

อภิธานนาการ



สำนักหอสมุด

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยสารสกัดจากเห็ดลม  
Study of anti-cancer mechanism of *Lentinus polychrous* extract on  
cholangiocarcinoma

รหัสโครงการวิจัย

R2557C102

โดย

ดร.สุชาดา พิมเสน

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน 22 ก.พ. 2565

เลขทะเบียน 1048991

เลขเรียกหนังสือ 2: R0

200

.042

สนับสนุนโดยทุนวิจัยงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ๙๔๕๙๘

๒๕๕๗

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวร เป็นอย่างสูง สำหรับทุนงบประมาณรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 เพื่อการทำวิจัย เรื่อง “การศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยสารสกัดจากเห็ดหลิน” เป็นการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดหลิน รวมทั้งศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในระดับ *in vitro* โดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านที่เกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัย

สุชาดา พิมเสน

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



## บทคัดย่อภาษาไทย

มะเร็งท่อน้ำดี (CCA) เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยซึ่งเกิดจากการเจริญที่ผิดปกติบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี มีการศึกษาหลายงานวิจัยที่มุ่งเน้นในการระบุและพัฒนาสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาใน CCA เห็ดลม (*Lentinus polychrous*) ถูกใช้เป็นอาหารซึ่งพบว่ามีสาร proteoglycan/PSK สูงมาก เมื่อเทียบกับเห็ดสายพันธุ์อื่นๆ ในประเทศไทย ดังนั้นจุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดน้ำร้อนของเห็ดลมในมะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งกลไกของการยับยั้งมะเร็ง ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด KKU-213A ถูกประเมินโดยการสอบวิเคราะห์ MTT การตรวจสอบเซลล์อะพอพโตซิสถูกดำเนินการโดยการย้อมสี AnnexinV/7-AAD และการสอบวิเคราะห์ศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย วิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์โดยใช้การย้อมสีและตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากน้ำร้อนของเห็ดลม สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ของ KKU-213 อย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำมาศึกษาการตายของเซลล์พบว่าสารสกัดจากน้ำร้อนของเห็ดลมกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสในระยะเริ่มต้นและระยะท้าย โดยพบว่าสารสกัดส่งผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียให้น้อยลง นอกจากนี้สารสกัดจากน้ำร้อนของเห็ดลมยังช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะ S และ G2/M ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดลมส่งเสริมการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสและชะลอวัฏจักรของเซลล์ ดังนั้น สารสกัดจากเห็ดลมอาจมีศักยภาพในการป้องกันและรักษา CCA

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดี, เห็ด, เห็ดลม, อะพอพโตซิส, วัฏจักรของเซลล์

## Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is an uncommon adenocarcinoma which arises from the epithelial cells of the bile ducts. Several studies have been focused to identify and develop the effective agents for prevention and treatment in CCA. *Lentinus polychrous* has been used for food and previously showed a very high proteoglycan/PSK compared to the other mushroom species in Thailand. Thus, the aim of the study was to investigate the anticancer effect of a hot water extract of *Lentinus polychrous* against CCA and their mechanism induced cell death. Cytotoxic effect against a CCA cell line (KKU-213A) was assessed by MTT assay. Investigation of apoptotic cell was performed by AnnexinV/7-AAD staining and mitochondrial membrane potential assay. The cell cycle was analyzed using PI staining. The hot water extract of *Lentinus polychrous* significantly inhibited the cell viability of KKU-213A. Our data further demonstrated that the hot water extract of *Lentinus polychrous* induced the number of the early and late apoptotic cells via mitochondrial membrane dysfunction. Moreover, the hot water extract of *Lentinus polychrous* increased the number of cell in S and G2/M phase. These data suggested *Lentinus polychrous* extract promoted cell death in CCA cell line by inducing apoptosis and cell cycle arrest. Therefore, the *Lentinus polychrous* extract might have potential for CCA prevention and therapy.

**Keywords:** Cholangiocarcinoma, mushroom, *Lentinus polychrous*, Apoptosis, Cell cycle

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. กิตติกรรมประกาศ	2
2. บทคัดย่อ	3
3. Abstract	4
4. สารบัญเรื่อง	5
5. สารบัญรูปภาพ	6
6. สัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	7
7. ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	8
8. วัตถุประสงค์ หลักการและเหตุผลของการวิจัย	9
9. ขอบเขตของงานวิจัย	10
10. ทฤษฎีและแนวคิดนำมาใช้ในงานวิจัย	10
11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	14
12. วิธีการดำเนินการวิจัย	15
13. ผลการวิจัย	20
14. ข้อวิจารณ์ของโครงการวิจัย	26
15. สรุปผลการวิจัย	28
16. เอกสารอ้างอิง	29
17. ภาคผนวก	32

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนของการดำเนินการทดลอง	15
รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213	17
รูปที่ 3 ตัวอย่างผลที่ได้จากการทดสอบ Muse MitoPotential Assay	19
รูปที่ 4 อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	20
รูปที่ 5 ผลของรูปแบบวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	21
รูปที่ 6 กราฟแสดงค่าการกระจายตัวของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	22
รูปที่ 7 ผลแสดงการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	23
รูปที่ 8 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	23
รูปที่ 9 ผลแสดงการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	24
รูปที่ 10 กราฟแสดงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน	25

## สัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CCA	Cholangiocarcinoma
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal bovine serum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PI	Propidium iodide
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
IC50	50% Inhibitory Concentration
µg	microgram
mg	milligram
ml	milliliter



## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันสารสกัดธรรมชาติที่ได้จากพืชผักต่างๆที่เรารับประทานกันอยู่นั้น เริ่มเข้ามามีบทบาทในการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีส่วนประกอบของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคได้ และยังมีผลข้างเคียงต่ำ จึงถูกนำมาใช้เป็นยาหรือใช้ร่วมกับการรักษาเดิมที่มีอยู่แล้วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาที่ได้ผลมากขึ้น เห็นเป็นเชื้อราชั้นสูงว่ากันว่าบนโลกนี้มีเห็ดมากกว่าหนึ่งแสนชนิด แต่ที่มนุษย์รู้จักมีเพียงร้อยละสิบเท่านั้น จัดเป็นพืชที่หาได้ง่าย ประกอบไปด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ไขมัน ไกลโคไซด์ หลายชนิด ซึ่งพบว่ามีสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน หลอดเลือดหัวใจ และสามารถยับยั้งโรคเบาหวานได้อีกด้วย ฉะนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาคุณสมบัติของเห็ดเพื่อพัฒนามาใช้เป็นยาอย่างกว้างขวางขึ้น การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ (active components) ในการต้านมะเร็งที่พบในเห็ดมีหลายชนิด ได้แก่ lentinan, krestin, hispolon, lectin, calcaelin, illudin S และ psilocybin เป็นต้น โดยพบว่าสารที่สามารถออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์นั้น มักจะมีโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ ประกอบ เช่น  $\beta$ -glucan ที่สามารถไปจับกับโปรตีนอื่นๆเกิดเป็นโปรตีนโกลแคนได้หลากหลายชนิด โดยอาศัยคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต่อต้านมะเร็งได้

ในแต่ละภูมิภาคของโลกเนื่องด้วยสภาพแวดล้อมและสภาวะภูมิอากาศที่ต่างกัน ทำให้มีการเจริญของเห็ดต่างชนิดกัน โดยเห็ดแต่ละชนิดนั้นก็จะมีองค์ประกอบของสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ ที่แตกต่างกันไปด้วย ในประเทศไทยพบว่าเห็ดท้องถิ่นหลายชนิดเช่น เห็ดลม เห็ดขอนขาว เห็ดหอมและเห็ดฟาง เมื่อทำการสกัดด้วยวิธี phenol extraction และ ammonium sulfate จะพบว่าในเห็ดลม มีส่วนประกอบของสารโปรตีนโกลแคนในกลุ่ม PSK (Polysaccharide-K) และ PSP (Polysaccharide-Peptide) ที่มี

$\beta$ -glucan เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า PSK และ PSP มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มการทำงานของ natural killer (NK) cells, T-cells, B-cells, neutrophils และ macrophage นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้เป็นอย่างดีเมื่อใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งตัวอื่นๆ เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด ดังนั้นสารสกัดจากเห็ดลมจึงมีความสำคัญทางการแพทย์ น่าจะพัฒนามาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เกิดกับท่อน้ำดีซึ่งเป็นอวัยวะที่นำน้ำดีจากตับมายังลำไส้เล็ก เป็นโรคมะเร็งที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบมีการระบาดของ



โรคมะเร็งท่อน้ำดีมากที่สุดในโลก โดยสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับที่ชื่อ *Opisthorchis viverrini* จากการรับประทานปลาดิบที่มีพยาธินี้แฝงอยู่ โดยเชื้อจะเข้าไปอาศัยอยู่ในตับและมีการทำลายทางเดินท่อน้ำดี เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังและเหนียวทำให้มีสารอนุมูลอิสระออกมามาก และพัฒนาไปจนถึงขั้นเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในท้ายที่สุด โรคมะเร็งท่อน้ำดีมักปรากฏอาการในระยะท้ายๆ ได้แก่ ปวดท้อง ดีซ่าน น้ำหนักลด มีไข้ การทำงานของตับผิดปกติไป ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์เมื่อระยะของโรคดำเนินไปมากแล้ว ทำให้การรักษาไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะ การผ่าตัด เป็นวิธีที่ได้ผลที่สุด แต่ก็มีข้อจำกัดเนื่องด้วยผู้ป่วยเป็นมะเร็งในระยะลุกลาม ดังนั้นยาเคมีบำบัดที่มี ประสิทธิภาพ มีความจำเพาะกับมะเร็งท่อน้ำดี และมีผลข้างเคียงต่ำจึงมีความสำคัญในแง่ของการรักษา ให้ผู้ป่วยมีชีวิตรที่ยืนยาวขึ้น การเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติสามารถลดข้อจำกัดในเรื่องของผลข้างเคียงลงได้

