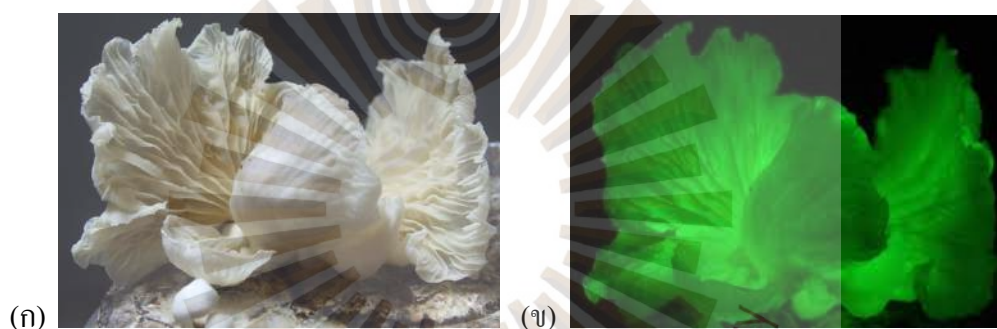
4) ด้านพิษต่อตับ ตับเมื่อได้รับสารพิษ เช่น ไวรัสตับอักเสบ เหล้า ยาลดไข้ใน ปริมาณสูงมาก ๆ สารไตรเทอร์ปีนอยด์นี้จะเข้าไปที่ตับและช่วยบำรุงตับก่อนและลดความเป็นพิษ ในตับได้ด้วย

5) มีกลไกต่อต้านมะเร็ง เช่น ในเห็ดหลินจือไตรเทอร์ปีนอยด์ทำงานร่วมกับ Adenosine และ Guanosine ช่วยยับยั้งการก่อตัวของเกล็ดเลือดและเส้นใยในเส้นเลือด ทำให้ เซลล์มะเร็งไม่สามารถหลบซ่อนตัวอยู่ในกลุ่มของเกล็ดเลือด (Ferreira, Vaz, Vasconcelos & Martins, 2010)

6) ช่วยลดผลข้างเคียงของเคมีบำบัดและการฉายแสง

2.10 เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*)

เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) อยู่ในวงศ์ *Marasmiaceae* เป็นเห็ดพิษที่มีสาร Luminescence รูปร่างคล้ายเห็ดนางรม โดยจะเจริญเป็นดอกเห็ด 4-5 ดอกบนขอนไม้ที่ตายแล้ว ในประเทศไทย พบมากในป่าของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Kanokmedhakul et al., 2012) หรือในป่าร้อนชื้นของภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเวียดนาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูฝน หรือแม้กระทั่งฤดูร้อนซึ่งจะพบมากตามโคลนของต้นไม้ นอกจากนี้ยังพบในแถบประเทศอเมริกาใต้ แคริเบียน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์และเซเชลส์ เห็ดชนิดนี้ถูกจำแนกให้อยู่ในตระกูล *Omphalotus* ในสถานะที่มีแสงหมวกเห็ดจะมีสีขาว ก้านสั้น เมื่ออยู่ในที่มีมืดจะเรืองแสงเป็นสีเขียวอมเหลือง ซึ่งสามารถมองเห็นการเปล่งแสงได้ในระยะ 10 ถึง 20 เมตร (วีระศักดิ์ สักคีศิริรัตน์, 2560)



รูปที่ 2.12 (ก) เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* เมื่ออยู่ในที่สว่าง

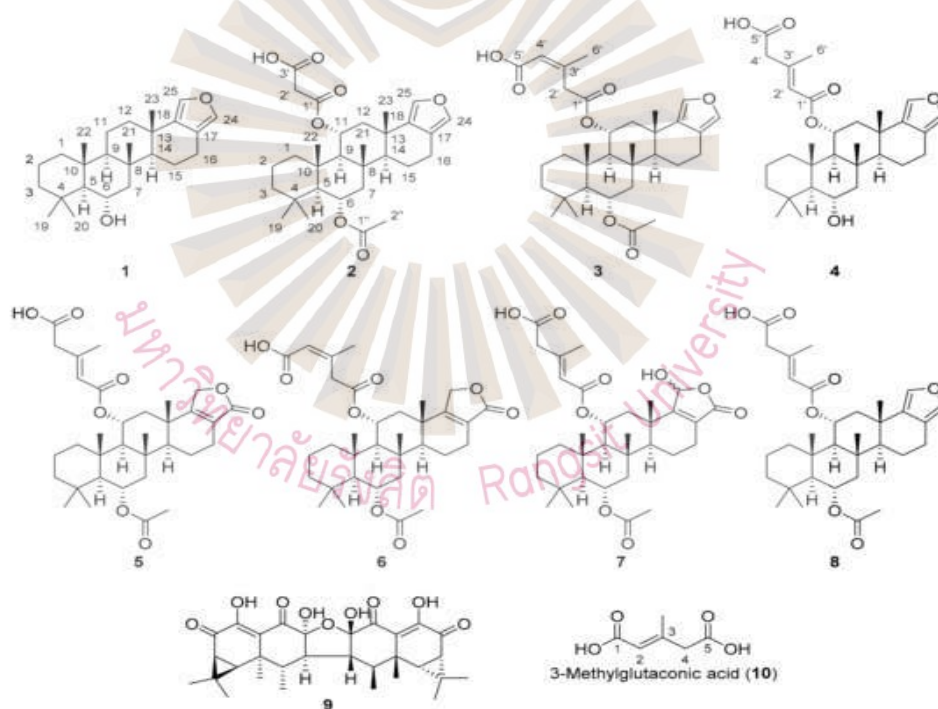
(ข) เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* เมื่ออยู่ในที่มืด เวลากลางคืน

ที่มา : นภา อาษารัฐ, 2555

ถึงแม้ว่าเห็ดเรืองแสงชนิดนี้มีความเป็นพิษ แต่จากรายงานการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงทั้งในส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่าไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาว โดยสารสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนสามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus Aureus* ATCC 29213 ได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 60 นาที (สุกัลญา หลีแจ้ง และคณะ, 2559) และพบรายงานสารสำคัญที่อยู่ในเห็ดเรืองได้แก่ Aurisin A, Aurisin K และ Nambinone C มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Cholangiocarcinoma, เซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MCF-7 และ BC1 และมีความเป็นพิษสูงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยให้ค่า IC_{50} น้อยกว่า 30 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์ KKKU-139, KKKU-156 และ KKKU-213 (Sangsopha et al., 2019) จาการายงานการวิจัยของ Namanusart, Saksirirat, Hirunsalee & Lekphrom. (2013) พบว่า สารสกัดของเห็ดชนิดนี้แสงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรควัณโรค ได้แก่

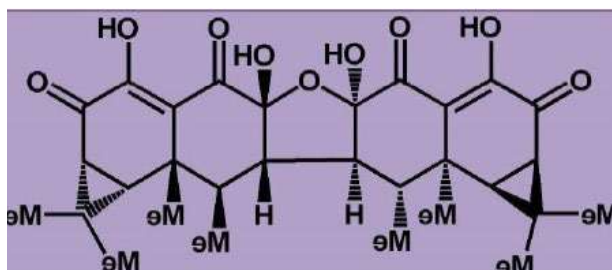
Mycobacterium Tuberculosis และยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *Plasmodium Falciparum* โดยสารบริสุทธิ์ Aurisin A และ Aurisin K ที่สกัดออกจากเห็ดเรืองแสง มีความเป็นพิษต่อ *P. falciparum* ให้ค่า IC_{50} 0.80 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้นเห็ดเรืองแสงยังมีฤทธิ์ยับยั้งการขยายจำนวนของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น Human Epidermoid Carcinoma (KB), Human Small Cell Lung Cancer (NCI-H187) (Kanokmedhakul et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า Aurisin A มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela, CaSki & SiHa) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยไม่ส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

มีการศึกษาว่าเส้นใยของ *Neonothopanus nambi* ที่สกัดด้วย EtOAc สามารถแยกสารประกอบ Nambiscalarane ออกมาได้ 10 ชนิด ดังรูปที่ 2.13 โดย สารประกอบ 3, 5, 7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A549, HT29, HeLa และ HCT-16 แต่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตร และ สารประกอบ 8 มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *Bacillus Subtilis* (Wisetsai et al., 2021)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จาก *N. nambi* (1 – 8), Aurisin A (9) และ 3-Methylglutaconic acid (10)

ที่มา : Wisetsai et al., 2021



รูปที่ 2.14 สูตรโครงสร้างของสาร Aurisin A ของเห็ดเรืองแสงสิรินรีสมิ

Neonothopanus nambi ไอโซเลต PW2

ที่มา: สุริย์พร บัวอาจ, 2554

2.11 การตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (Apoptosis)

หมายถึง กระบวนการของเซลล์ที่เกิดการตายตามสภาวะปกติของร่างกายที่ เริ่มตั้งแต่เมื่อครั้งตัวอ่อนเริ่มเจริญเติบโตในครรภ์ (Embryo) จนกระทั่งโตเป็นผู้ใหญ่ โดยเซลล์ที่ตายจะถูกยีนที่มีความจำเพาะควบคุม เพื่อกำจัดเซลล์ต่าง ๆ ที่ร่างกายไม่ต้องการรวมทั้งเซลล์ที่ทำงานผิดปกติ หรือเซลล์ที่จะเป็นอันตรายต่อร่างกาย คำว่า “Apoptosis” มาจากภาษากรีกซึ่งแปลว่า “ตกลงมา (Falling Off)” ซึ่งเปรียบเสมือนใบไม้ที่หลุดร่วงจากกิ่งไม้ตามกำหนดเวลา หรืออาจเรียกการตายของเซลล์ที่ถูกกำหนดไว้แล้วตามธรรมชาติแบบอะพอพโทซิสว่าเป็น “Programmed Cell Death” (เจตนา เรื่องประทีป, 2562)

2.12 กลไกการเกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) (เจตนา เรื่องประทีป, 2562)

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เกิดขึ้นได้ 2 วิธีคือ วิธีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย (Intrinsic Pathway) และ วิธีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย (Extrinsic Pathway)

