

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

จริญญา งามขำ

กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือเป็นสมุนไพรจีนที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและนิยมใช้ในด้านยาแผนโบราณในการบำรุงสุขภาพ เป็นยาอายุวัฒนะหรือใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็งซึ่งเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในตัวทำละลายที่เป็นเมทานอลและน้ำ ในการยับยั้งการเจริญและการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยวิธีการวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่มีชีวิต (total protein determination), Matrigel invasion assay และ anti-motility assay ตามลำดับ และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง; MMP-2 และ MMP-9 ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลและน้ำสามารถยับยั้งการเจริญ การแทรกตัวและการเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนของเซลล์ MCF-7 ในระดับหลอดทดลอง และสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองยังสามารถลดระดับการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 mRNA โดยสามารถลดระดับการแสดงออกของ MMP-9 mRNA ได้ดีกว่าการแสดงออกของ MMP-2 mRNA เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดจากเห็ดหลินจือจากตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ในระดับหลอดทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลทั้งในระดับหลอดทดลองหรือสัตว์ทดลองต่อไป โดยเฉพาะการศึกษาทางด้านพรีคลินิกและคลินิก ซึ่งเป็นกระบวนการวิจัยที่สำคัญในการพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคนอนาคร

คำสำคัญ: เห็ดหลินจือ การยับยั้งเซลล์มะเร็ง การยับยั้งการแทรกผ่าน การยับยั้งการเคลื่อนที่

*ผู้รับผิดชอบบทความ:

จริญญา งามขำ

กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

E-mail: jarunya43@hotmail.com

Evaluation of Anti-metastatic Effects of *Ganoderma lucidum* Extracts on Human Mammary Carcinoma Cell Line; MCF-7

Jarunya Ngakham

Research Division, National Cancer Institute

Abstract

Ganoderma lucidum has been widely used as a traditional herbal medicine for promoting vitality and longevity in China and many Asian countries. It has been also used for the prevention or treatment of a variety of diseases including cancer. This study investigated the anti-cancer and anti-metastatic activities of methanol and water extracts from *G. lucidum* on breast cancer cell lines; MCF-7. The anti-cancer activity was determined with total protein determination method. The anti-invasion and anti-motility potential were evaluated using Matrigel-invasion assay and anti-motility assay, respectively. Semi-quantitative RT-PCR technique was performed to evaluate MMP-2 and MMP-9 mRNA expressions. The results showed the inhibitory effects of the methanol and water extracts from *G. lucidum* on the proliferation of MCF-7. The extracts have been also exhibited anti-metastatic activities by reducing the invasion and motility of MCF-7 in a dose-dependent manner. Moreover, these extracts down-regulated the function of MMP-2 and MMP-9 genes by decreasing the expression of MMP-9 mRNA and MMP-2 mRNA in treated breast cell line; MCF-7. In conclusion, all our findings indicated that the methanol and water extracts from *G. lucidum* possessed anti-cancer and anti-metastatic activities. They are promising for further investigation at cellular and molecular levels. In addition, further studies on pre-clinical and clinical are necessary for the validation of this herbal medicine in cancer prevention and treatment.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Anti-cancer, Anti-invasion, Anti-motility***Corresponding author**