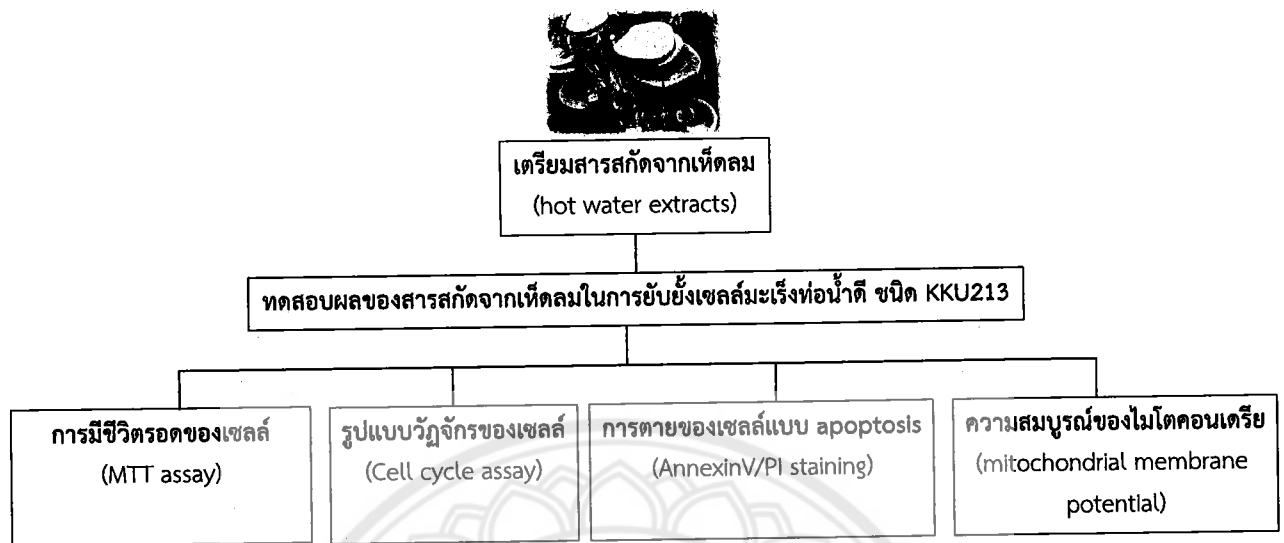
ดังนั้นการนำสารสกัดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งจึงนับว่าเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยโรคมะเร็งเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำสารสกัดจากเห็ดหลินที่หาได้ง่ายในประเทศไทยและใช้รับประทานกันอยู่มาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พร้อมทั้งกลไกที่ใช้ยับยั้งในแง่ของการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์ ลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่บ่งบอกวิถีการตายของเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ข้อมูลที่ได้จะทำให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัดจากเห็ดหลินในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาที่จำเพาะหรือนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยารักษามะเร็งชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งให้มากขึ้น

### วัตถุประสงค์ หลักการและเหตุผลของการวิจัย

ยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันนั้น มักจะไม่ได้ผลเนื่องมาจากข้อจำกัดในเรื่องของผลข้างเคียง ที่เกิดขึ้น การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งจะสามารถลดข้อจำกัดตรงนี้ได้ การศึกษา ครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยใช้สารสกัดจากเห็ดหลิน ซึ่งพบว่ามีสารสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ การศึกษากลไกในการยับยั้งจะช่วยให้เข้าใจและทราบถึงความจำเพาะในการออกฤทธิ์ของสารในระดับโมเลกุล เพื่อพัฒนามาใช้เป็นยาด้านมะเร็งให้ได้ประสิทธิภาพมากขึ้น โดย คุณสมบัติในการต้านมะเร็งในการยับยั้งเซลล์มะเร็งนั้น จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการหยุดการเจริญเติบโต โดยจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ในรูปแบบต่างๆ และมีการกระตุ้นการตาย ซึ่งโดยมากจะพบการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ ไมโทคอนเดรีย ที่จะส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหรือ เอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้อง โดยในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
2. ศึกษากลไกที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

## ขอบเขตของงานวิจัย



## ทฤษฎีและแนวคิดนำมาใช้ในงานวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เกิดกับท่อน้ำดีซึ่งเป็นอวัยวะที่นำน้ำดีจากตับมายังลำไส้เล็ก มะเร็งอื่นๆ ในทางเดินน้ำดีมีเช่นมะเร็งตับอ่อน มะเร็งถุงน้ำดี มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะเป็นต้น มะเร็งท่อน้ำดีถือเป็นมะเร็งชนิดต่อมอย่างหนึ่งที่ค่อนข้างพบน้อยโดยมีอุบัติการณ์ต่อปีประมาณ 1-2 รายต่อ 100,000 คนในโลกตะวันตก (1) ส่วนในเอเชียมีความชุกของมะเร็งท่อน้ำดีมากกว่าซึ่งน่าจะเป็นผลจากการมีการระบาดของโรคติดเชื้อพยาธิเรื้อรังมากกว่า ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในโลก คืออยู่ที่ 84.6 ต่อ 100000 ประชากรชาย และ 36.8 ต่อ 100000 ประชากรหญิง (2) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ข้อมูล ร.พ. ศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่นรายงานว่าพบมะเร็งท่อน้ำดีในตับเป็นอันดับ 1 ของมะเร็งที่กำเนิดขึ้นในตับ มีอุบัติการณ์ 300 รายต่อปี (3) และในช่วงหลายสิบปีมานี้ อัตราอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีทั่วโลกกำลังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (4) ลักษณะอาการเด่นของมะเร็งท่อน้ำดีคือการมีผลการตรวจการทำงานของตับผิดปกติ ปวดท้อง ดีซ่าน น้ำหนักลด และอาจมีอาการคันทั่วไป มีไข้ สีของอุจจาระและปัสสาวะเปลี่ยนไป โรคนี้วินิจฉัยโดยอาศัยผลตรวจเลือด ผลตรวจภาพรังสี ผลการส่องกล้อง และบางครั้งอาจต้องอาศัยการผ่าตัดเปิดสำรวจ มะเร็งท่อน้ำดีมักปรากฏอาการในระยะท้ายๆ ของโรคซึ่งทำให้เป็นการจำกัดทางเลือกในการรักษา ปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งท่อน้ำดี เช่น โรคท่อน้ำดีอักเสบแข็งปฐมภูมิ (primary sclerosing cholangitis - PSC) ความผิดปกติแต่กำเนิดของตับ การติดเชื้อพยาธิในตับอย่างเช่น พยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่พบในประเทศไทยแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มักจะได้รับประทานปลาดิบที่มีพยาธินี้แฝงอยู่หรือ *Clonorchis sinensis* การสัมผัสสารทึบรังสีบางชนิดเช่น Thorotrast เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่ปรากฏปัจจัยเสี่ยงชัดเจน มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่สามารถมีอันตรายถึงตายได้อย่าง

รวดเร็วและไม่มีทางรักษาหากไม่สามารถตัดเนื้องอกออกให้หมดได้ ยังไม่มีการรักษาใดๆที่มีโอกาสรักษาโรคให้หายได้นอกจากการผ่าตัด เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่กว่าจะได้รับ การวินิจฉัยก็เป็นระยะที่โรคลุกลามไปมากและไม่สามารถผ่าตัดได้แล้ว (5) ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมักได้รับการดูแลรักษาด้วยการให้เคมีบำบัดหรือรังสีรักษาซึ่งเป็นการรักษาแบบประคับประคอง ในรายที่สามารถทำการผ่าตัดเอาเนื้องอกออกได้ ผู้ป่วยก็ยังจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดร่วม (adjuvant chemotherapy) หรือรังสีรักษาร่วม (adjuvant radiation therapy) หลังการผ่าตัดเพื่อเพิ่มโอกาสการรักษาหายขาด มีการวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมที่รับรองการรักษาด้วยเคมีบำบัดแล้วว่าสามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตและยืดอายุขัยของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีระยะที่ไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดได้ (6) แต่ยังไม่มีการรักษาใดๆ ที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐานสากล จึงทำให้ปัจจุบันยังจึงยังมีการทดลองหาวิธีใหม่ๆ ในการรักษาต่อไปอีก ยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษามะเร็งท่อน้ำดีให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาวขึ้นเช่น 5-fluorouracil ร่วมกับ leucovorin (7) gemcitabine เดี่ยวๆ (8) หรือ gemcitabine ร่วมกับ cisplatin (9) irinotecan (10) หรือ capecitabine (11) แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของผลข้างเคียงอื่นๆที่ตามมา และยาที่ใช้ได้ผลเฉพาะกับผู้ป่วยบางรายเท่านั้น การใช้พืชสมุนไพรหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการพัฒนามาใช้รักษาโรคมะเร็งและลดข้อจำกัดตรงนี้ลงไปได้