2.12.1 วิธีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย (Intrinsic Pathway)

เมื่อเซลล์ในร่างกายเกิดสภาวะดังต่อไปนี้ได้แก่ (1) ขาดโปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโต (Growth Factor Withdrawal); (2) สารพันธุกรรม Deoxyribonucleic Acid (DNA) ถูกทำลายการฉายรังสี (Radiation) เซลล์ได้รับบาดเจ็บจากอนุมูลอิสระ (Free Radicals); หรือ (3) โปรตีนเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนถูกพับทำให้รูปร่างผิดปกติ (Misfolded Proteins) เซลล์มี

จำนวนมากขึ้นใน Endoplasmic Reticulum (ER) สืบเนื่องมาจากโรคทางพันธุกรรมและสมองได้รับโปรตีนพรีออน (Prion Diseases) ทำให้เซลล์นั้นมีความผิดปกติในการทำงานของ ER อย่างรุนแรง (Severe ER Stress) โดยภาวะดังกล่าวจะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตอบสนองแบบอะพอพโทซิส ซึ่งเริ่มจากกลุ่มโปรตีนตัวรับรู้ ได้แก่ โปรตีน Bad โปรตีน Bid และโปรตีน Bim เป็นต้น แต่จะมีเพียงโปรตีนบีเฮช 3 เท่านั้น (BH3-only sensors) ที่ทำหน้าที่กระตุ้นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ได้แก่ โปรตีน Bak และ โปรตีน Bax ให้ทำงาน ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นโปรตีน BH1, BH2 และ BH3 ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการเกิดอะพอพโทซิส โดยโปรตีน Bax และ Bak จะทำให้ Cytochrome *c* ที่อยู่กึ่งกลางเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของไมโทคอนเดรียรั่วเข้าสู่ไซโตพลาสซึมและจับกับโปรตีน Apaf-1 ใน Cytoplasm กลายเป็นสารประกอบโปรตีนเชิงซ้อน 7 แขน จากนั้นเอนไซม์แคสเปส-9 จะเข้าจับแขนทั้ง 7 ของโปรตีนเชิงซ้อนข้างต้น เรียกใหม่ว่า “อะพอพโทโซม (Apoptosome)” ซึ่ง Apoptosome นี้จะทำให้ Procaspase-9 ทั้ง 7 โมเลกุลที่จับอยู่กลายเป็นเอนไซม์แคสเปส และจะทำให้เส้นใยโปรตีนที่เชื่อมโยงกันเป็นร่างแห (Breakdown of Cytoskeleton) เกิดการชำรุดและกระตุ้นเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (Endonuclease) จนเกิดการแตกออกเป็นส่วนตัวเล็ก ๆ ในนิวเคลียสของเซลล์ (Nuclear Fragmentation) และส่งผลให้เซลล์ตาย

2.12.2 วิธีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย (Extrinsic Pathway)

เป็นการกระตุ้นการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกำจัดด้วยแมคโครเฟจ (Macrophages) โดยเริ่มจาก (ก) ตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย (Target Cells) กับโปรตีนฟาส (Fas Ligand) ที่ของเซลล์ Lymphocytes จับกับตัวรับการตายของโปรตีนฟาส (Fas Death Receptor) ของเซลล์ที่ตายแล้วนั้น หรือ (ข) โปรตีนชื่อว่า “ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ [Tumour Necrosis Factor (TNF)]” ซึ่งเป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันที่หลั่งมาจากเซลล์ Macrophages จับกับตัวรับของ TNF (TNF Receptor) บนผิวเซลล์ที่ตายแล้ว ส่งผลให้ Adaptor Proteins และ Procaspase-8 หรือ Procaspase-10 ที่อยู่ภายใน Cytoplasm รวมตัวกันกลายเป็นโปรตีนเชิงซ้อนเรียกว่า “Death-Inducing Signaling Complex (DISC)” ในตำแหน่งของขอบเซลล์เป้าหมาย โดย DISC ทำหน้าที่เปลี่ยน Procaspase-8 หรือ Procaspase-10 ไปเป็นเอนไซม์ Caspases และเกิดการเปลี่ยนแปลงจนนิวเคลียสของเซลล์เกิดการแตกออกเป็นส่วนตัวเล็ก ๆ ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด

ในขณะเดียวกันกลุ่มโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ต่อต้านกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น Bcl-2, Bcl-xL และ Mcl-1 เป็นต้น โดยมีโปรตีน BH1 โปรตีน BH2 โปรตีน BH3 และโปรตีนบีเฮช 4 (BH4) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งเมื่อโปรตีน Bcl-2 ที่อยู่ในรูป Inactive Bcl-2 จับ Bad จะกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส แต่หากเซลล์ในร่างกายได้รับสัญญาณการรอด

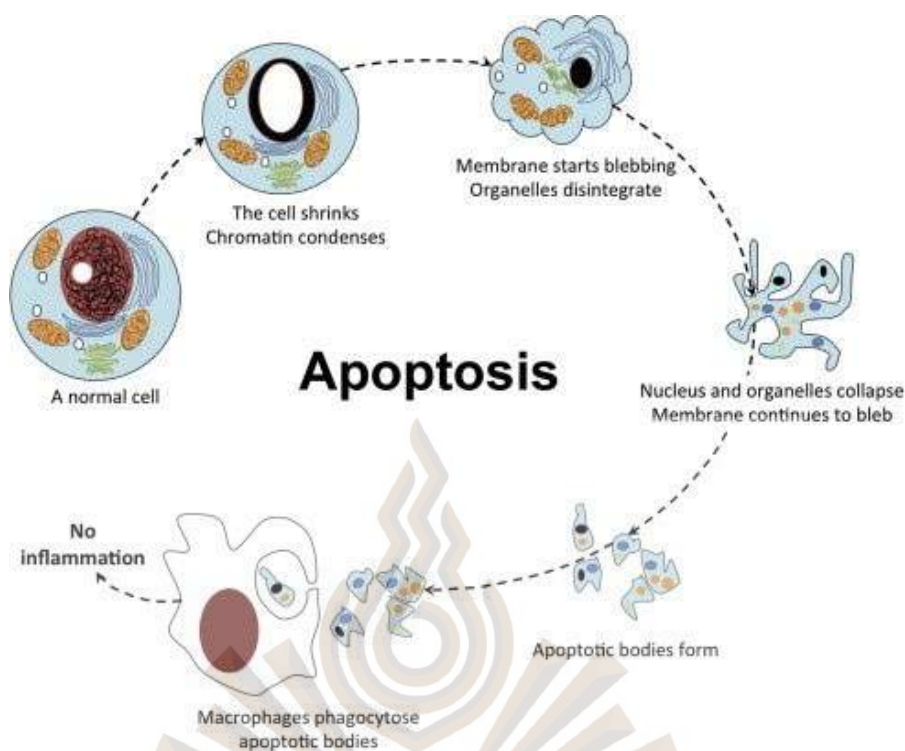
ชีวิต จะมีการกระตุ้นให้โปรตีนเอเคที (Akt) ทำงาน เกิดการ Phosphorylation ให้แก่โปรตีน Bad ทำให้โปรตีน Bad จับกับ Inactive Bcl-2 ไม่ได้ โปรตีน Bad ที่จะหยุดการทำงานและเปลี่ยนเป็น Inactive Bad ขณะที่โปรตีน Bcl-2 จะถูกกระตุ้นให้ทำงานและยับยั้งกระบวนการอะพอพโทซิสทำให้เซลล์มีชีวิตรอดและเจริญเติบโต

2.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเซลล์ที่เกิด Apoptosis

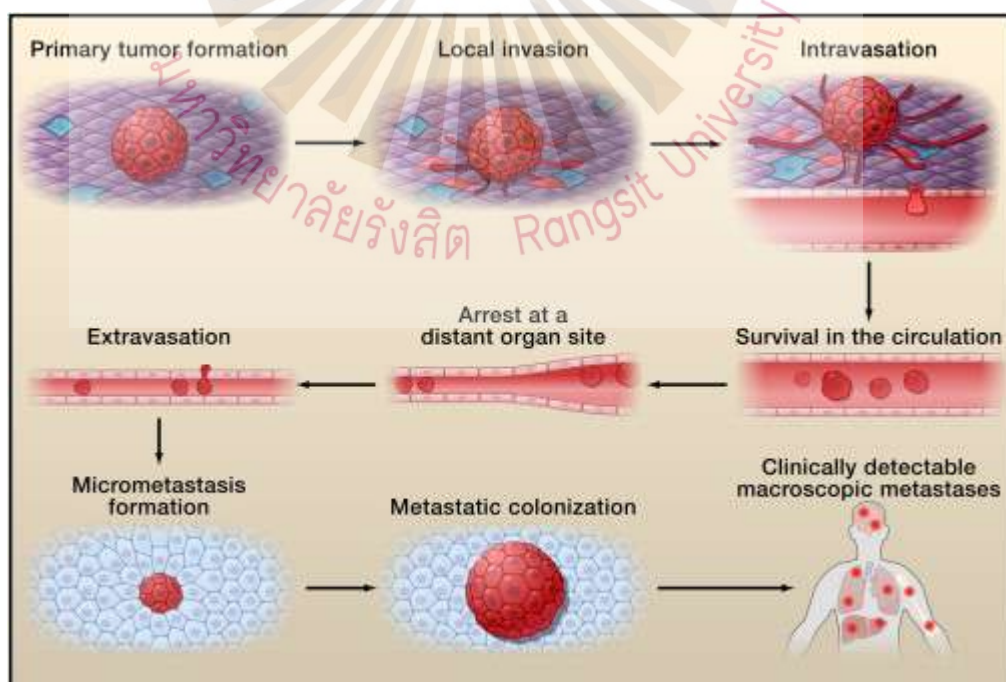
การตายแบบอะพอพโทซิส มักจะเกิดขึ้นกับเซลล์เพียงตัวเดียว (Single Cell) และเซลล์ข้างเคียงจะยังคงปกติอยู่ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบของเซลล์ โดยเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายโครมาตินที่อยู่ในไมโทคอนเดรียจะเกาะกลุ่ม นิวเคลียสของเซลล์จะหดตัว มีการกระตุ้นให้เอนไซม์ Endonuclease ทำงานและทำให้นิวเคลียสของเซลล์ที่เกิด Apoptosis คือมีขนาดเล็กลง แต่กระบวนการนี้จะไม่เกิดการทำลายของไมโทคอนเดรีย โดยส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Organelles) ยังคงอยู่ ซึ่งต่างจากการตายของเซลล์แบบ Necrosis ที่เกิดการทำลาย Organelles (Young, O'Dowd & Woodford, 2014, p.144 ; Stevens & Lowe, 2000, p.195) หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เกิด Apoptosis จะมีรูปร่างโป่งพองเป็นตุ่ม (Bleb) แล้วเยื่อหุ้มเซลล์นี้จะโอบล้อม Organelles ในไซโตพลาสซึมรวมถึงเศษของนิวเคลียสที่แตกออก จนกลายเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนมากซึ่งเรียกว่า “Apoptotic Bodies” ต่อจากนั้นเซลล์ Macrophages ก็จะเข้ามาจับกินเซลล์เหล่านี้ด้วยกระบวนการ Phagocytosis (Pollard, Earnshaw, Lippincott, Johnson & Elsevier, 2017)