Jarunya Ngakham

Research Division, National Cancer Institute, Ratchathewi, Bangkok 10400

E-mail: jarunya43@hotmail.com

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย โดยเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ และในแต่ละปีก็มีแนวโน้มของผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มมากขึ้น^{1,2} โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนหรือมีการแบ่งตัวของเซลล์แบบผิดปกติทั้งในรูปลักษณะของเซลล์หรือความผิดปกติของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ ซึ่งการแบ่งตัวแบบผิดปกติหรือการกลายพันธุ์นี้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการเจริญ (growth) การพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) ตลอดจนอัตราการรอดของเซลล์ (survival)³ เซลล์มะเร็งเป็นเนื้องอกในกลุ่ม malignant tumor ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบผิดปกติและสามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงหรืออวัยวะเป้าหมายอื่นๆ ของร่างกายได้ โดยกระบวนการแพร่กระจาย (metastasis) จะประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ หลายขั้นตอน เช่น การแทรกตัวหรือการบุกรุก (invasion) เข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียง, การเคลื่อนที่ (motility) แบบไร้ทิศทางหรืออาจมีทิศทางที่จำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็ง หรือการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เป็นต้น และผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิตจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ของร่างกาย³⁻⁶ ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่นำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พืช สมุนไพร มาค้นคว้าศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ เสริมสร้างภูมิคุ้มกันต้านทาน บำบัดรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง รวมทั้งการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาหรือคิดค้นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสำหรับใช้ในการบำบัดอาการต่างๆ ที่เกิดจากโรคมะเร็ง⁷⁻¹⁰ โดยส่วน

ใหญ่จะเป็นสมุนไพรหรือพืชที่มีประวัติในการบำบัดรักษาตามตำราแพทย์แผนไทยโบราณ ซึ่งเห็ดหลินจือก็เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย

เห็ดหลินจือ หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Ganoderma lucidum* เป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้บำบัดรักษาโรคเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น หรือเกาหลี ในอดีตเห็ดหลินจือนับเป็นของหายากและมีราคาสูง มักรับประทานในรูปชาหรือผง¹ ซึ่งในตำรับยาแพทย์แผนจีนเห็ดหลินจือจะมีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงร่างกาย ใช้ในการบำบัดโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ลดความดันโลหิต บรรเทาโรคไขข้ออักเสบ จากผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาของสารสกัดจากเห็ดหลินจือจำนวนมากพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือสามารถลดน้ำตาลในเลือด ลดปริมาณ LDL และ triglyceride ในเลือด^{11,12} กระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เช่น Natural killer cell (NK cell) และ Macrophage รักษาอาการภูมิแพ้ กระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือด เป็นต้น¹²⁻¹⁴ นอกจากนี้มีงานวิจัยจำนวนหนึ่งพบว่า สารสกัดจากเห็ดหลินจือสามารถต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียในหนู ยับยั้งการเจริญของไวรัสบางชนิด¹¹⁻¹² และด้านการเกิดอนุมูลอิสระในระดับหลอดทดลอง¹⁵ และจากผลการวิจัยในระดับโมเลกุล พบว่า polysaccharide peptide หรือ triterpene ในสารสกัดจากเห็ดหลินจือสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis หรือ programmed cell death ยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์มะเร็ง (cell cycle arrest) ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง (anti-

angiogenesis)^{11-13, 16-18} และสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (anti-metastasis) ในระดับหลอดทดลอง โดยยับยั้งหรือลดปริมาณการแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งของเอนไซม์หรือสารเคมีชนิดต่างๆที่ส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เช่น matrix metalloproteinase (MMPs) หรือ uPA^{11-12, 18-21} จากผลดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการประเมินศักยภาพของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในการยับยั้งการเจริญ การแทรกตัวและการเคลื่อนของเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง รวมทั้งการยับยั้งการทำงานของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมสารสกัดจากเห็ดหลินจือในตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ

นำตัวอย่างเห็ดหลินจือแห้ง จากร้านจำหน่ายสินค้าในโครงการพิเศษ ตั้งอยู่ที่กรุงเทพมหานคร จำนวน 420 กรัม อบแห้งที่อุณหภูมิ 40-50°C และนำมาบดละเอียด แบ่งตัวอย่างที่บดละเอียดเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็น 100% เมทานอล (AR grade, Merck, Germany) ปริมาตร 2 ลิตร โดยแช่เห็ดหลินจือในเมทานอลประมาณ 1 สัปดาห์ ในขณะที่ส่วนที่สองสกัดด้วยน้ำด้วยการต้มในน้ำเดือดที่มีปริมาตร 2 ลิตร เช่นเดียวกัน ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเห็ดหลินจือจากการเตรียมทั้งสองวิธี มาแยกกากและตะกอน ด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง (Millipore, USA) ตามลำดับ นำสารละลายไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator (Buchii,