เห็ดเป็นเชื้อราชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่หน้าที่หลักคือช่วยย่อยสลายซากพืชและสัตว์ให้ผุพัง ดอกเห็ดส่วนใหญ่มีรูปร่างคล้ายร่ม มีหลายขนาดตั้งแต่เท่าเข็มหมุดถึงเท่ากำชาน โดยมีทั้งเห็ดที่รับประทานได้และเห็ดพิษ ว่ากันว่าบนโลกนี้มีเห็ดมากกว่าหนึ่งแสนชนิด แต่ที่มนุษย์รู้จักมีเพียงร้อยละสิบเท่านั้น ประโยชน์ของเห็ดนอกจากจะเป็นแหล่งคุณค่าทางโภชนาการ ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามินและแร่ธาตุ แต่เห็ดยังมีความสำคัญในทางการแพทย์ในการใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคอีกด้วย การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเห็ดมีสารที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้านการอักเสบ ด้านจุลินทรีย์ และป้องกันโรคเบาหวาน เนื่องจากเห็ดมีส่วนประกอบที่มีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายอย่าง ได้แก่ polysaccharides, proteins, fats, ash, glycosides, alkaloids, volatile oils, tocopherols, phenolics, flavonoids, carotenoids, folates, ascorbic acid enzymes และ organic acids การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ (active components) ในการต้านมะเร็งที่พบในเห็ดมีหลายชนิด ได้แก่ lentinan, krestin, hispolon, lectin, calcaelin, illudin S, psilocybin, Hericium polysaccharide A และ B (HPA และ HPB), ganoderic acid, schizophyllan และ laccase เป็นต้น (12) การออกฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารที่มีองค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์อยู่จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งมะเร็งและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี เช่น เบต้ากลูแคน ( $\beta$ -glucan) จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง โครงสร้างประกอบด้วยสายหลักของหน่วยย่อยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) และแตกแขนงด้วยการเชื่อมต่อของหน่วยย่อยกลูโคสด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (13) เนื่องจากโครงสร้างของสารนี้เป็นโพลีแซคคาไรด์ กลไกที่ใช้ในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้จะเกิดจากการที่ร่างกายบ่งบอกว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม จึงมีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเห็ดชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญทางการ

แพทย์ โดยอาจจะนำไปพัฒนาใช้เป็นยาต้านมะเร็งหรือการใช้ร่วมกับยาที่ขายตามท้องตลาดซึ่งพบว่าผู้ป่วยจำนวนมากมีการดื้อต่อยา การศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดต่างๆ ได้แก่ เห็ดสกุล Phellinus, Pleurotus, Agaricus, Ganoderma, Clitocybe, Antrodia, Trametes, Cordyceps, Xerocomus, Inonotus, Inocybe, Funlia, Lactarius, Albatrellus, Russula และ Fores

เห็ดลมหรือเห็ดกระด้างดำ (*Lentinus polychrous* Lev.) อยู่ในสกุล *Lentinus* เป็นเห็ดขอนชนิดหนึ่งที่รับประทานได้ เห็ดลมมีพบมากในปลายฤดูฝน และต้นฤดูหนาวทางภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผู้ชายเก็บมาจากขอนไม้ในป่า เห็ดลมจัดว่าเป็นเห็ดมีเนื้อแข็งและเหนียวคล้ายหนัง ชาวบ้านจะเก็บเห็ดชนิดนี้ร้อยเป็นพวงมาลัย หรือขายปนกับผักที่ใช้ประกอบแกงแคที่มีชื่อเสียงของภาคเหนือ ดอกเห็ดลมมีลักษณะดอกเห็ดเป็นดอกเดี่ยว มีโคนก้านดอกเล็ก ปลายดอกบานออกเป็นปากแตร หรือรูปรวย ตรงกลางดอกเห็ดปุ่มลึกลงไปเป็นรูปรวย มีสีเทาหรือสีน้ำตาล มีขนละเอียดคล้ายกำมะหยี่ที่บริเวณด้านบนของดอกเห็ด ด้านล่างมีครีบหมวกเรียงเป็นรัศมีรอบก้าน และยาวขนานกับก้านดอกลงไปเกือบถึงโคนก้านดอก ดอกเห็ดด้านล่างมีซี่หมวกสีน้ำตาลเข้มกว่าด้านบน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มปนแดง เมื่อดอกเห็ดแก่ขอบของหมวกเห็ดบางกว่าส่วนกลางเพราะครีบหมวกค่อยๆ เรียวเล็กเชื่อมติดกับขอบหมวก ครีบหมวกแคบบางและไม่ลึกลงเหมือนเห็ดอื่นๆ ทั่วไป ขอบหมวกจะโค้งงอเล็กน้อย หมวกเห็ดมีความกว้างประมาณ 5-10 ซม. ก้านดอกเห็ดสั้นแข็งแรงและเหนียว มีความกว้างประมาณ 0.5-1 ซม. ยาวประมาณ 1-2 ซม. ผิวเรียบและมีสีน้ำตาลอ่อน ก้านดอกมักจะอยู่ค่อนข้างด้านใดด้านหนึ่งของกรวย ไม่อยู่ตรงกลางเลยทีเดียว เนื้อเห็ดค่อนข้างเหนียว เมื่อแก่เนื้อจะเหนียวมากขึ้นทำให้เก็บรักษาได้ง่าย เห็ดลมจัดเป็นเห็ดที่ใช้เป็นทั้งอาหารและยาสำหรับตำราพื้นบ้านอีสาน การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับเห็ดชนิดนี้ยังมีไม่มาก งานวิจัยของ Arora ในปี 1986 (14) และ Ying ในปี 1987 (15) พบว่าเห็ดลมสามารถใช้แก้โรคลมวิงเวียนได้ ส่วนงานวิจัยของ Charida ในปี 2004 (16) รายงานว่าเห็ดลมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ laccase, xylanase และ cellulose เป็นต้น และการศึกษาในปี 2006 ของ Klinhom และ Klinhom พบว่าเห็ดลมสามารถใช้ลดอาการไข้และการอักเสบจากพิษงูและแมลงป่องได้ (17) การวิจัยต่อมาพบว่าสารสกัดเห็ดลมด้วยวิธี methanol ในส่วน crude polysaccharides จากทั้งส่วนรากและลำต้นของเห็ดลมมีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (18) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 อีกด้วย (19-20) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดของเห็ดลมยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย

จะเห็นได้ว่า เห็ดพื้นบ้านของไทยที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในตลอดทั้งปีและใช้บริโภคกันอยู่มี มีสรรพคุณที่หลากหลาย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่น เช่นเห็ดหลินจือแล้ว เห็ดลมยังมีการศึกษาวิจัยที่น้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดของเห็ดลมในแง่ของสรรพคุณการต้านมะเร็ง งานวิจัยเบื้องต้นของ ดร.จงรักษ์ อรรถรัฐ อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่เมื่อทำการสกัดพื้นบ้านหลายๆ ชนิดของประเทศไทย ได้แก่ เห็ดลม เห็ดขอนขาว เห็ดฟางและเห็ดหอม และทำการสกัดด้วยวิธี Phenol extraction หรือ ammonium sulfate พบว่าสารสกัดจากเห็ดชนิดต่างๆมีส่วนของโพลีแซคคาไรด์ โกลโคโพรตีนหลายชนิด

ประกอบอยู่ และเมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA และ western blotting พบว่าสารสกัดจากเห็ดลม มีปริมาณของ PSK (Polysaccharide-K, krestin) และ PSP (Polysaccharide-Peptide) ที่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่น เช่น เห็ดฟาง และเห็ดหอม ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานไว้ว่าทั้งสาร PSK และ PSP มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้เป็นอย่างดี และถูกนำมาใช้เป็นยาเคมีบำบัดในประเทศแถบทวีปเอเชียมากกว่า 40 ปีแล้ว (21)

ในการพัฒนาสารต่างๆมาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง

ซึ่งก็คือการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งลดการเจริญเติบโต เกิดการตายขึ้นตามมานั้นเป็นเป้าหมายของการกำจัดเซลล์มะเร็ง ออกจากร่างกาย แต่ในบางครั้งการที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้นให้เข้าสู่กระบวนการตายหรือเกิดความล้มเหลวของกระบวนการตายภายในเซลล์นั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์มะเร็งต้องการรักษา ดังนั้นยาที่ใช้ในการรักษาที่น่าจะได้ผลกับการรักษามะเร็งควรมีคุณสมบัติกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นโปรแกรมการตายทางกายภาพของร่างกายที่ไม่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นแทรกซ้อน โดยจะมีกระบวนการกำจัดเซลล์ที่ตายอย่างมีระบบที่ควบคุมเป็นขั้นตอนอย่างดี การตายแบบ apoptosis นี้สามารถบ่งชี้ได้จากการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเซลล์ ตัวอย่างเช่น เซลล์มีการหดตัวเล็กลง โครโมโซมเกิดการอัดตัวแน่น (chromosome condensation) เกิดการพุดพมของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane blebbing) สารฟอสโฟลิพิดชนิด phosphatidyl serine ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนทิศทางด้านในเซลล์ออกสู่ด้านนอกเซลล์ ความสามารถในการแพร่ผ่านของสารที่ไม่โตรคอนเดรียที่เพิ่มขึ้น และมีการกระตุ้นเอนไซม์ caspases ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (22) การกระตุ้น apoptosis จะกระตุ้นผ่าน 2 วิธีหลัก ได้แก่ extrinsic death receptor และ intrinsic mitochondrial pathway โดยสุดท้ายจะมีการกระตุ้นเอนไซม์ caspases ต่างๆเพื่อกระตุ้นย่อยสลาย DNA 1) extrinsic pathway เกิดจากการกระตุ้น death receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นตัวดักจับในกลุ่ม tumor necrotic factor ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (activated death receptor) ซึ่งจะสามารถไปกระตุ้นการสร้าง death-inducing signaling complex (DISC) ที่มีผลกระตุ้นเอนไซม์ caspase-8 2) intrinsic pathway จะถูกกระตุ้นจากสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ เช่น เมื่อมีการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการต้องสนองที่ไมโตรคอนเดรีย โดยการกระตุ้นโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family เยื่อหุ้มไมโตรคอนเดรียจะมีการสูญเสียความสามารถในการคัดเลือกสารที่เคลื่อนผ่าน มีผลให้มีการหลั่งของ cytochrome c และ apoptosis-inducing factor ที่อยู่ภายในไมโตรคอนเดรีย ออกสู่ไซโตพลาสซึมแล้วไป หลังจากนั้น cytochrome c ที่หลั่งออกมาจะไปรวมกับ apoptosis protease-activating factor 1 (apaf-1) เกิดเป็น apoptosome แล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase-9 ทั้งวิธี extrinsic และ intrinsic pathways ที่กล่าวมาข้างต้นจะสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3, 6 และ 7 ได้ ซึ่งจะไปทำหน้าที่ย่อยสาร poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) และทำให้เกิดการแตกหักของ DNA และเกิดการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้น (22-24) จากข้อมูลที่กล่าวมาแล้วจะเห็นแล้วว่าสารสกัดจากเห็ดลม นั้นประกอบด้วยสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ และการศึกษาที่ผ่านมาของสารสกัดจากเห็ดลมในเซลล์มะเร็งเต้านม ก็พบว่าสารสกัดจากเห็ดลมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ดังนั้นการศึกษาครั้ง