2.14 การแพร่กระจายของเซลล์แบบ Metastasis

เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแพร่กระจาย ซึ่งหมายถึงเซลล์มะเร็งสามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งออกจากเซลล์ต้นกำเนิด (Primary Tumor) โดยอาศัยหลอดเลือดและน้ำเหลืองไปยังอวัยวะอื่นๆ และทำลายเซลล์ในอวัยวะเหล่านั้นให้เกิดความเสียหาย การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มจากการหลุดของเซลล์มะเร็งจาก Primary Tumor แล้วบุกรุกเข้าสู่ชั้นของเยื่อพื้นฐาน (Basement Membrane) และสารเคลือบเซลล์ (Extracellular Matrix; ECM) และเข้าสู่หลอดเลือดและน้ำเหลือง เมื่อเซลล์มะเร็งแพร่กระจายอยู่ในระบบเลือดและน้ำเหลือง ได้แล้วเซลล์มะเร็งก็เคลื่อนที่ออกจากกระบบเลือดหรือน้ำเหลือง และบุกรุกไปยังอวัยวะอื่น และเจริญต่อยังอวัยวะเป้าหมายใหม่ (Fidler, 2003)



รูปที่ 2.15 แสดงการตายของเซลล์แบบ Apoptosis
ที่มา : Karki, 2020



รูปที่ 2.16 กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง
ที่มา : Valastyan and Weinberg, 2011

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

การศึกษการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยสารสกัดไคคตอโรมีเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย มีดังนี้

- 1) Analytical Balance
- 2) Autoclave
- 3) Auto Pipette
- 4) Cell Counting Chamber
- 5) CO₂ Incubator
- 6) Flask 1000 ml.
- 7) Fluorescence Microscope
- 8) Glass Pasteur Pipette
- 9) Inverted Microscope
- 10) Centrifuge
- 11) Hot Air Oven
- 12) Larminar Airflow Carbinet
- 13) Microcentrifuge Tube
- 14) Micropipette
- 15) Micropipette Tips
- 16) Microplate Spectrophotometer
- 17) Rotary Evaporator
- 18) Vortex-genie 1 Autoclave

19) 96 Well Culture Plate

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย มีดังนี้

- 1) Curcumin
- 2) DAPI for Molecular Biology
- 3) 4',6-Diamidino-1-Phenylindole
- 4) Dichloromethane (CH_2Cl_2)
- 5) Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- 6) di-Sodium Hydrogen Orthophosphate
- 7) Doxorubicin
- 8) Ethyl Acetate (EtOAc)
- 9) Fetal Bovine Serum
- 10) Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent
- 11) Gallic Acid
- 12) Hexane
- 13) Hydrochloric Acid (HCL)
- 14) L-glutamine
- 15) Methanal
- 16) Penicillin Streptomycin
- 17) Phosphate Buffer Salin (PBS)
- 18) Potassium Chloride
- 19) Quercetin
- 20) Trypan Blue
- 21) Trypsin-EDTA
- 22) Sodium Chloride (NaOH)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย มีดังนี้

- 1) Potato Dextrose Broth (PDB)
- 2) Potato Dextrose Agar (PDA)
- 3) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3.4 เซลล์เพาะเลี้ยง

3.4.1 เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงในงานวิจัยมีดังนี้

- 1) MDA-MB-231 (Breast Cancer Cell Line)
- 2) L-929 (Mouse Fibroblast)

3.5 การเพาะเลี้ยงเห็ดเรืองแสง

เชื้อเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมเห็ดบ้าน อรัญญิก อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม เห็ดเรืองแสงถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะได้เส้นใยเห็ด จากนั้นเจาะเชื้อเห็ดด้วย Glass Pasteur Pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 9 ชิ้น ใส่ใน Flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และไม่มีแสง เป็นเวลา 60 วัน

3.6 สารสกัดจากเห็ดเรืองแสง

นำเส้นใยเห็ดเรืองแสงที่โตเต็มที่มารองเส้นด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จะได้ส่วนของเส้นใย (Mycelium) และ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Culture Filtrate) จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, CH_2Cl_2 และ EtOAc แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก สำหรับเส้นใย

นำไปหั่นเป็นชิ้นแล้วแช่ด้วยตัวทำละลาย Hexane, CH_2Cl_2 และ EtOAc นาน 3 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบที่ได้จากสารสกัดชั้น Hexane ของเส้นใย (MH), สารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ของเส้นใย (MD), สารสกัดชั้น EtOAc (ME), สารสกัดชั้น Hexane ของน้ำเลี้ยงเชื้อ (FH), สารสกัดชั้น CH_2Cl_2 ของน้ำเลี้ยงเชื้อ (FD) และ สารสกัดชั้น EtOAc ของน้ำเลี้ยงเชื้อ (FE)

จากนั้นนำมาคำนวณหา % yield ของสารสกัดพืช (Phrompittayarat et al., 2007) โดยการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารตั้งต้น โดยใช้สูตร

$$\% \text{ yield} = \text{น้ำหนักของสารสกัดพืช} / (\text{น้ำหนักแห้งของพืชสมุนไพร} \times 100)$$

3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Basker et al., (2011) และ Shian et al., (2011) โดยละลายสารสกัด MD ด้วยตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 Well Plates เติม 1 โมลาร์ Folin-Ciocalteu's Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Spectrophotometer ทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสาร ฟีนอลิกรวมโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic Acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg of Gallic Acid Equivalent)

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

โดยละลายสารสกัดเห็ดเรืองแสงด้วยตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตออกมาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plates เติม 1 โมลาร์ Folin-Ciocalteu's Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วย ทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic Acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (mg of Gallic Acid Equivalent)

3.9 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929

เซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ L-929 ถูกเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) โดยเติม 10% Fetal Bovine Serum, 10 มิลลิกรัม ของ 100 U/ml Penicillin, 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร Streptomycin และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO₂ 5 % โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวน (Propagation) จนมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 (80% Confluence) แล้วจึงขยายเซลล์โดยวิธี Trypsinization เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองต้องทำการนับจำนวนการอยู่รอดโดยวิธี Trypan Blue Exclusion และควรมีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 98

3.10 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929 ด้วยวิธี MTT Assay

เลี้ยงเซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ L-929 จำนวน 1×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 Well Culture Plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO₂ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane (CH₂Cl₂) และ Ethyl Acetate (EtOAc) และใช้ Curcumin เป็น Positive Control จากนั้นบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO₂ 5 % เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1X PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 0-4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วละลายตะกอน Formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ค่า OD ที่ได้นำมาคำนวณหา % Viability และค่า IC₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากสูตร

$$\text{Viability (\%)} = 100 \times \text{OD}_{570} \text{ Sample} / \text{OD}_{570} \text{ Blank (Control)}$$

3.11 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ MDA-MB-231 จำนวน 2.5×10^6 เซลล์ ใน 6 เซนติเมตร Cell Culture Plastic Dishes ที่ 24 ชั่วโมง เติมสารสกัด MD ที่ความเข้มข้น IC_{25} (8.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), IC_{50} (16.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), IC_{75} (14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IC_{100} (31.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Curcumin ที่ความเข้มข้น IC_{50} (16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 5 % เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ กำลังขยาย 20X ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์ ได้แก่ การหดของเซลล์ (Cell Shrinkage) การโป่งพองของผนังเซลล์ (Membrane Blebbing) การรวมตัวของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ (Organelle Condensation) และการแตกสลายของเซลล์แบบ Apoptotic Bodies

3.12 การตรวจวัดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยวิธี DAPI Staining

เพาะเลี้ยงเซลล์ MDA-MB-231 จำนวน 5×10^4 เซลล์ ใน 96 Well Culture Plate แล้วเติมสารสกัด MD ที่มีความเข้มข้นที่ IC_{25} , IC_{50} และ Curcumin ที่ความเข้มข้น IC_{50} นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และ Fix ด้วย Methanol แล้วย้อมตะกอนเซลล์ด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ DAPI จากนั้นนำมาตรวจสอบ Nuclear Morphology ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200x

3.13 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธี Wound Healing Assay

เลี้ยงเซลล์ MDA-MB-231 จำนวน 1×10^4 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมของ 96 Well Culture Plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขีดเซลล์ด้วย Tip ขนาด 200 ไมโครลิตร ให้เป็นแนวเส้นตรงผ่านกลางหลุม และล้างเศษเซลล์ที่ขูดออกด้วยสารละลาย 1X PBS เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM จากนั้นเติมสารสกัด MD และ Curcumin ที่ความเข้มข้น IC_{25} และ IC_{50} โดยใช้ตัวทำละลาย DMSO ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ความเข้มข้นสุทธิตัวทำละลาย = 0.05 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO₂ 5 % เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย 4X และเก็บข้อมูลเป็นเวลา 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้วิธีคำนวณของ Li et al., (2017) แสดงดังสมการ

$$\text{The Rate of Migration (\%)} = 100 \times \frac{\text{Wound Healing Width at } t_0 - \text{Wound Healing Width at } t_1}{\text{Wound Healing Width at } t_0}$$