Switzerland) และ freeze dryer (Labconco, USA) จนแห้งสนิท เก็บสารสกัดในที่มืด อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป

ในการนำสารสกัดแห้งที่เตรียมได้ไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆใช้ 0.5% DMSO (v/v) (Merck, Germany) เป็นตัวทำละลายและเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆตามที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM (Biowhittaker, USA) ที่มีการเติมด้วย 10% inactivated newborn calf serum (Biowhittaker, USA) ในสภาวะปราศจากเชื้อและผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียว

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ในการศึกษานี้คือ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด human mammary carcinoma; MCF-7 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. พรทิพา พิชชา โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM ที่เติม 10% inactivated newborn calf serum (NCS) และ 1% ยาปฏิชีวนะในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 95% ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (Anti-proliferative effect) ของเซลล์มะเร็ง

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ด้วยวิธี Total protein determination²²⁻²³ เพื่อวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่มีชีวิต และมี folin reagent (BDH, England) เป็นสารบ่งชี้ปริมาณโปรตีนของเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบ โดยเตรียมเซลล์มะเร็งเต้านมให้มีความเข้มข้นที่ 4×10^4 เซลล์

ต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมเซลล์ที่เตรียมจำนวน 3 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM ที่มีสารสกัดจากเห็ดหลินจือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จำนวน 1 มิลลิลิตรในขวดเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (Corning, USA) และนำไปบ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมงตามลำดับ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเจริญของเซลล์ โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากเห็ดหลินจือเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ วิเคราะห์ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้เป็นครึ่งหนึ่ง (IC₅₀; inhibitory concentration 50%)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแทรกตัวหรือบุกรุก (anti-invasion) ของเซลล์มะเร็ง

ดำเนินการตามวิธีการทดสอบของ Sirica AE²⁴, Jung S²⁵ และคณะ โดยเตรียมสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันจำนวน 600 ไมโครลิตรใส่ลงในส่วนล่าง (lower part) ของ Transwell chamber (Costar, USA) ขนาด 6.5 เซนติเมตรที่บรรจุใน 24-well plate และเคลือบผิวหน้าของเมมเบรนด้วย Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD, USA) และเติมเซลล์ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 5x10⁴ เซลล์/chamber ในอาหารชนิดเดียวกันจำนวน 200 ไมโครลิตร บริเวณด้านบนของ chamber (upper part) นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ในสภาวะ 37°C, 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ Transwell chamber ที่ทดสอบมากำจัดเซลล์ที่ไม่สามารถแทรกผ่าน

Matrigel ที่เคลือบอยู่บนผิวหน้าของเมมเบรนหรือลอดผ่านรูของเมมเบรนไปเกาะยังผิวด้านล่างได้โดยใช้ก้านสำลี (cotton swab) กวาดเซลล์ที่อยู่บริเวณด้านบนเมมเบรนออกไป จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดทั้งด้านบนและล่าง ล้าง chamber ด้วย phosphate buffer saline (PBS) 1-2 ครั้งและดำเนินการย้อมเซลล์ที่สามารถแทรกผ่านเมมเบรน ด้วยการแช่ chamber ใน 25% methanol เป็นระยะเวลา 30 นาที และย้อมด้วย 0.5% crystal violet เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง chamber ด้วย PBS อีกครั้ง จากนั้นคำนวณจำนวนของเซลล์ที่ไม่สามารถถูกยับยั้งหรือสามารถแพร่ผ่านเมมเบรน (invade cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีได้ทดสอบกับสารสกัดจากเห็ดหลินจือ ดังสมการ