นี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งและกลไกการยับยั้งของสารสกัดจากเห็ดลม (crude extract of *Lentinus polychrous* Vev.) ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดจากเห็ดลมมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้

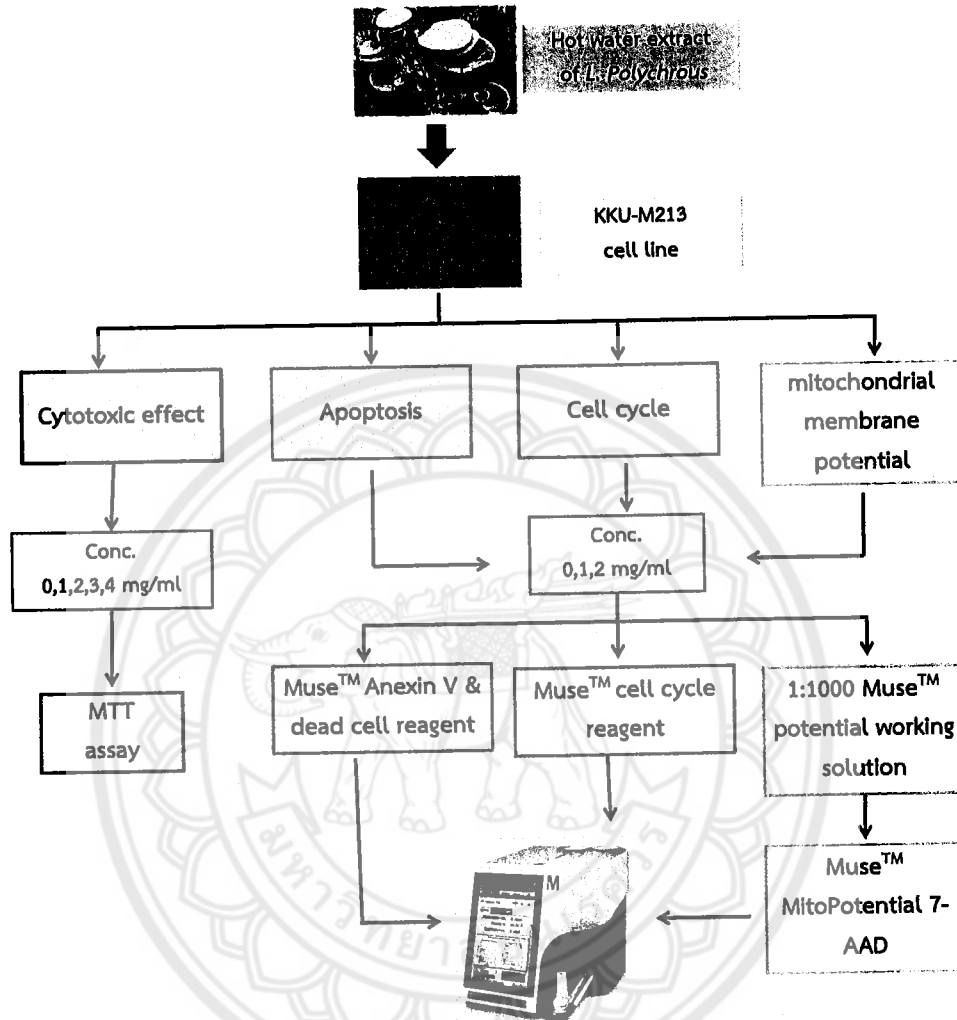
#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัย

1. ทราบถึงผลของสารสกัดจากเห็ดลมในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
  2. เข้าใจกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากสารสกัดจากเห็ด
  3. เป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ และผลข้างเคียงต่ำ มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์ ในการรักษาโรคมะเร็งได้
  4. สามารถส่งเสริมให้คนมารับประทานเห็ดลมกันมากขึ้น และยังเป็น การเพิ่มมูลค่าให้กับ ผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงเห็ดลม ซึ่งต่อไปอาจจะกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ของประเทศไทย
  5. สามารถนำงานวิจัยนี้ไปตีพิมพ์หรือเผยแพร่ให้กับผู้ที่สนใจ และเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจได้
  6. เป็นงานวิจัยที่สามารถต่อยอดงานวิจัยต่อไปอีก โดยดูการตอบสนองต่อสารสกัดจากเห็ดลมในมะเร็งต่างชนิด เพื่อดูความจำเพาะเจาะจงของมะเร็งแต่ละชนิดได้
- เปรียบเทียบการออกฤทธิ์กับยาที่ใช้รักษาผู้ป่วย มะเร็งในปัจจุบัน  
หรืออาจจะดูในแง่ของการออกฤทธิ์เสริมกับยาเหล่านั้นได้ นอกจากนี้หากผลที่ได้มีแนวโน้ม ที่ดี  
ก็สามารถนำไปทดลองต่อในสัตว์ทดลองต่อ เช่น  
ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดในหนูทดลองที่เป็นมะเร็ง  
ซึ่งผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปหลังจากโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงแล้ว

ผู้ใช้ประโยชน์ หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- มหาวิทยาลัยนเรศวร
- หน่วยงานวิจัยของรัฐ
- โรงพยาบาลและบุคลากรทางการแพทย์
- นักวิจัยและบุคคลทั่วไป

## วิธีการดำเนินการวิจัย



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนของการดำเนินการทดลอง

### 1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

#### 1.1 วัสดุและเครื่องมือ

1. Flask ขนาด T 25 , 6-well plate และ 24-well plate
2. Biosafety cabinet class II
3. ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ (CO<sub>2</sub> Incubator): 5% CO<sub>2</sub> 37 องศาเซลเซียส
4. Water bath
5. Inverted microscopes

6. Hemocytometer
7. Centrifuge
8. Micropipette
9. Pipette aid
10. Microcentrifuge tube
11. Tip ขนาด 1,000  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l
12. Vortex
13. Flow cytometry (Muse cell analyzer, Merk millipore)

## 1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

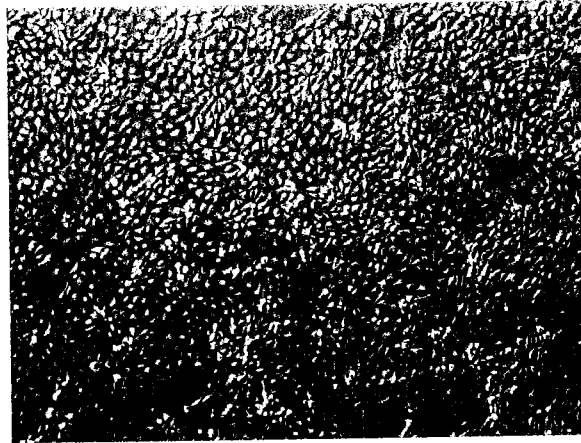
1. DMEM
2. Fetal bovine serum
3. Penicillin/Streptomycin antibiotics
4. Trypsin/EDTA
5. Phosphate buffered saline
6. Muse™ cell cycle kit
7. Muse™ Annexin V dead cell kit
8. Muse™ MitoPotential kit

## 2. เซลล์และสารสกัดจากเห็ดหลิน

เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่มีการแพร่กระจายสูง KKU-213 ซึ่งเป็นเซลล์ที่แยกได้จากก้อนมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์โสภิต วงศ์คำ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของ 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% Penicillin-Streptomycin เลี้ยงในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% CO<sub>2</sub> ตัวอย่างลักษณะเซลล์ดังรูปที่ 2





รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย 10x

สารสกัดจากเห็ดลมได้มาจาก เห็ดลมที่เก็บจากจังหวัดนครราชสีมาและตรัง ประเทศไทย นำส่วนของดอกเห็ดมาอบแห้งแล้วทำการบดและบั่นในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สารสกัดน้ำร้อนที่ได้จะนำมาตกตะกอนด้วย 90% ethanol/ammonium sulfate จะได้สารสกัดออกมาในรูปแบบ crude extract ที่ใช้สำหรับการทดลองต่อไป โดยได้ความอนุเคราะห์สารสกัดจาก ดร.จรงค์ อรรถรัฐ อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และได้มีการวิเคราะห์ด้วย ELISA และ western blot แล้วว่ามีปริมาณสาร PSK เป็นสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

### 3. ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด M213

หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หาความเข้มข้นและระยะเวลาที่สารสกัดมีผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยเปรียบเทียบร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดลมเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากเห็ดทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plates จำนวน  $5 \times 10^3$  cells/well บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดเห็ดลมที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 5 mg/ml MTT ปริมาตร 10  $\mu$ l ในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และละลายผลึกฟอร์มาซานด้วยสาร DMSO จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เทียบกับเซลล์ควบคุม

#### 4. ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่อการกระจายตัวของวัฏจักรเซลล์ (cell-cycle distribution)

cell cycle assay ทดสอบโดยด้วยวิธี PI staining เซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดจากเห็ดลม นำมาย้อมด้วยสาร propidium iodide ที่มี ethanol และ RNase A แล้ววัดการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละ phase ด้วยเครื่อง flow cytometry ในการทดลองนี้ใช้ชุดทดสอบ Muse™ cell cycle kit

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plates จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/well บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดเห็ดลมที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ Fix เซลล์ด้วย 70% เอทานอลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บั่นล้างด้วย 1x PBS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสาร Muse™ cell cycle reagent บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Muse™ cell analyzer