Wound Healing Width at t_0 คือ ความกว้างของรอยแผลที่จุดที่เวลา 0 ชั่วโมง

Wound Healing Width at t_1 คือ ความกว้างของรอยแผลที่จุดที่เวลาต่างๆ (24, 48 และ 72 ชั่วโมง)

3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.D.) ร้อยละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสงที่ยับยั้งมะเร็ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.D.) ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ MDA-MB-231 รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.D.) และการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเรืองแสงที่ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งกับ Control วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Paired Sample T-test เพื่อกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 สารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสง

เห็ดเรืองแสงอายุ 60 วัน ถูกนำมากรองแยกส่วนเส้นใย (น้ำหนัก 41.71 กรัม) และน้ำเลี้ยงเชื้อ (ปริมาตร 6 ลิตร) จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Hexane (ขั้วต่ำ), CH_2Cl_2 (ขั้วปานกลาง), EtOAc (ขั้วสูง) ตามลำดับ ได้สารสกัดดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากตารางแสดงน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงพบว่า ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ FE มีน้ำหนักสารสกัดต่อลิตรมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่า FD และ FH ที่มีค่าเท่ากับ 0.61 และ 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และส่วนของเส้นใย MH มีร้อยละผลิตภัณฑ์มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 5.03 ซึ่งมากกว่า MD และ ME ที่มีร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.07 และ 3.89 ตามลำดับ ทำให้ทราบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีขั้วสูงขณะที่สารส่วนใหญ่ในเส้นใยมีขั้วต่ำ

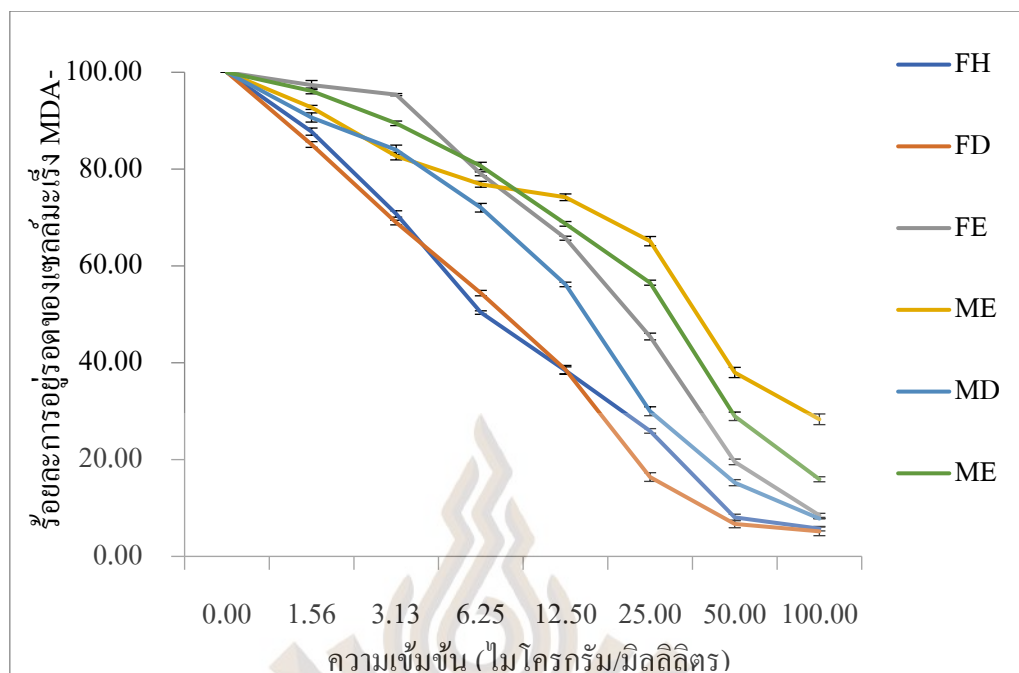
ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสง

ส่วนสกัดหยาบ*	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลิตภัณฑ์ (%)	น้ำหนักสารสกัดต่อลิตร (กรัม/ลิตร)	ลักษณะทางกายภาพ
FH	3.64	-	0.61	ของเหลวหนืดสีเหลือง
FD	1.64	-	0.17	ของเหลวสีน้ำตาล
FE	9.67	-	1.61	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MH	2.10	5.03	-	ของเหลวหนืดสีเหลือง
MD	0.03	0.07	-	ของแข็งสีน้ำตาล
ME	1.61	3.89	-	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม

*ส่วนสกัดหยาบ FH = น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย Hexane; FD = น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย CH_2Cl_2 ; FE = น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วย EtOAc; MH = เส้นใยสกัดด้วย Hexane; MD = เส้นใยสกัดด้วย CH_2Cl_2 ; ME = เส้นใยสกัดด้วย EtOAc

4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเห็ดเรืองแสงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231

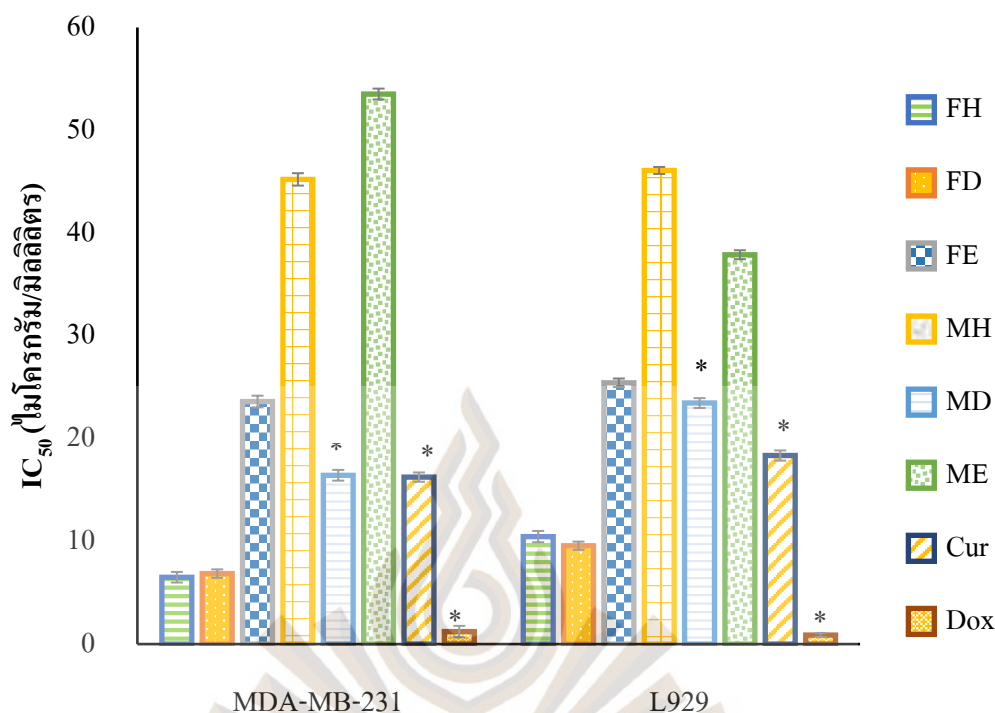
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929 ด้วยวิธี MTT Assay เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ สารมาตรฐาน Curcumin และ Doxorubicin เป็น Positive Control พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเรืองแสงมากขึ้นส่งผลให้ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 สารสกัด FH มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 มากที่สุด ($\text{IC}_{50} = 6.51 \pm 0.51$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือสารสกัด FD ($\text{IC}_{50} = 6.86 \pm 0.41$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐาน Curcumin ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 16.15 \pm 0.45$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ขณะที่ค่า IC_{50} ต่อเซลล์ L-929 ของสารสกัด FH และ FD เท่ากับ 10.46 ± 0.55 และ 9.57 ± 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งค่าสูงกว่าในเซลล์ MDA-MB-231 ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4.2 สารสกัด ME มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 น้อยกว่าเซลล์ L-929 ซึ่งจะเห็นได้จากค่าการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 ของ Doxorubicin ($\text{IC}_{50} = 1.11 \pm 0.55$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่สูงกว่าสารสกัดเห็ดเรืองแสง และมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ L-929 สูงมากเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด MD กับ Curcumin พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด MD กับ Doxorubicin พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) อย่างไรก็ตามการที่เราจะนำสารสกัดมาศึกษาต่ออาจต้องดูว่าสารนั้นต้องมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแต่ในขณะเดียวกันต้องมีความปลอดภัยหรือมีผลต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด และจากเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (NCI) ให้เกณฑ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบที่ยัง active ต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Boyd & Michael, 1997) และจากการทดลองพบว่าสารสกัด MD มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 16.43 \pm 0.51$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ L-929 ($\text{IC}_{50} = 13.46 \pm 0.48$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกนำสารสกัด MD มาศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสและดูความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเป็นลำดับต่อไป



รูปที่ 4.1 ร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 ที่แสดงความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงในตัวทำละลาย Hexane (FH), CH₂Cl₂ (FD), EtOAc (FE) และ ส่วนเส้นใยของเห็ดเรืองแสงในตัวทำละลาย Hexane (MH), CH₂Cl₂ (MD), EtOAc (ME) โดยวิธี MTT Assay ข้อมูลที่ได้คือ ค่าเฉลี่ยการอยู่รอดของเซลล์ $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (n=3)

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเห็ดเรืองแสงที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 (IC₅₀)

สารสกัด	IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	
	MDA-MB-231	L929
FH	6.51 $\pm$ 0.51	10.46 $\pm$ 0.55
FD	6.86 $\pm$ 0.41	9.57 $\pm$ 0.40
FE	23.60 $\pm$ 0.57	25.43 $\pm$ 0.41
MH	45.11 $\pm$ 0.60	46.09 $\pm$ 0.34
MD	16.43 $\pm$ 0.51	13.46 $\pm$ 0.48
ME	53.51 $\pm$ 0.53	37.89 $\pm$ 0.43
Curcumin	16.15 $\pm$ 0.45	18.35 $\pm$ 0.49
Doxorubicin	1.22 $\pm$ 0.55	0.88 $\pm$ 0.10