จำนวนเซลล์ที่แทรกผ่านเมมเบรน

$$= (\text{area of each well/area of magnification}) \times (\text{counted cells/number of counted area})$$

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ (anti-motility) ของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบการยับยั้งการแทรกตัวของเซลล์แต่บริเวณผิวด้านบนของเมมเบรนของ Transwell plate จะไม่เคลือบด้วย Matrigel และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับกลุ่มควบคุม

การประเมินศักยภาพของสารสกัดต่อระดับการแสดงออกของ Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) mRNA

ในการประเมินศักยภาพของสารสกัดจากเห็ดหลินจือต่อระดับการแสดงออก MMP-2 และ MMP-9 mRNA ซึ่งมีความสำคัญในการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ใช้การทดสอบด้วยวิธี semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เตรียมเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture plate; Corning, USA) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตรที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM ที่สภาวะ 37°C , 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดจากเห็ดหลินจือที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมงและทำการย่อยเซลล์เพื่อเตรียมนำไปทดสอบต่อไป

นำเซลล์มะเร็งที่ทดสอบสารสกัดข้างต้นมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที (Heraeus, Germany) เป็นเวลา 5 นาทีที่ 4°C ดูดสารละลายเก่าจนหมด ล้างด้วย PBS 1-2 ครั้ง ดำเนินการสกัด RNA ตามวิธีการสกัดของชุดสกัดสำเร็จรูป Roche (USA) ดำเนินการวัดปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธีการสังเคราะห์ของ SuperscriptTM II Reverse Transcriptase protocol (Invitrogen,

USA) ก่อนนำไปเป็นสารพันธุกรรมตั้งต้น (template) ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ MMP-2 (617 bp) และ MMP-9 (332 bp) mRNA ซึ่งลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่นำมาทดสอบคือ MMP-2 (sense); TTT TCT CGA ATC CAT GAT GG, MMP-2 (anti-sense); CTG GTG CAG CTC TCA TAT TT, MMP-9 (sense); CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC, MMP-9 (anti-sense); GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG และสารพันธุกรรมควบคุม (internal control) คือ β -globin (411 bp); sense; GAC CTT CAA CAC CCC AGC CA และ anti-sense; AGG CTG GAA GAG TGC CTC AG ในการทดสอบเริ่มจากการผสมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 250 และ 20 นาโนกรัม สำหรับปฏิกิริยาของ MMP และ β -globin gene ตามลำดับ ใน 1.5 มิลลิโมลาร์ MgCl_2 , 200 ไมโครโมลาร์ dNTPs, 10x PCR buffer, 10 พิกโตโมลาร์ของ primer แต่ละสาย และ 0.5U Taq polymerase และน้ำกลั่น และเริ่มกระบวนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่องเพิ่มจำนวน PCR (Eppendorf, Germany) ที่ 95°C , 5 นาที จากนั้นเริ่มโปรแกรมที่ 95°C เวลา 30 วินาที, 56°C สำหรับ MMP-9 และ 58°C สำหรับ MMP-2 เป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ดำเนินตามโปรแกรมซ้ำ 40 ครั้ง ขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นของกระบวนการเพิ่มจำนวนคือบ่มที่ 72°C เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์และแยกสาย PCR products แต่ละชนิดบน 1.5% agarose gel ด้วย gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และ densitometer (Syngene, England)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดและกลุ่มควบคุมที่มีได้ทดสอบกับสารสกัด โดยใช้ student's t-test ในการคำนวณค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (P -value) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลการทดลอง

จากการนำตัวอย่างแห้งของเห็ดหลินจือมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเมทานอลและน้ำ พบว่าสารสกัดที่ได้จากเมทานอลจะมีลักษณะค่อนข้างเหนียว เนื้อแน่น จับกันเป็นก้อน สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเฉพาะ ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจะมีลักษณะค่อนข้างร่วน สีน้ำตาล และมีกลิ่นเฉพาะคล้ายสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล

ผลของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

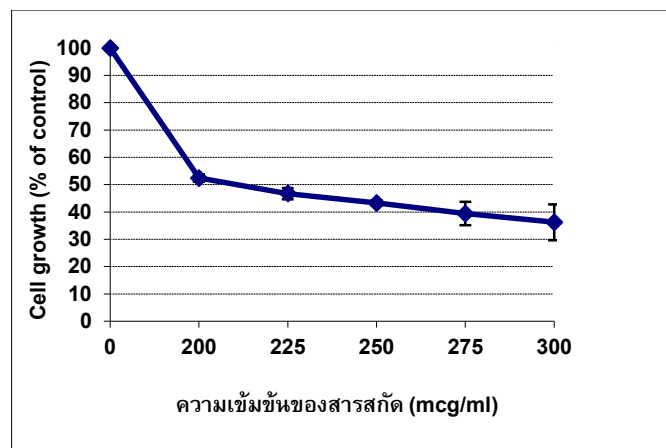
จากการนำสารสกัดจากเมทานอลและน้ำของเห็ดหลินจือที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากเมทานอลและน้ำที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) คือ $208.83 \pm 7.28 \mu\text{g/ml}$ และ $438.69 \pm 14.31 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1(A) และ 1(B) ตามลำดับ

ผลของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในการยับยั้งการเจริญ (growth inhibition) การยับยั้งการแทรกผ่านเมมเบรน (anti-invasion), และการยับยั้งการเคลื่อนที่ (anti-motility) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7

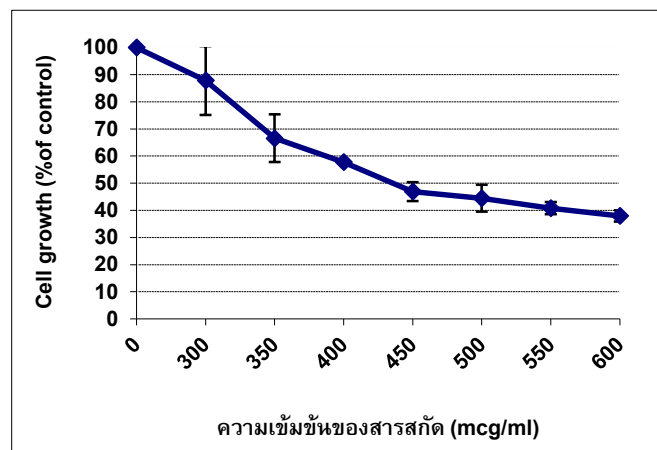
จากการทดสอบผลของสารสกัดของเห็ดหลินจือจากสารสกัดเมทานอลและน้ำต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์มะเร็งควบคู่กับการทดสอบการยับยั้งการแทรกผ่านและการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ พบว่าสารสกัดจากเมทานอลมีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมแบบ dose-dependent นั่นคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้น จะสามารถยับยั้งการเจริญได้เพิ่มขึ้น ในขณะที่สารสกัดจากน้ำจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงได้เพียงเล็กน้อย

จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญ การแทรกผ่านเมมเบรนและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากเมทานอลและน้ำสามารถยับยั้งการแทรกผ่านเมมเบรนและการเคลื่อนที่ของ MCF-7 เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งสารสกัดจากเมทานอลจะยับยั้งได้มากกว่าสารสกัดจากน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดของเห็ดหลินจือ ดังแสดงในรูปที่ 2

(A)