#### 5. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีหลังได้รับสารสกัดจากเห็ดลม

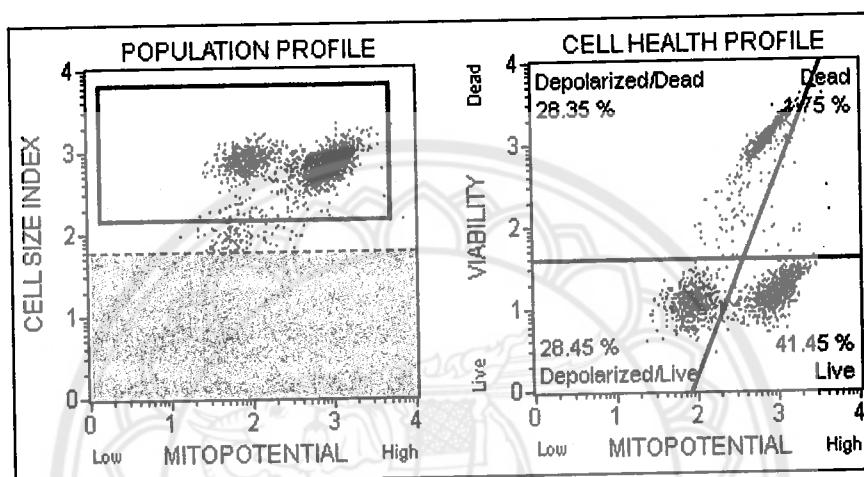
เซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้มีการตายแบบ apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์ และไม่โตคอนเดรีย การเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์เซลล์ทำให้ phosphatidylserine ที่อยู่ด้านในของผนังเซลล์มีการเปลี่ยนมาอยู่ที่ด้านนอก โดยสามารถตรวจวัดได้โดยวิธี annexinV staining ร่วมกับ PI staining ด้วยเครื่อง flow cytometry ซึ่งจะสามารถบอกได้ว่าเซลล์มีการตายในระยะเริ่มต้นหรือระยะท้าย ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบและวิเคราะห์โดย Muse™ Annexin V & dead cell kit ขั้นตอนการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plates จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/well บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดเห็ดลมที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบโดย Muse™ Annexin V & dead cell kit โดยเตรียมเซลล์ในสารละลาย 1%FBS จากนั้นเติมสาร Muse™ Annexin V & dead cell reagent บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Muse™ cell analyzer

การเปลี่ยนแปลงที่ไม่โตคอนเดรีย

โดยที่ไม่โตคอนเดรียของเซลล์ตายจะมีการสูญเสียความ

สามารถในการผ่านเข้าออกของโปรตีนบางอย่าง (permeable) ที่ตรวจวัดได้จากการวัดค่า mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) ด้วยเครื่อง flow cytometry ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบและวิเคราะห์โดย Muse™ MitoPotential Kit ขั้นตอนการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plates จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/well บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดเห็ดลมที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบด้วย Muse™ MitoPotential Kit โดยเติมสาร MitoPotential Dye ที่เจือจาง 1:1000 ใน 1X Assay buffer ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสาร 7-AAD บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Muse™ cell analyzer เพื่อตรวจสอบอัตราส่วนของเซลล์ที่เกิด Depolarized mitochondria และเซลล์ตาย (Dead) โดยจากการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ และการวิเคราะห์ผลแต่ละช่องเป็นดังนี้

lower-left: live cells with depolarized mitochondrial membrane [MitoPotential (-) and 7-AAD (-)]  
 lower-right: live cells with intact mitochondrial membrane [MitoPotential (+) and 7-AAD (-)]  
 upper-right: dead cells with depolarized mitochondrial membrane [MitoPotential (+) and 7-AAD (+)]  
 upper-left: dead cells with intact mitochondrial membrane [MitoPotential (-) and 7-AAD (+)]



รูปที่ 3 ตัวอย่างผลที่ได้จากการทดสอบ Muse MitoPotential Assay กราฟแรกเป็นการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างของประชากรในกรอบสี่เหลี่ยมเพื่อไปวิเคราะห์และแสดงผลในกราฟที่สองด้านขวา ซึ่งจะแสดงโดยแบ่งประชากรออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ live, live/depolarized, dead/depolarized, and dead cells

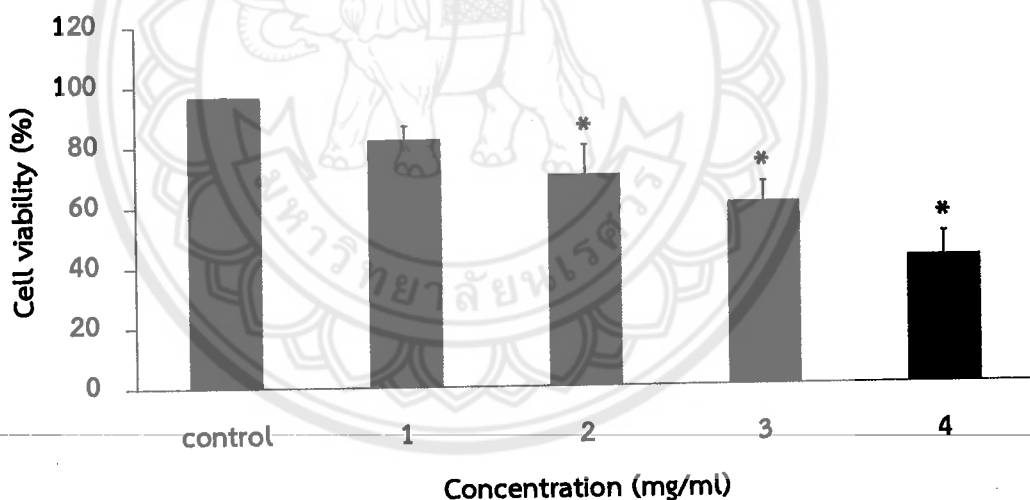
## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดอย่างน้อย 3 การทดลองจะถูกวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย  $*p < 0.05$  จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## ผลการวิจัย

### 1. ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213

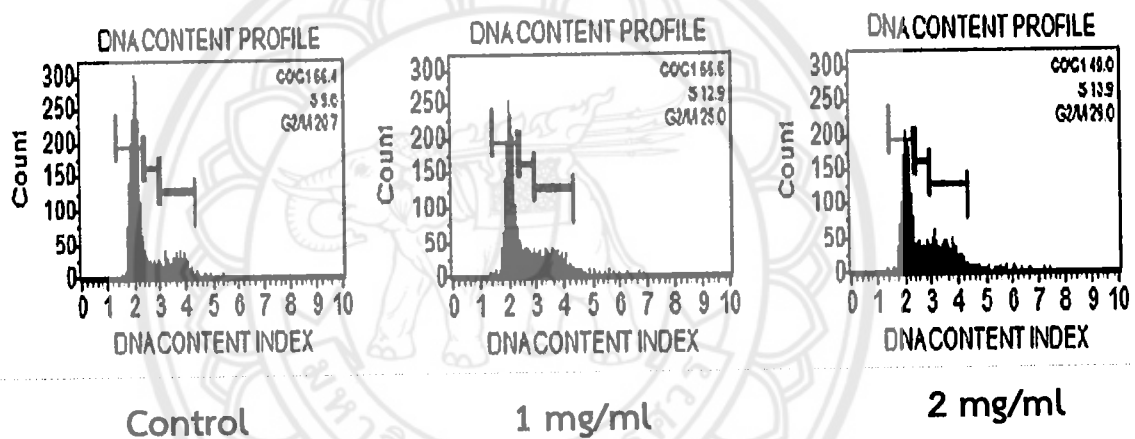
เมื่อทำการทดสอบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213 ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดลมที่สกัดด้วยน้ำร้อน ที่ความเข้มข้น 1-4 mg/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง (control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาทดสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดจากเห็ดลมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ความเข้มข้น 1 mg/ml สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ประมาณ 20% ดังแสดงในรูปที่ 4 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดลม อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลที่ได้สอดคล้องกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเห็ดลมความเข้มข้น 4 mg/ml สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ถึง 70% เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่า IC<sub>50</sub> พบว่ามีค่าเท่ากับ  $3.4 \pm 0.21$  mg/ml จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดลมสามารถยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



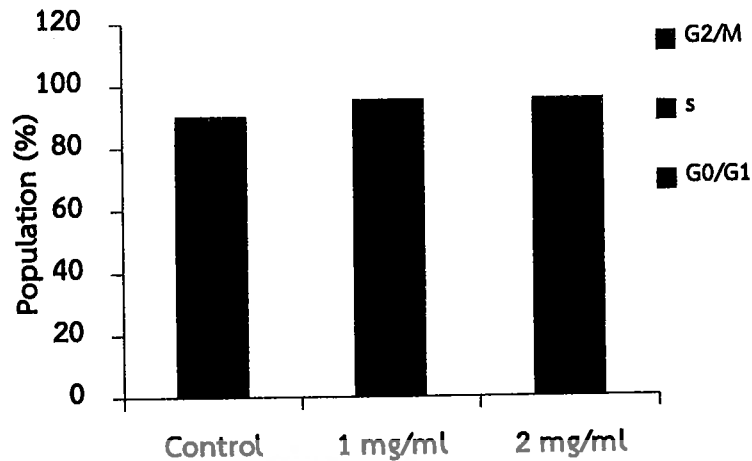
รูปที่ 4 อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดลม ตั้งแต่ความเข้มข้น 1-4 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธี MTT assay

## 2. ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่อการกระจายตัวของวัฏจักรเซลล์

เมื่อทำการทดสอบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดลมที่สกัดด้วยน้ำร้อน ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง (control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาศึกษารูปแบบของวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสี Propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer ได้ผลดังรูปที่ 5 และเปรียบเทียบค่าที่ได้ของแต่ละระยะในวัฏจักรเซลล์ดังรูปที่ 6 พบว่า สารสกัดจากเห็ดลมที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml จำนวนเซลล์ในระยะ G0/G1 มีสัดส่วนที่ลดลง ในขณะที่เซลล์ในระยะ S และ G2/M มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดลมส่งผลต่อการดำเนินไปของวัฏจักรของเซลล์ โดยทำให้เซลล์เกิดการชะลอในระยะ S และ G2/M ซึ่งอาจส่งผลให้การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นได้ช้าลง