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษเข้มข้นของสารสกัดหยาบเห็ดเรืองแสงจากเส้นใย (Mycelium) ของเห็ดเรืองแสงในตัวทำละลาย Hexane (MH), CH_2Cl_2 (MD), EtOAc (ME) และ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Culture Filtrate) ของเห็ดเรืองแสงในตัวทำละลาย Hexane (MH), CH_2Cl_2 (FD), EtOAc (FE) ที่ยับยั้งเซลล์ MDA-MB-231 (IC_{50}), (* $P<0.05$ และ ** $P<0.01$)

4.3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดไคคลอโรมินเทนจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง (Total Flavonoid Content and Total Phenolic Content)

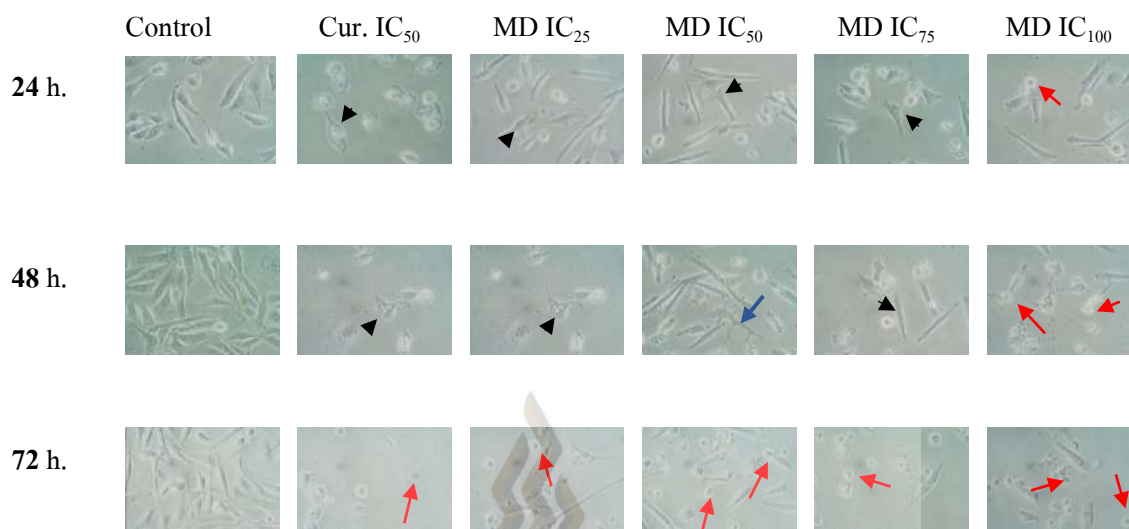
การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัด MD ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin ($Y=0.0011X-0.0045$; $r^1=0.999$) จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 9.40 ± 3.79 mg QE ส่วนปริมาณฟีนอลิกของสารสกัด MD ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin ($Y=0.0541X-0.0493$; $r^1=0.999$) เท่ากับ 304.00 ± 0.09 mg GAE

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกของสารสกัดไคคลอโรมีเทนจาก
เส้นใยเห็ดเรืองแสงที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตัวทำละลาย	Total Flavonoid Content (mg QE)	Total Phenolic Content (mg Gallic acid)
CH ₂ Cl ₂	9.40±3.79	304.00±0.09

4.4 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (Cell Morphology)

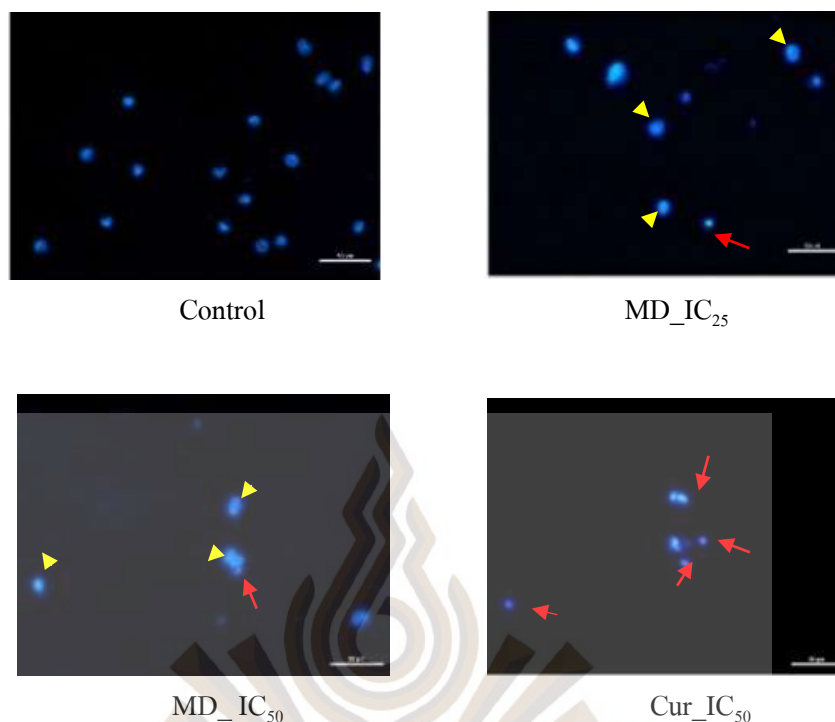
จากผลการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 ข้างต้นที่พบว่าสารสกัด MD มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 สูงแต่มีค่าความเป็นพิษต่ำกว่าเซลล์ L-929 โดยผลการทดสอบที่ความเข้มข้น IC₂₅, IC₅₀, C₇₅ และ IC₁₀₀ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ MDA-MB-231 มีลักษณะการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยมีการเปลี่ยนแปลง Epithelial Cell ที่มีรูปร่างเป็น Polygonal Normal Shape ไปเป็นเซลล์ที่มีการโป่งพองของผนังเซลล์ (Membrane Blebbing) นิวเคลียสของเซลล์มีการรวมตัวกันแน่นมากขึ้นและขอบของนิวเคลียสเป็นรอยหยัก (Nuclear Condensation and Lobulation) มีการหด (Cell Shrinkage) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง และเซลล์เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Caspase ทำให้เซลล์แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ และกลายเป็น Apoptotic Bodies (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ MDA-MB-231 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (กำลังขยาย 10X) โดยทดสอบกับสารสกัด MD ที่ความเข้มข้น IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ และ IC₁₀₀ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หัวลูกศรสีดำ (Membrane Blebbing) ลูกศรสีน้ำเงิน (Nuclear Condensation) สีแดง (Apoptotic Bodies)

4.5ฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดเรืองแสงในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA MB-231 โดยวิธี DAPI Staining

จากการศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ MDA-MB-231 โดยใช้การย้อมสี DAPI โดยหลังจากทดสอบกับสารสกัด MD ที่ความเข้มข้น IC₂₅ และ IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ Curcumin (IC₅₀) เป็น Positive Control พบว่าเซลล์ MDA-MB-231 มีลักษณะนิวเคลียสที่ผิดปกติไปโดยเซลล์ปกติ (Control) มีการติดสีกระจายสม่ำเสมอทั้งนิวเคลียส แต่เซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัด MD พบว่าโครมาตินรวมตัวกันแน่น (Chromatin Condensation) และนิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (Fragmented Apoptotic Nuclei) ดังแสดงในรูปที่ 4.4 สามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

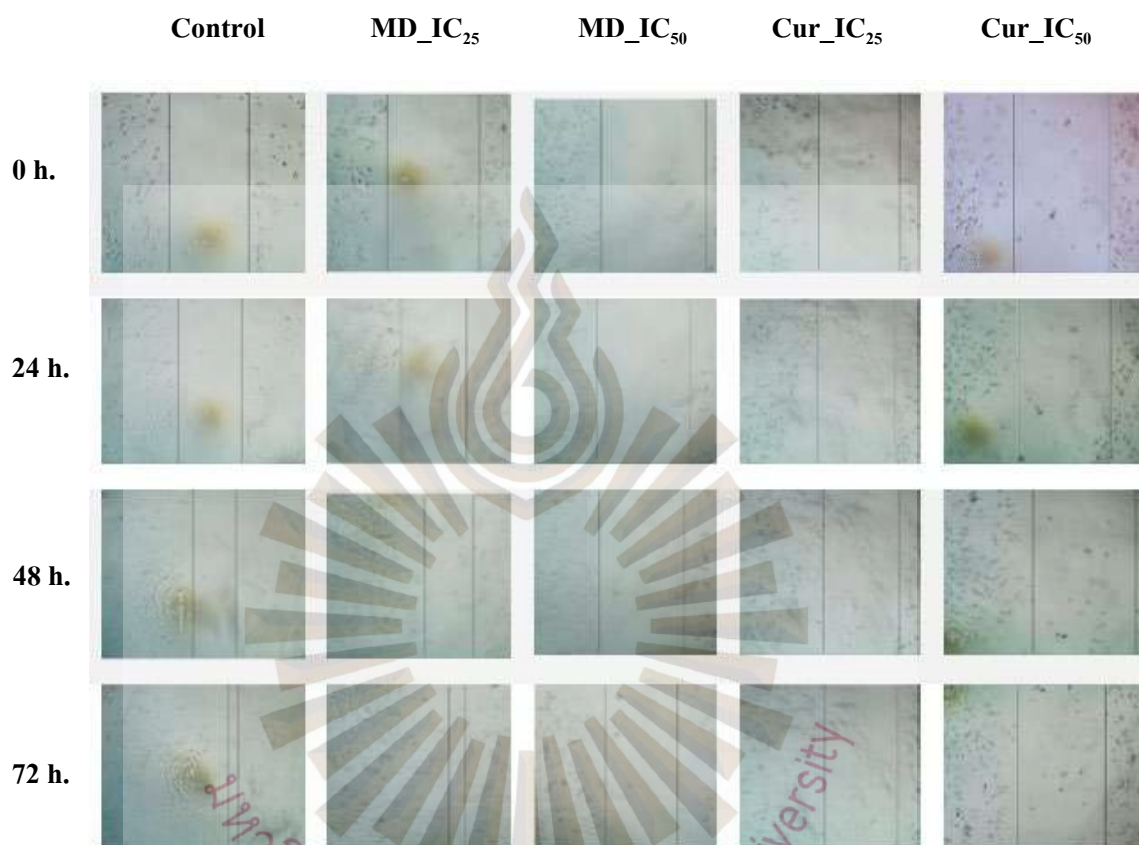


รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ MDA-MB-231 ที่ย้อมสี DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (กำลังขยาย 200X) หลังทดสอบการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยสารสกัด MD ที่ความเข้มข้น IC_{25} และ IC_{50} และ Curcumin IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หัวลูกศรสีเหลือง (Chromatin Condensation) ลูกศรสีแดง (Fragmented Apoptotic Nuclei)