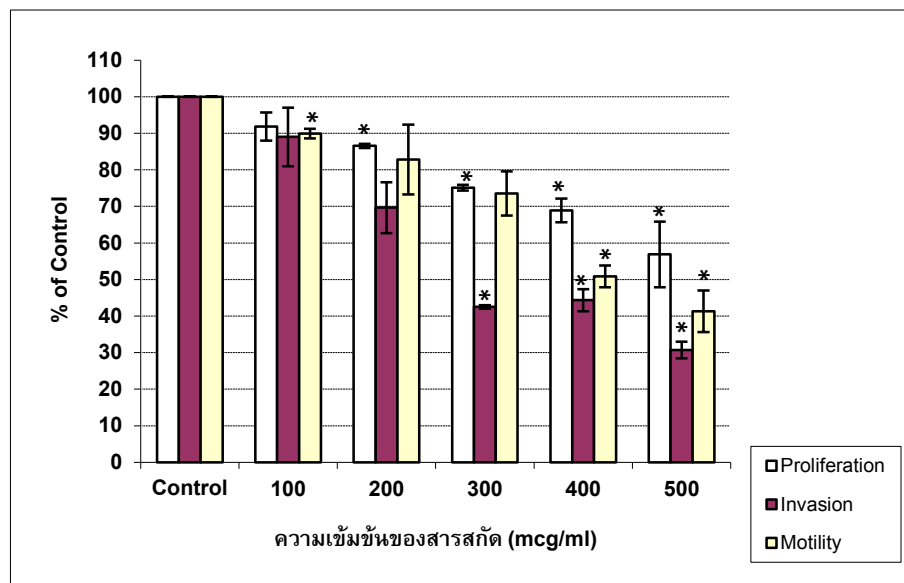


(B)

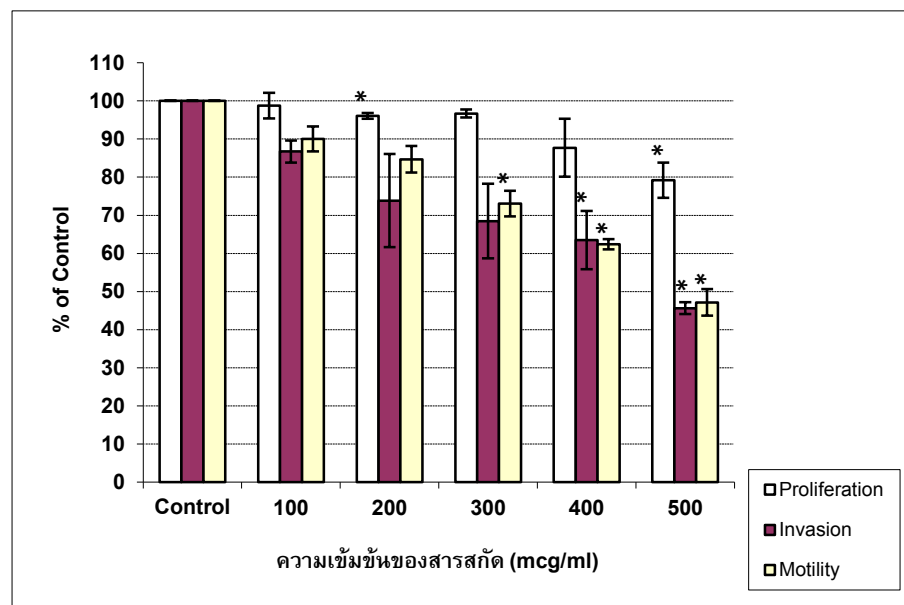


รูปที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือในตัวทำละลายเมทานอล (A) และน้ำ (B) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 96 ชั่วโมง

(A)



(B)