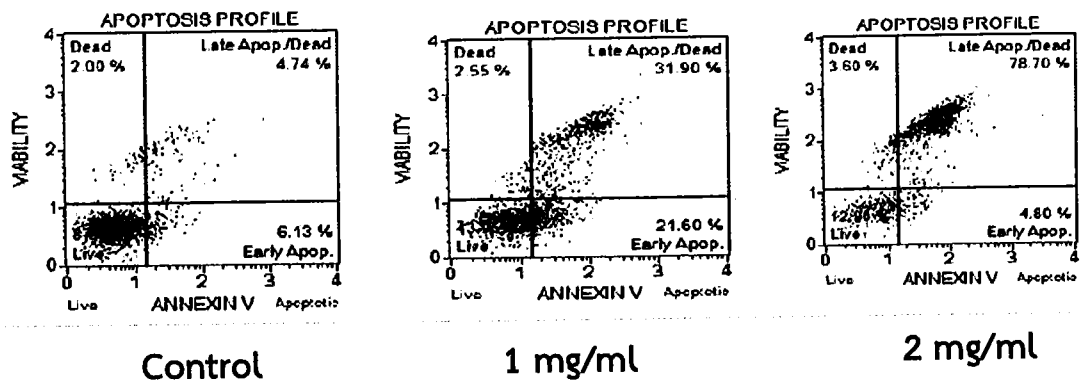
รูปที่ 5 ผลของรูปแบบวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดลม ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธีการย้อมสี propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer



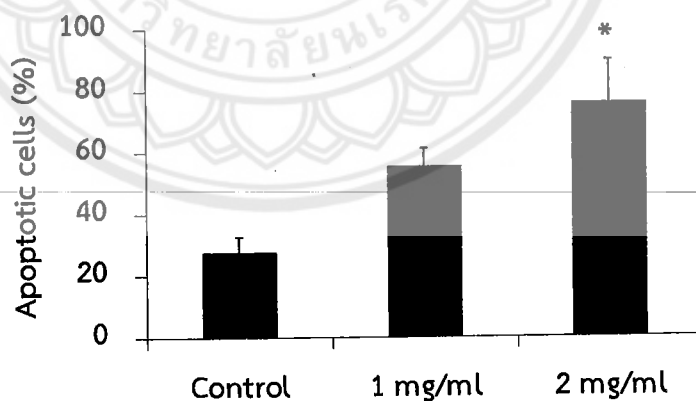
รูปที่ 6 กราฟแสดงค่าการกระจายตัวของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดถลม ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธีการย้อมสี propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

### 3. ผลของสารสกัดจากเห็ดถลมต่อการตายแบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากการทดสอบที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเห็ดถลมสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ ในการทดลองนี้ผู้วิจัย จึงสนใจทำการทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดถลมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพ็อพโตซิส (Apoptosis) ซึ่งเป็นรูปแบบการตายของเซลล์อย่างมีแบบแผน และเซลล์ที่เกิดการตายด้วยรูปแบบนี้จะถูกกำจัดหรือทำลายโดยไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์ข้างเคียง เมื่อทำการทดสอบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-213 ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดถลมที่สกัดด้วยน้ำร้อน ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง (control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาทดสอบการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ด้วยการย้อม AnnexinV ร่วมกับ PI ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 พบว่า สารสกัดจากเห็ดถลมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 87.14% เหลือ 43.95% โดยมีเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสในระยะแรกหรือระยะเริ่มต้น (early apoptosis) เพิ่มขึ้นจาก 6.13% และ 21.60% และเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสในระยะท้าย (late apoptosis) เพิ่มขึ้นจาก 4.74% และ 31.0% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดถลมเป็น 2 mg/ml ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสในระยะท้าย (late apoptosis) เพิ่มขึ้นจาก 31.0% เป็น 78.7% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดถลมความเข้มข้น 1 mg/ml และเมื่อนำผลรวมของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสในระยะแรกและระยะท้ายมาแสดงในกราฟรูปที่ 8 พบว่าสารสกัดจากเห็ดถลมสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKKU-213 เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



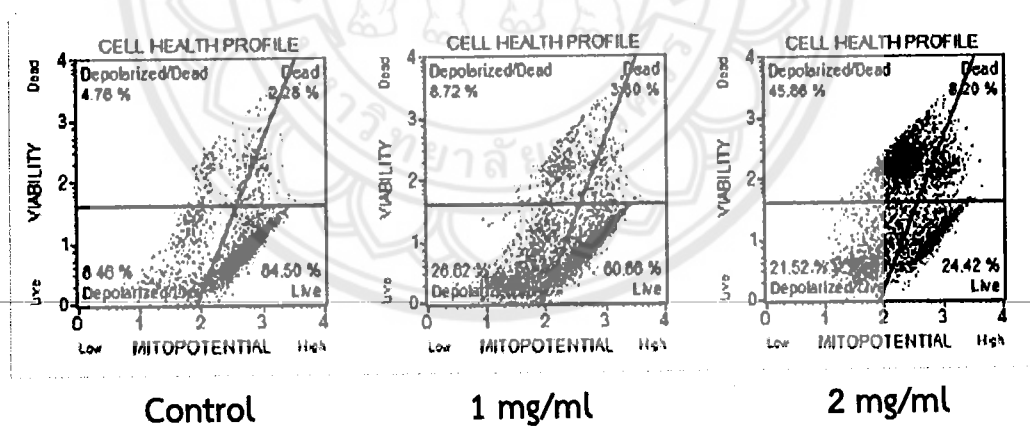
รูปที่ 7 ผลแสดงการตายของเซลล์แบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลินตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธีการย้อมสี Annexin V/propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer โดยแสดงสัดส่วนของเซลล์ที่มีชีวิต (Live) เซลล์ตายรูปแบบอื่น (Dead) เซลล์ตายแบบอะพ็อพโตซิสระยะแรก (early apoptosis) และเซลล์ตายแบบอะพ็อพโตซิสระยะท้าย (late apoptosis)



รูปที่ 8 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์แบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทดสอบด้วยวิธีการย้อมสี Annexin V/propidium iodide และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

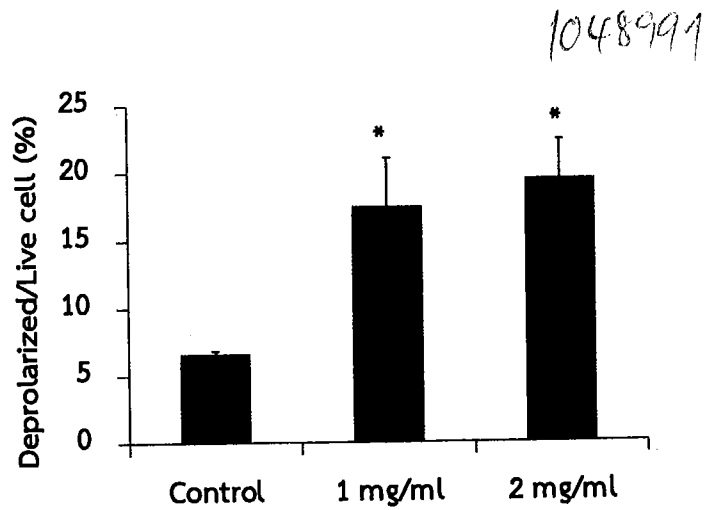
#### 4. ผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเห็ดลมสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิส ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดลมต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ โดยจะเกิดขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ที่สามารถตรวจวัดได้ในรูปของศักย์ภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial membrane potential;  $\Delta\Psi_m$ ) หากมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นตั้งแต่ระยะแรก จะทำให้ค่าศักย์ภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียลดลงหรือเกิด Depolarization ในการทดลองนี้ใช้เป็นการตรวจวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยชุดทดสอบ Muse™ MitoPotential Assay ในการย้อมสี MitoPotential Dye ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีประจุบวกและมีคุณสมบัติชอบไขมัน เพื่อตรวจสอบ mitochondrial membrane potential และใช้สีย้อม 7-AAD เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่ตายแล้วด้วย ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยสารสกัดจากเห็ดลมที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในกลุ่ม Depolarization/Live และ Depolarization/Dead ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยที่ความเข้มข้น 2 mg/ml มีจำนวนเซลล์ Depolarization/Dead เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และเมื่อนำผลรวมของจำนวนเซลล์ Depolarization/Live และ Depolarization/Dead มาแสดงในรูปที่ 10 พบว่าสารสกัดจากเห็ดลมส่งผลให้เซลล์เกิด Depolarization ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ถึงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย



รูปที่ 9 ผลแสดงการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KLU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดลม ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบการเกิด Depolarization และการตายของเซลล์ด้วย Muse™ MitoPotential kit และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer ผลการทดลองของกราฟในแต่ละช่องแสดงสัดส่วนของเซลล์ live, live/depolarized, dead/depolarized และ dead cells





สำนักหอสมุด

22 ก.พ. 2565

ว. AC

280

.648

5798

2597

รูปที่ 10 กราฟแสดงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลิน ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ทดสอบด้วย Muse™ MitoPotential kit และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer



## ข้อวิจารณ์ของโครงการวิจัย

สารสกัดจากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ โดยปัจจุบันเห็นจัดเป็นอาหารที่มีฤทธิ์เป็นยา โดยพบว่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์หลายอย่าง ได้แก่ lectins, fungal immunomodulatory proteins (FIP), ribosome inactivating proteins (RIP), ribonucleases, laccases, Polysaccharide-K, krestin (PSK) รวมทั้งโปรตีนอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (25) จากงานวิจัยก่อนหน้าของกลุ่มผู้วิจัยพบว่า เมื่อนำเห็ดต่างๆที่สามารถบริโภคได้ในประเทศไทยมาทำการสกัดด้วยน้ำร้อน พบว่ามีสารสกัดจากเห็ดหลินมีปริมาณสาร PSK สูงเมื่อเทียบกับเห็ดชนิดอื่น ได้แก่ เห็ดขอนขาว เห็ดหอมและเห็ดฟาง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเห็ดหลินมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์) จึงมีความน่าสนใจว่าสารสกัดเห็ดหลินนี้ น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งท่อน้ำดีได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดเห็ดหลินที่สกัดด้วยวิธีน้ำร้อน โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับหลอดทดลอง และศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินสามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 โดยส่งผลกระทบต่อวัฏจักรเซลล์ การทำงานของไมโทคอนเดรีย และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเกิดการตายแบบอะพอโทซิส

จากการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดเห็ดหลินที่สกัดด้วยวิธีการใช้น้ำร้อน ความเข้มข้น 1-4 mg/ml จากผล MTT assay พบว่า สารสกัดเห็ดหลินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด KKU-213 ได้เป็นไปตามความเข้มข้น โดยค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ได้ 50% หรือ IC50 เท่ากับ 3.4 mg/ml ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สูง อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดด้วยวิธีนี้ อาจจะทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญปริมาณน้อย จึงทำให้ต้องใช้สารสกัดความเข้มข้นสูงในการสกัด ทั้งนี้ผลที่ได้จากการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ นิภาพร และคณะ ในปี 2009 ที่ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดหลินในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 พบว่ามีค่า IC50 สูงเช่นกัน โดยมีค่ามากกว่า 500 µg/ml (19) แต่เป็นการสกัดด้วย methanol การศึกษาของชาติชาย และคณะ ในปี 2011 พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ของสารสกัดเห็ดหลินชนิดสดกับแห้ง สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ MCF-7 ได้ 38% และ 45% ตามลำดับ (20) ทั้งนี้ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งมะเร็งได้ และอาจเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการสกัดให้ได้ปริมาณสารสำคัญที่สูงขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการป้องกันหรือรักษามะเร็งได้

ในการพัฒนาสารต่างๆมาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง ซึ่งก็คือการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งลดการเจริญเติบโต เกิดการตายขึ้นตามมานั้นเป็นเป้าหมายของการกำจัดเซลล์มะเร็ง ออกจากร่างกาย แต่ในบางครั้งที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้นให้เข้าสู่กระบวนการตายหรือเกิดความล้มเหลวของกระบวนการ การตายภายในเซลล์นั้นเป็นสาเหตุที่

ทำให้เซลล์มะเร็งต่อการรักษา ดังนั้นยาที่ใช้ในการรักษาที่น่าจะได้ผลกับการ รักษา มะเร็งควรมีคุณสมบัติกระตุ้น การตายแบบ apoptosis ซึ่งเป็นโปรแกรมการตายทางกายภาพของร่างกายที่ไม่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่น แทรกซ้อน โดยจะมีกระบวนการกำจัดเซลล์ที่ตายอย่างมีระบบที่ควบคุมเป็นขั้นตอน ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า จากการ ตรวจสอบด้วยเทคนิค AnnexinV/PI สารสกัดจากเห็ดลมสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเกิดการตายแบบ apoptosis ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด บ่งชี้ว่าสารสกัดจากเห็ด ลมมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Rosendahl และคณะ ในปี 2012 พบว่า PSK สามารถกระตุ้นการทำงานของ Bax ซึ่งจัดเป็น pro-apoptotic molecule ที่สำคัญที่ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งตับอ่อน (26)

ในการเจริญพัฒนาของเซลล์มะเร็งพบว่าจะมีการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ที่ผิดปกติส่งผลให้เซลล์มะเร็งมี การแบ่งเซลล์ที่มากเกินไปจนการควบคุม จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสำคัญจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยไปชะลอหรือหยุดการดำเนินของวัฏจักรเซลล์ที่ระยะต่างๆ ได้ การศึกษาของ Eva Jiménez-Medina และคณะ ในปี 2008 พบว่าสาร PSK สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งตับอ่อนและมะเร็งกระเพาะอาหาร หยุดการเจริญเติบโตที่ระยะ G0/G1 ของวัฏจักรเซลล์ (27) สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเห็ดลมสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213 เกิดการชะลอที่ ระยะ S และ G2/M เมื่อทดสอบสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 5 และ 6) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดของเห็ดลม อาจส่งผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการชะลอวัฏ จักรเซลล์ที่เกิดจากการได้รับสารสกัดจากเห็ดลม น่าจะเป็นกระบวนการที่สำคัญที่ส่งผลทำให้เกิดการตายของ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทั้งนี้กลไกในระดับโมเลกุลของสารสกัดที่ส่งผลต่อการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ยังต้องมีการศึกษา ต่อไป

นอกจากนี้การทำงานของไมโทคอนเดรียยังเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ผ่านวิธี intrinsic pathway ที่ตอบสนองหากมีการกระตุ้นความเสียหายภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น อนุมูลอิสระหรือเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ การเกิด Depolarization บ่งชี้ถึงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome C ที่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis ได้ ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายกับไมโทคอนเดรีย จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (28) การศึกษาก่อนหน้า พบว่า PSK สามารถยับยั้งความสามารถของไมโทคอนเดรียในมะเร็งหลายชนิด และผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดลมมีปริมาณเซลล์ที่เกิด depolarization หรือสูญเสียความสามารถของ เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 7 และ 8) ซึ่งน่าจะเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในท้ายที่สุด อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่ชัดยังต้องมีการศึกษาต่อไป

## สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากเห็ดลมในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอโทซิส โดยส่งผลต่อการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ โดยการชะลอที่ระยะ S และ G2/M นอกจากนี้สารสกัดยังส่งผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย ผลที่ได้จากการศึกษานี้ บ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดลมอาจมีศักยภาพในการป้องกันและรักษามะเร็งท่อน้ำดี

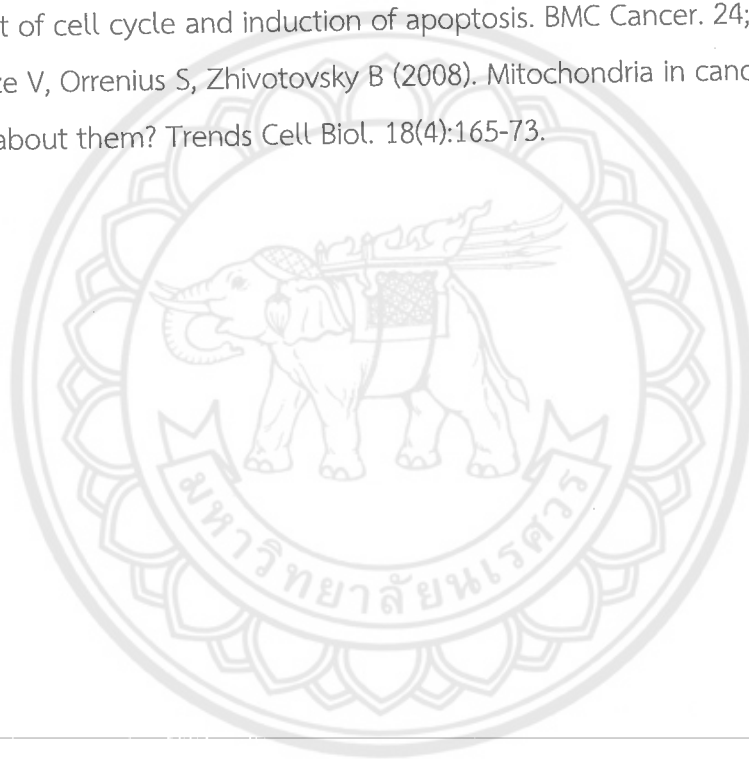


## เอกสารอ้างอิง

1. Landis S, Murray T, Bolden S, Wingo P (1998). "Cancer statistics, 1998". *CA Cancer J Clin* 48 (1): 6–29.
2. Vatanasapt, V; Sriamporn, S; Vatanasapt, P (2002). "Cancer control in Thailand". *Japanese journal of clinical oncology*. 32 Suppl: S82–91.
3. Uttaravichien, T; Bhudhisawasdi, V; Pairojkul, C; Pugkhem, A (1999). "Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand". *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 6 (2): 128–35.
4. Patel T (2002). "Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies". *BMC Cancer* 2: 10.
5. Vauthey J, Blumgart L (1994). "Recent advances in the management of cholangiocarcinomas". *Semin. Liver Dis.* 14 (2): 109–14.
6. Glimelius B, Hoffman K, Sjöden P, Jacobsson G, Sellström H, Enander L, Linné T, Svensson C (1996). "Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer". *Ann Oncol* 7 (6): 593–600.
7. Choi C, Choi I, Seo J, Kim B, Kim J, Kim C, Um S, Kim J, Kim Y (2000). "Effects of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of pancreatic-biliary tract adenocarcinomas". *Am J Clin Oncol* 23 (4): 425–8.
8. Park J, Oh S, Kim S, Kwon H, Kim J, Jin-Kim H, Kim Y (2005). "Single-agent gemcitabine in the treatment of advanced biliary tract cancers: a phase II study". *Jpn J Clin Oncol* 35 (2): 68–73.
9. Giuliani F, Gebbia V, Maiello E, Borsellino N, Bajardi E, Colucci G (2006). "Gemcitabine and cisplatin for inoperable and/or metastatic biliary tree carcinomas: a multicenter phase II study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM)". *Ann Oncol.* 17 Suppl 7: vii73–vii77.
10. Bhargava P, Jani C, Savarese D, O'Donnell J, Stuart K, Rocha Lima C (2003). "Gemcitabine and irinotecan in locally advanced or metastatic biliary cancer: preliminary report". *Oncology (Williston Park)* 17 (9 Suppl 8): 23–6.