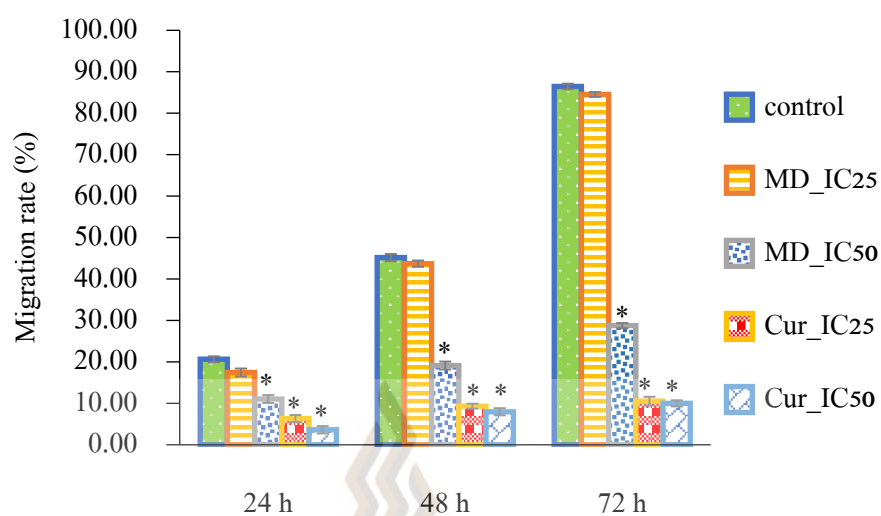
4.6ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสงต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ด้วยวิธี Wound Healing Assay

หลังจากที่ทำการสร้างบาดแผลและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในการทดลอง พบว่าเซลล์ในกลุ่ม Control ที่ไม่ได้รับสารสกัด มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 86.47 ส่วนเซลล์ที่สารสกัด MD ที่ความเข้มข้น สกัด IC_{25} สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ MDA-MB-231 ได้ (ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 84.53) ในขณะที่สารสกัด MD ที่ความเข้มข้น IC_{50} สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า โดยมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับ 28.76 และในส่วน Curcumin ที่ความเข้มข้น IC_{25} และ IC_{50} มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 9.99 และ 10.53 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งสามารถบอกได้ว่าสารสกัด MD มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MDA-MB-231 แบบ Dose-Dependent คือเมื่อความเข้มข้น

มากขึ้นจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้เพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารสกัด MD และ Curcumin กับกลุ่ม Control ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.5ฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเรืองแสง (MD) ต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ด้วยวิธี Wound Healing Assay ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กลับหัว (กำลังขยาย 4X)



รูปที่ 4.6 แสดงร้อยละการเคลื่อนที่เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ที่ได้รับสารสกัดเห็ดเรืองแสง (MD) และ Curcumin ที่ความเข้มข้น IC₂₅ และ IC₅₀, (*P<0.05)



บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดเรืองแสงพบว่า ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc มีน้ำหนักสารสกัดต่อลิตรมากที่สุด และส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วย Hexane มีร้อยละผลิตภัณฑ์มากที่สุด ทำให้ทราบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ในน้ำเลี้ยงเชื้ออยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขณะที่สารสกัดส่วนใหญ่ในเส้นใยอยู่ในตัวทำละลายมีขั้วต่ำ

5.1.2 สารสกัดหยาบที่ได้มาทำการทดสอบความเป็นพิษพบว่าสารสกัด MD มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ MDA-MB-231 ได้ดีเทียบเท่า Curcumin ที่ใช้เป็น Positive Control สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสาร Curcumin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Antoio and Giuseppina, 2019) แต่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ L-929 ต่ำ ในส่วนของยา Doxorubicin พบว่ามีความเป็นพิษสูงทั้งต่อเซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์หนูปกติ L-929 ซึ่งปกติยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษาโรคมะเร็งมักพบความเป็นพิษต่อระบบหัวใจและอาการไม่พึงประสงค์ และปัญหาการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง (Soni et al., 2011)

5.1.3 จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์จากเส้นใยของเห็ดเรืองแสงที่ชั้น CH_2Cl_2 พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกอยู่ ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเห็ดเรืองแสงทั้งส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี TLC Pattern พบว่ามี ฟลาโวนอยด์, คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ และแอนทราควิโนน (นิชากร ศรีพุ่มบาง และมาณิกา ไพนรินทร์, 2557) และยังพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในน้ำเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงที่สกัดด้วย EtOAc (สุกัลยา หลีแจ้ง และคณะ, 2559) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีข้อมูลพบว่าสารฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ชักนำให้เซลล์

ตายแบบอะพอพโทซิส รวมถึงยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากมะเร็ง การแพร่กระจายและการดื้อยาหลายขนานของเซลล์มะเร็ง (วิภพ สุทนะ, 2556)

5.1.4 จากทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ MDA-MB-231 โดยคุณลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าสัณฐานวิทยาของเซลล์ MDA-MB-231 ที่ได้รับสารสกัด MD มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ จาก Polygonal Normal Shape ไปเป็นเซลล์ที่มีการโป่งพองของผนังเซลล์ (Membrane Blebbing) นิวเคลียสของเซลล์มีการรวมตัวกันแน่นมากขึ้นและขอบของนิวเคลียสเป็นรอยหยัก (Nuclear Condensation And Lobulation) มีการหด (Cell Shrinkage) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง และเซลล์แตกเป็นชิ้นเล็กๆ (Apoptotic Bodies) สอดคล้องกับงานวิจัยการตายของเซลล์ของเจตนา เรืองประทีป, (2019) เช่นเดียวกับลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ Colo205 และ Hela ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง ที่ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปคล้ายกับการตายแบบอะพอพโทซิส (ฐานาวรรณ นาสมนต์ และคณะ, 2561)

5.1.5 จากการศึกษาการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยใช้การย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI เซลล์จะย้อมติดสีฟ้าตรงตำแหน่งนิวเคลียสทั้งหมด โดยมาตินที่อัดแน่นภายในเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะติดสีที่ค่อนข้างเข้มกว่าและมีขอบเขตที่คมชัด เนื่องจาก DAPI เป็นสารเรืองแสง สีฟ้าที่ชอบจับกับสายของดีเอ็นเอสายคู่ โดยจับในตำแหน่งเบส AT Clusters บริเวณ Minor Groove ของ ดีเอ็นเอ 1 โมเลกุลของ DAPI จะจับกับคู่เบสได้ 3 คู่ การจับกันระหว่าง DAPI และดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้เกิด การเรืองแสงเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่า การเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะดูดกลืนแสงทำให้สามารถสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงรูปร่างของ นิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Sgono & Gruber, 1998) จากการทดลองครั้งนี้พบว่า หลังจากทดสอบกับสารสกัดเห็ดเรืองแสง (MD) จะพบลักษณะโครมาตินรวมตัวกันแน่น (Chromatin Condensation) และนิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (Fragmented Apoptotic Nuclei) สามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งที่ได้รับสาร Curcumin ที่พบว่ามีการเกิด Apoptotic Bodies ตามรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (เจตนา เรืองประทีป, 2019; Sreelatha, 2011; Suchada et al., 2016) ซึ่งเป็นวิธีศึกษาเบื้องต้นและไม่ซับซ้อน โดยวิธีนี้ใช้ตรวจสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในระยะสุดท้ายได้คร่าว ๆ แต่ยังไม่สามารถจำแนกการตายของเซลล์ได้อย่างแม่นยำ และไม่เหมาะต่อการตรวจสอบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น อาจต้องอาศัยการตรวจยืนยัน ด้วยวิธีที่มีความจำเพาะมากขึ้น เช่น

ศึกษาการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนตัวอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส ตลอดจนศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีน

5.1.6 Wound Healing Assay เป็นวิธีการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านช่องว่างด้วยวิธีการขูดบริเวณตรงกลางเซลล์ ถ้ามีการเคลื่อนที่ของเซลล์เกิดขึ้นช่องว่างที่ขูดก็จะแคบลง ซึ่งเป็นวิธีเดียวกับการใช้ทดสอบและคัดกรองประสิทธิภาพของยาต้านมะเร็ง (Vitor et al., 2019) จากการทดสอบพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นของสารสกัดเห็ดเรืองแสงสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 ได้ เมื่อเทียบกับ Curcumin ความเข้มข้นเดียวกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของสุภาพร มาลา และคณะ (2559) ที่พบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดี และยังมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรอื่นที่สามารถยับยั้งการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมได้ เช่น สารสกัดชูโนโคโนนจากพริกไทยดำที่มีฤทธิ์ในการต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ศิริภา ดอกดวง และคณะ, 2561)

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดเรืองแสงมีความเป็นพิษสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA MB-231

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษายืนยันผลของสารสกัด MD ในระดับโมเลกุล

5.2.1 การศึกษาต่อถึงสารบริสุทธิ์ในสาร MD ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ตายผ่านกลไกอะพอพโทซิส หรือการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ต่อไป

5.1.3 การนำข้อมูลพื้นฐานจากงานวิจัยนี้ ศึกษาต่อขอดถึงความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) หากก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองฝ่อลง และสารสกัดไม่มีผลต่อการทำงานของอวัยวะสำคัญ อาทิ ตับ และไตเป็นไปได้ว่าสารสกัดนี้มีคุณค่ายิ่งในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งเต้านมและศึกษาทางคลินิกต่อไป