11. Knox J, Hedley D, Oza A, Feld R, Siu L, Chen E, Nematollahi M, Pond G, Zhang J, Moore M (2005). "Combining gemcitabine and capecitabine in patients with advanced biliary cancer: a phase II trial". *J Clin Oncol* 23 (10): 2332–8.
12. Seema P, Arun G. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech* 2(1):1-15.
13. Chen J, Seviour R (2007) Medicinal importance of fungal  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ -glucans. *Mycol Res* 111:635–652.
14. Arora D (1986) *Mushrooms Demystified*. Berkeley: Ten Seed Press.
15. Ying JZ, Mao XL, Ma QM, Zong YC, Wen HA (1987). *Icons of medicinal fungi from China*. Beijing: Scientific Press.
16. Charida P, Poonpilai S, Emiko S, Hisashi H, Yoshinori N (2004). Combination of laccase, xylanase and cellulose In lignocellulose degradation by white rot fungi, *Lentinus polychrous* Lev. And *L. squarrosulus* Mont. *Kasetsart J Nat Sci* 38(1): 65-73.
17. Klinhom U, Klinhom W (2006). *57 Traditional mushrooms*. Thai Health Foundation, Bangkok.
18. Thetsrimuang C, Khammuang S, Sarnthima R (2011). Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus sp.* Strain RJ-2. *International Journal of Pharmacology* 7, 58–65.
19. Armassa N, Pongchompu O, Rayan S, Leethong S, Weerapreeyakul N, Machana S (2009) Antioxidant activity and cytotoxicity in breast cancer cells line of mushrooms extracts; *Lentinus polychrous* Lev. Compared to *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences* 5, 243–250.
20. Thetsrimuang C, Khammuang S, Chiablaem K, Srisomsap C, Sarnthima R (2011). Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lev. *Food Chemistry* 128, 634–639.
21. Fisher M, Yang LX (2002). Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Res* 22(3):1737-54.
22. Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495–516.
23. Fulda S, Debatin KM (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798–4811.

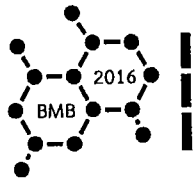
24. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.
25. Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol Adv* 29(6):667-74.
26. Rosendahl AH, Sun C, Wu D, Andersson R (2012). Polysaccharide-K (PSK) increases p21(WAF/Cip1) and promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 12(6):467-74..
27. Jiménez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F, Garcia-Lora A (2008). The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*. 24;8:78.
28. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol*. 18(4):165-73.







การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสาขาวิชาชีวเคมีและชีวโมเลกุล ครั้งที่ 5 ประจำปี 2559 ภายใต้แนวความคิด “ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลเพื่ออนาคตที่ยั่งยืน” "Biochemistry for a sustainable future" ระหว่างวันที่ 26 - 27 พฤษภาคม 2559 ณ โรงแรมบีพี สมิหลา บีช รีสอร์ท จังหวัดสงขลา



The 5th

International Biochemistry and Molecular Biology  
Conference

MAY 26-27, 2016



***Lentinus polychrous* extract inhibits cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest**

**Jeranan Jantra<sup>1</sup>, Jongrak Attarat<sup>1</sup>, Suchada Phimsen<sup>1\*</sup>**

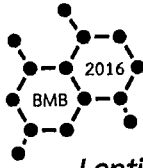
<sup>1</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University*

\*Corresponding author: [tookybc@hotmail.com](mailto:tookybc@hotmail.com)

**Abstract**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an uncommon adenocarcinoma which arises from the epithelial cells of the bile ducts. Several researchs have been focus to identify and develop the effective agents for prevention and treatment in this cancer. *Lentinus polychrous* has been used for food and previously showed a very high proteoglycan/PSK compare to the other mushroom species in Thailand. Thus, the aim of the study was to investigate the anticancer effect of a hot water extract of *L. polychrous* against CCA and their mechanism induced cell death. Cytotoxic effect against a CCA cell line (KKU-M213) was assessed by MTT assay. Investigation of apoptotic cell was performed by AnnexinV staining and mitochondrial membrane potential assay. The cell cycle was analyzed using flow cytometry. The hot water extract of *L. polychrous* significantly inhibited the proliferation of CCA cell line. Our data further demonstrated that the hot water extract of *L. polychrous* induced the number of the early and late apoptotic cells via mitochondrial membrane dysfunction. Moreover, the hot water extract of *L. polychrous* increased cell cycle at S and G2/M phase. These data suggested *Lentinus polychrous* extract inhibited CCA cell proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest so the *L. polychrous* extract might have potential for CCA prevention and therapy.

**Keywords:** Cholangiocarcinoma, *Lentinus polychrous*, Apoptosis, Cell cycle arrest



**Lentinus polychrous extract inhibits cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest**

Jeranan Jantra<sup>1</sup>, Jongrak Attarat<sup>1</sup>, Suchada Phimsen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University

\*Corresponding author: tookybc@hotmail.com

**ABSTRACT**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an uncommon adenocarcinoma which arises from the epithelial cells of the bile ducts. Several researchs have been focus to identify and develop the effective agents for prevention and treatment in this cancer. *Lentinus polychrous* has been used for food and previously showed a very high proteoglycan/PSK compare to the other mushroom species in Thailand. Thus, the aim of the study was to investigate the anticancer effect of a hot water extract of *L. polychrous* against CCA and their mechanism induced cell death. Cytotoxic effect against a CCA cell line (KKU-M213) was assessed by MTT assay. Investigation of apoptotic cell was performed by AnnexinV staining and mitochondrial membrane potential assay. The cell cycle was analyzed using flow cytometry. The hot water extract of *L. polychrous* significantly inhibited the proliferation of CCA cell line. Our data further demonstrated that the hot water extract of *L. polychrous* induced the number of the early and late apoptotic cells via mitochondrial membrane dysfunction. Moreover, the hot water extract of *L. polychrous* increased cell cycle at S and G2/M phase. These data suggested *Lentinus polychrous* extract inhibited CCA cell proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest so the *L. polychrous* extract might have potential for CCA prevention and therapy.

Keywords: Cholangiocarcinoma, *Lentinus polychrous*, Apoptosis, Cell cycle arrest

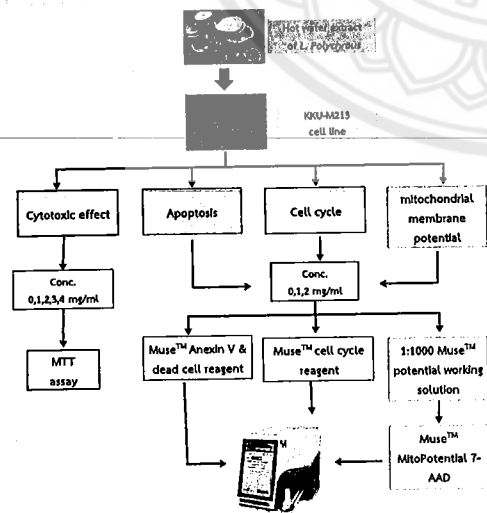
**INTRODUCTION**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive cancer with increasing worldwide incidence and mortality rates. The highest incidence rate in the world is observed in the northeast region of Thailand (Sriamporn S, et al (2004). Treatment for CCA is largely effective treatment or side effects to the patient. Chemotherapy with plant-derived compounds or dietary phytochemicals has emerged as an accessible and promising approach to cancer control and management (Surh, 2003). Mushrooms have been recognized for their medical properties for many years. As previous reports there are various mushroom proteins with interesting biological activities, such as lectins, laccases, polysaccharo-peptide, PSK and other proteins, which have become popular sources of natural antitumor, antiviral, antimicrobial, antioxidative, and immunomodulatory agents (Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X .2011).

**OBJECTIVES**

To investigate the anticancer effect of a hot water extract of *Lentinus polychrous* in cholangiocarcinoma and mechanism induced cell death.

**METHODS**



**REFERENCE**

1. Sriamporn S, Pisanl P, Pipitgool V, et al (2004). Prevalence of *Ophthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Trop Med Int Health*, 9, 588-94.
2. Surh, Y.-J. (2005) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3: 768-780.
3. Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X.(2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. V.29, December, Pages 667-674.

**RESULTS**

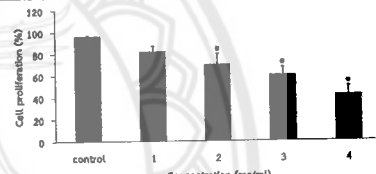


Figure 1. Effect of *L. polychrous* extract inhibited the proliferation of KKU-M213 cells in a dose-dependent manner. (\* p<0.05)

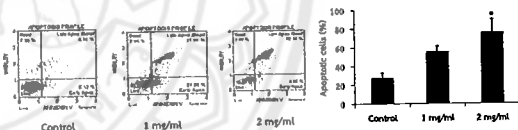


Figure 2. Effect of *L. polychrous* extract induces apoptosis in KKU-M213 cell by flow cytometry. (\* p<0.05)

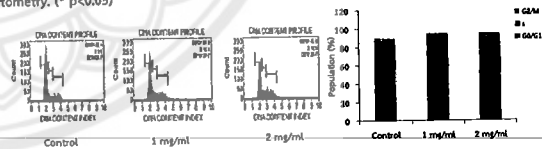


Figure 3. Effect of *L. polychrous* extract induces cell cycle arrest G2/M phase by flow cytometry.

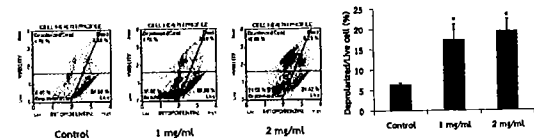


Figure 4. Effect of *L. polychrous* extract induces disruption of the mitochondrial membrane potential by flow cytometry. (\* p<0.05)

**CONCLUSION**

In study indicates that biological activities of *Lentinus polychrous* extract. The effect of *Lentinus polychrous* reduces cell viability, induces cell cycle arrest at S and G2/M phase, and activates apoptosis that involves mitochondria on human cholangiocarcinoma cell, KKU-M213. In summary, these findings suggest that *Lentinus polychrous* extract possesses an anti-cancer activity and may be a potential candidate as an anti-cancer agent.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Research Support Grant from Naresuan University 2014 (R2557C102).