บรรณานุกรม

- เจริญญา งามขำ. (2560). การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, *วารสารพิษวิทยาไทย*, 32(2), 73-86.
- เจตนา เรื่องประทีป. (2561). แนวคิดพื้นฐานเกี่ยวกับการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ. *เวชสารแพทย์ทหารบก*, 72(2), 137-141.
- ชัยวุฒิ ศรีสุโข. (2552). *เอชเนมะเร็งร้ายในชาย-หญิง*. กรุงเทพฯ: ตาตา พับลิเคชั่น.
- นภา อาษารัฐ. (2555), *นักวิจัยพบเห็ดเรืองแสง ใช้ควบคุมโรคในพืช บำบัดมะเร็ง*. สืบค้นจาก <https://img.kapook.com>
- นุรดีนา จารง, อนันต์ อธิพรชัย, มลธิรา พรหมกันต์, กมลชนก เสี่ยงโสด, พงศ์พิสิษฐ์ พระธาตุ, สดุดรัก ช่างเรือ และอภิชาติ สุขสำราญ. (2561). ฤทธิ์ของ [6]-shogaol และ dimethyl-[6]-shogaol ในการยับยั้งการเจริญและชักนำการตายของเซลล์มะเร็งเต้านม. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, 21(3), 308-316.
- ฐาปนาวรรณ นาสมยงค์, นันทพงศ์ จำทอง, อัมพรรัตน์ ประไพรวงศ์, พจนพร ไกรดิษฐ์, จริยา หาญจนวงศ์, วีรทัศน์ สุดสาย และสมพร ผกระโทก (2561). *การคัดกรองพิษของเห็ดเรืองแสง (Neonothopanus nambi) ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Colo205) และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela)*. เอกสารนำเสนอในที่ประชุมวิชาการและการประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ. เชียงใหม่.
- ณิชกร ศรีพุ่มบาง และมาณิกา ไพนรินทร์. (2557). *การประเมินคุณภาพเห็ดเรืองแสง* (Unpublished Senior project). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.
- ผาณา เอี้ยวชิโป และทรงกลด สารภูมิต (2562). *ฤทธิ์ต้านมะเร็งของชาใบขลู่และกลไกที่เกี่ยวข้อง*. สืบค้นจาก http://digital_collect.lib.buu.ac.th/dcms/files/1559_038.pdf
- พวงทอง ไกรพิบูลย์. (2553). *การตรวจคัดกรองโรคมะเร็งเต้านมด้วยการถ่ายภาพรังสีเต้านมแมมโมแกรม*. สืบค้นจาก <https://medthai.com>
- ลือชัย บุตุกุล. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและ ฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 31, 443-455. สืบค้นจาก <https://www.thaiscience.info/journals/Article/JSMU/10888192.pdf>
- รพีพรรณ สุรศักดิ์วรกุล. (2551). *ใช้ชีวิตอย่างไรให้ปลอดภัยและหายจากการเป็นมะเร็งเต้านม* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ชีวินี อินเตอร์เนชั่นแนล.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- วิมลพรรณ วรรณพฤกษ์. (2552). *รู้จักมะเร็ง โรคภัยที่ป้องกันรักษาได้*. กรุงเทพฯ: เลิฟแอนด์ลิฟเพรส.
- วิภ สุทชนะ. (2556). ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์:กลไกการออกฤทธิ์. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 28(4), 567-582 สืบค้นจาก <https://thaiscience.info/Journals/Article/SRMJ/10899774.pdf>
- วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. (2560). *เห็ดสีรินรัมย์ (Neonothopanus nambi) และการใช้ประโยชน์*.
ขอนแก่น: หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.
- ศิริภา ดอกดวง, อามานร์ เทศอาเส็น, ศิริพร หมาดเหล้า, สมชาย ศรีวิริยะจันทร์ และ พจนพร ไกรดิษฐ์. (2561). ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากสมุนไพรไทยดำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร NMU. *การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา*, 3131-3142. สืบค้นจาก <https://rsujournals.rsu.ac.th/index.php/rgrc/article/download/828/593>
- ศิริมาศ กาญจนवास และ วิจิตรา ทศนียกุล. (2551). โมโนโครนอล แอนติบอดี: เป้าหมายของการรักษามะเร็ง. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 23(4), 440-446. สืบค้นจาก http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_preview=T&art_id=1504
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. (2562). *ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2562*. สืบค้นจาก http://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html
- สุกัลญา หลีแจ้ง, สุกัญญา ผิวคำ, ปาโอชะ เจะหลง, สุนิสา เกื้อชาติ, รุ่งฤทัย นาวิชัย, พรทิดา นิยมเจ็ด, กฤษณะพัฒน์ คล้ายมาลี, นันทพงศ์ ขำทอง และ อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ (2559). *การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อไรทะเลของสารสกัดจากเห็ดสีรินรัมย์ (Neonothopanus nambi)*. สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต. สืบค้นจาก <http://rri.rsu.ac.th/scholarresearchInternalcompletearticle.php?status=1&lang=&id=444&year=2559>
- สุภาพร มาลา, สุวรรณ ก่อสุวรรณวงศ์ ราชพร สีจันทร์ และ ภูวนัย ภูษิต. (2559). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งช่องปากชนิดสแควมัส (HSC-4). *วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์มหิดล*, 36, 393-402.
- สุรพงษ์ สุภาพรณ์, สุमित วงศ์เกียรติจร, วิชัย วาสนศิริ และจรัสพงษ์ เกษมมงคล. (2547). *มะเร็งเต้านม (พิมพ์ครั้งที่ 2)*. กรุงเทพฯ: โฉมิตการพิมพ์.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- สุริย์พร บัวอาจ. (2554). ชีวิตกับภัยพิบัติเรื่องแสงสีอินฟราเรดช่วยควบคุมโรครากปม. *น.ส.พ.กสิกรรม*, 94(6), 64-70. สืบค้นจาก <https://www.doa.go.th/ksp/attachment.php?aid=3125>
- หะสัน มุหาหมัด. (2555). *การก่อตัวของมะเร็ง แบ่งตัวผิดปกติอย่างไร (Breast Cancer Carcinogenesis)*. สืบค้นจาก <http://www.thaibreastcancer.com/ca-111/>
- อรุณ โรจนสกุล,บุรณี กาญจนถวัลย์, ชัยณู พันธุ์เจริญ,อุษา ทิสยากร และอดิสร ภัทราดุลย์. (2550). *มะเร็งร้าย พ่ายมีดหมอ*. กรุงเทพฯ: สรรพสาร.
- Ajith, T.A. & Janardhanan, K.K. (2007). Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr*, 40(3), 157-161.
- Antoio, G. & Giuseppina, T. (2019). *Curcumin and cancer*. Retrieved From <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31590362>.
- Baskar, R., Shrisakthi, S., Sathyapriya, B., Sathyapriya, R.,Nithya, R. & Poongodi, P. (2011). Antioxidants potential of peel extracts of banana varieties (*Musa sapientum*). *Food and Nutrition Sciences*, 1, 1118 -1133.
- Boyd, M.D. & Michael, R. (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In B.A. Teicher., (Eds.), *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval*. (pp.23-42). Totowa, NJ: Humana Press.
- Chang, Z.Q., Hwang, M.H. & Rhee, M.H. (2008). The in vitro anti-platelet, antioxidant and cellular immunity activity of *Phellinus gilvus* fractional extracts. *World J Microbiol Biotechnol*, 14, 181-187.
- Chavez, K.J., Garimella, S.V. & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 311(1), 35-48.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 453-458.
- Ferreira, I.C., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. A. & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agent in Medicinal Chemistry*, 10, 424-436. Retrieved From <http://dx.doi.org/10.2174/1871520611009050424>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Isakoff, S.J. (2010). Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 16(1), 53-61.
- Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B. K., Islam, R., Koyyalamudi, S.R., Pang, G. & Song, C. H. (2010). White button mushroom (*Agaricusbisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levelsin in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr Res*, 30(1), 49-56. doi: 10.1016/j.nutres.2009.12.003
- Karki, G. (2020). *Apoptosis (Programmed cell death)*. Retrieved From <https://www.onlinebiologynotes.com/apoptosis-programmed-cell-death/>
- Kanokmedhakul, S., Lekprom, R., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C., Bua-art, S., Saksirirat, W., Prabpai, S. & Kongsaree, P. (2012). Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. *Tetrahedron*, 68, 8216-8266. doi: 10.1016/j.tet.2012.07.057
- Li, J., Guo, Y., Duan, L., Hu, X., Zhang, X., Hu, J. & Luo, D.X. (2017). AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. *Oncotarget*, 8(10), 33694-33703.
- Loganathan, J., Jiang, J., Smith, A., Jedinak, A., Thyagarajan-Sahu, A., Sandusky, G.E., Nakshatri, H. & Sliva, D. (2014). The mushroom *Ganoderma lucidum* suppresses breast-to-lung cancer metastasis through the inhibition of pro-invasive genes. *Int J Oncol*, 44(6), 2009-15.
- Namanusart, W., Saksirirat, W., Hirunsalee, A. & Lekphrom, R. (2013). Efficiency of luminescent mush-room, *Neonothopanus nambi* Speg.for controlling root-knot nematodes (*Meloidogyne incog-nita* Chitwood) in tomatoes. *KKU Res J*, 18, 814-831.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G.T. (2017). Programmed cell death. In *Cell Biology*. (p. 797-815). Philadelphia: Elsevier.
- Sakai,T, & Chihara, G., 1995. Health foods and medicinal usages of mushroom. *Food Reviews International*, 11, 69-81.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Valastyan, S. & Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 142(2), 275-292. Retrieved From <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Shian, T., Abdullah, A., Musa, K. H., Maskat, M.Y. and Ghani, M.A. (2011). Antioxidant properties of three banana cultivars (*Musa acuminata* 'Berangan', 'Mas' and 'Raja') extracts. *Sains Malaysiana*, 41(3), 319 - 314. Retrieved From <https://core.ac.uk/download/pdf/11492562.pdf>
- Sgonc, R. & Gruber, J. (1998). Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology*, 33(6), 525-533.
- Soni, H., Pandya, G., Patel, P., Acharya, A., Jain, M. & Mehta, A.A. (2011). Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecule-1 (CORM-1) on acute doxorubicin cardiotoxicity in mice: Role of oxidative stress and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 153, 70-80.
- Sreelatha, S., Jeyachitra, A. & Padma, P.R. (2011), Antiproliferration and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cell. *Food Chem Toxicol*, 49, 1170-5.
- Stevens, A. & Lowe, J. (2000). *Pathology* (2nd ed.). New York: Mosby.
- Sye, W.F. (1991). Improvement Method of Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Ganoderic Acid from Ganoderma Lucidum. *J. Chin. Chem. Soc*, 38(2), 179-182. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/jccs.199100029>
- Thophon, S., Waranusantigul, P., Hanphakphoom, S. & Kangwanrangsan, N. (2016). Cytotoxicity and Apoptosis of Cancer Cells by the Crude Extract from Chromolaena odorata (L.) King & Robinson, *SDU Research Journal Science and Technology*, 9(1), 1-29.
- Tsenga, Y.H., Yangb, J.H. & Mau, J.L. (2008), Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 107(1), 731-738.
- Vitor, M., Almeida, Maximino, Alencar, B., Jéssica, C., Nascimento, Lidia, M.F. & Amorim. (2019). Anticancer drug screening: standardization of *in vitro* wound healing assay. *J Bras Patol Med Lab*, 55(6), 606-619.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Sangsopha, W., Lekphrom, R., Florian, T.S., Saksirirat, W., Bua-Art, S., Kanokmedhakul, K. & Kanokmedhakul, S. (2019). New p-terphenyl and benzoquinone metabolites from the bioluminescent mushroom *Neonothopanus nambi*, *Natural Product Research*. Retrieved From <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1578763>.
- Wisetsai, A., Lekphrom, R., Bua-art, S., Suebrasri, T., Boonlue, S., Tontapha, S., Amornkitbamrung, V., Senawong, T. & Florian, T.S. (2021). Scalarane Sesterterpenoids with Antibacterial and Anti-Proliferative Activities from the Mushroom *Neonothopanus nambi*. *Molecules*, 26(24),7667. Retrieved From <https://doi.org/10.3390/molecules26247667>.
- Word Health Organization. (2020). *International Agency for Research on Cancer*. Retrieved from www.who.int/health-topics/cancer
- Yang, M., Wang, X., Guan, S. & Xia, J. (2007). Analysis of Triiterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am Soc. Mass Spectrom*, 18, 927-939.
- Young, B., O'Dowd, G. & Woodford, P. (2014). Programmed cell death. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas* (6th ed.). Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone.
- Zhao, L., Zhao, G., Du, M., Zhao, Z., Xiao, L. & Hu, X. (2008). Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *Eur Food Res Technol*, 116, 499-505.



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและเทคนิคในการทดลอง

การเตรียมสารเคมี

1. 0.25% Trypsin-EDTA

2.5% Trypsin Solution 2 มิลลิลิตร

EDTA 50 มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. EDTA

EDTA 0.1 กรัม

PBS 500 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4

NaCl 8 กรัม

KCl 0.2 กรัม

KH₂PO₄ 0.2 กรัม

Na₂HPO₄ 1.15 กรัม

ปรับค่า pH เป็น 7.4 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่ห้องอุณหภูมิห้อง

4. Complete growth medium; DMEM (stock) 1 ลิตร

DMEM 13.4 กรัม

NaHCO₃ 3.7 กรัม

1 M HCL 2,000 ไมโครลิตร

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ด้วย HCl จากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน แล้วเก็บด้วย Syringe Filter ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. DMEM + ร้อยละ 10 fetal bovine serum

DMEM (stock) 100 มิลลิลิตร

Fetal Bovine Serum 10 มิลลิลิตร

ผสม DMEM กับ Fetal Bovine Serum เข้าด้วยกันนำมาแบ่งใส่ภาชนะปราศจากเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในสภาพปลอดเชื้อ

6. DAPI stock solution (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

DAPI 1 มิลลิกรัม

Distilled Water 1 มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. DAPI working solution (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

DAPI Stock Solution (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร

Methanol 999 ไมโครลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. 10% Glycerol in PBS

Glycerin 99% 100 ไมโครลิตร

PBS 890 ไมโครลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin

เตรียม Quercetin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง Quercetin 10 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute CH_2Cl_2 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็น 100, 80, 40, 20, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic Acid

เตรียม Stock Solution ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐาน Gallic Acid 10 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute CH_2Cl_2 10 ml. จากนั้นเจือจางเป็น 100, 80, 40, 20, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

เทคนิคในการทดลองและการคำนวณ

1. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ดูดอาหารเลี้ยงใน Flask เดิมออกให้หมดแล้วทิ้งไป
2. เติมน้ำที่ เป็น Complete Medium เลี้ยงใหม่ลงไป ในขวดเดิม
3. นำ Flask เซลล์ไปไว้ในตู้ในตู้บ่มเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด
2. ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 รอบ
3. เติมทริปซิน EDTA ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงใน Flask เพาะเลี้ยงเซลล์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วเติมน้ำที่ เป็น Complete Medium ลงไปเพื่อให้ FBS ในอาหารยับยั้งการทำงานของ Trypsin
4. ดูดเป่าเซลล์ที่ถูก Trypsinize เบาๆ ด้วย Seropipette หรือ trip ที่ปลอดเชื้อ แล้วนำเซลล์ที่แขวนลอย (Suspension cell) ย้ายไปใน 15 ml Centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนเป็น Pellet Cell อยู่ก้นหลอด
5. เติมน้ำ Complete Medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Flask แล้ว Resuspend เซลล์ที่ตกตะกอนด้วย Complete Medium ใหม่ 10 มิลลิลิตร

6. ดูด Cell Suspension จากข้อ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Flask ใหม่ที่มี Complete Medium แล้วทำให้เซลล์กระจายทั่ว Flask จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (co₂ Incubator)

3. การนับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer

1. นำเซลล์มา 20 ไมโครลิตร ผสมกับร้อยละ 0.2 ของ trypan blue ใน PBS 20 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอด Microtube จากนั้นใช้ Micropipette ดูดเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Trypan blue ปริมาตร 11 ไมโครลิตร

2. เติมนลงในช่องว่างระหว่าง Cover Slip ของ Hemocytometer

3. นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ นับเซลล์ภายในช่อง A (ภาพ A) ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ นับได้จะเป็นจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาตร 0.1 ตารางเซนติเมตร (แต่ละช่องมีพื้นที่ 1 ตาราง มิลลิเมตร และมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร) นับทั้ง 4 ช่องนำจำนวนที่นับได้ไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Total Cell Count) ในปริมาตร 1 ตารางเซนติเมตร และหาค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยใช้สูตร

สูตรการหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Total Cell Count)

$$t = \frac{(X \times d)}{n} \times 10^4$$

t = total cell count (เซลล์/มิลลิเมตร)

X = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ใน 4 ช่อง A (ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต) (เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ Trypan Blue)

d = อัตราส่วนระหว่าง Trypan blue กับ เซลล์ (Dilution Factor)

n = จำนวนช่องที่นับ (เช่น นับ 4 ช่อง ก็หารด้วย 4)

4. การคำนวณความเข้มข้นสารและการ Seed เซลล์

1. ภายหลังจากการทำ Trypsinization เพื่อแยกเซลล์ออกมาจากการยึดเกาะ

2. นับจำนวนเซลล์ตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 3.

3. ทำให้เซลล์มีความเข้มข้นต่างๆตามที่ต้องการด้วยสูตร

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

โดยที่

C_1 = ความเข้มข้นที่ได้จากการนับโดยใช้ Hemocytometer

V_1 = ปริมาตรของสารละลายเซลล์ที่ได้จากการ Trypsinization

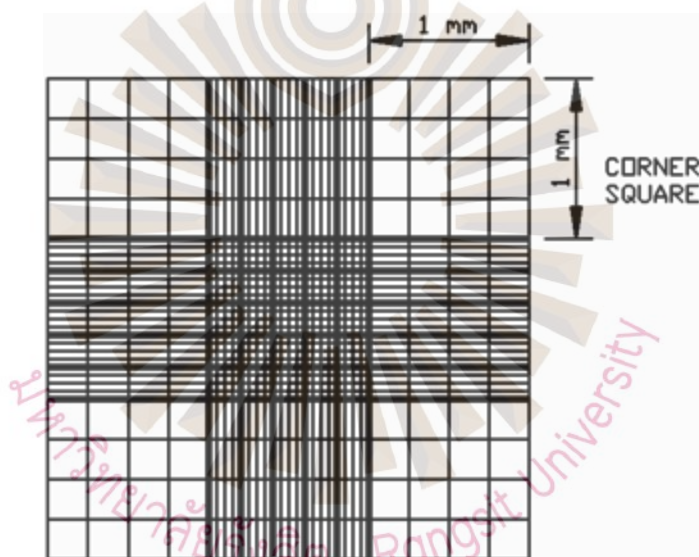
C_2 = ความเข้มข้นของเซลล์ที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเซลล์ที่ต้องการ

ซึ่งจะใส่เซลล์ที่ทำการเจือจาง แล้วไว้ใน Eppendorf หรือ Centrifuge Tube แล้วจึงนำไปใช้ในเวลาอันรวดเร็ว

สูตรการหาค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (%viability)

$$\text{Viability (\%)} = 100 \times \text{OD}_{570} \text{ Sample} / \text{OD}_{570} \text{ Blank (control)}$$



ภาพ A ตารางนับเซลล์ใน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	เสาวนีย์ แสงทอง
วัน เดือน ปีเกิด	12 ตุลาคม 2534
สถานที่เกิด	จังหวัดสงขลา ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก, 2557
ที่อยู่ปัจจุบัน	100/1073 หมู่บ้านลานทอง ซอย 29/3 ตำบลบางพูด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี
สถานที่ทำงาน	หมอไทยอินดี้ คลินิกการแพทย์แผนไทย
ตำแหน่งปัจจุบัน	แพทย์แผนไทย (พท.ว, พท.ภ, พท.น, พท.ผ)