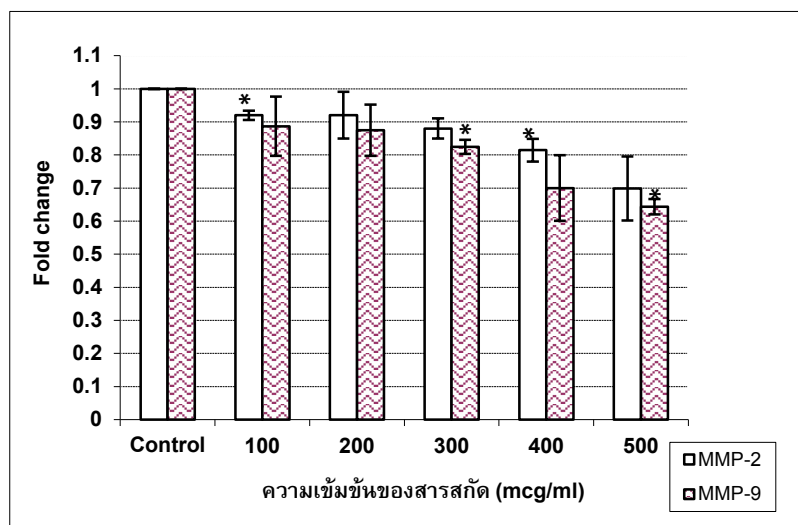
รูปที่ 2 ผลการทดสอบของสารสกัดจากเห็ดหลินจือจากตัวทำละลายเมทานอล (A) และ น้ำ (B) ต่อการยับยั้งการเจริญ (anti-proliferative effect), การยับยั้งการแทรกผ่าน (anti-invasion) และการยับยั้งการเคลื่อนที่(anti-motility) ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (* $P < 0.05$)

**ฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือต่อระดับการ
แสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 mRNA ของ
เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7**

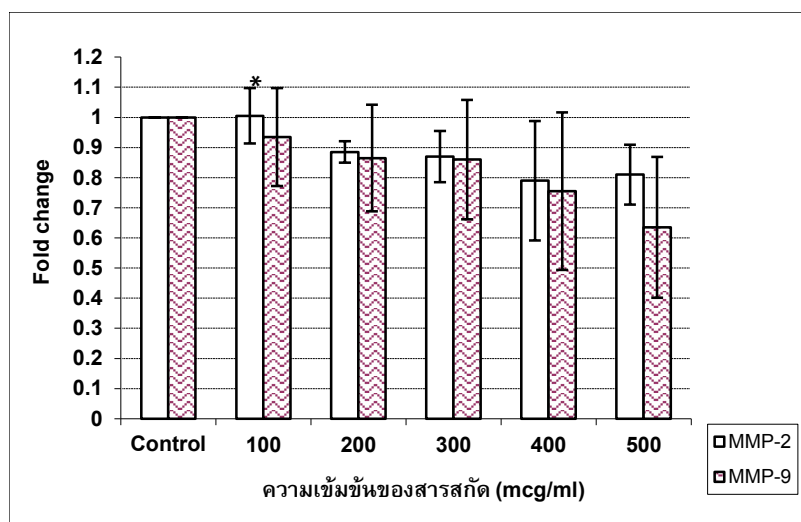
จากผลการศึกษา พบว่า สารสกัดจากเห็ด
หลินจือจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดสามารถลด
ระดับการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9
mRNA ในเซลล์ MCF-7 โดยระดับการแสดงออก

ของสารพันธุกรรมทั้งสองมีความสัมพันธ์กับ
ระดับความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent)
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสารสกัดจากเม
ทานอลและน้ำสามารถยับยั้งระดับการแสดงออก
ของ MMP-9 mRNA มากกว่า ระดับการแสดงออก
ของ MMP-2 mRNA ดังแสดงในรูปที่ 3

(A)



(B)



รูปที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือจากตัวทำละลายเมทานอล (A) และน้ำ (B) ต่อระดับการ
แสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 mRNA ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ($P < 0.05$)

สรุปและอภิปรายผล

เห็ดหลินจือ เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบันที่นำมาใช้ในการบำรุงสุขภาพ บำบัดโรคตามตำรับแพทย์แผนไทยและแพทย์แผนจีน เนื่องจากมีสรรพคุณทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง และผลจากการศึกษาวิจัยจำนวนมาก พบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือช่วยลดปริมาณไขมันและน้ำตาลในเลือด เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เป็นต้น¹¹⁻¹² นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง¹⁸⁻²¹

จากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 พบว่า สารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์แรงกว่าสารสกัดจากน้ำ โดยมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น $208.83 \pm 7.28 \mu\text{g/ml}$ และ $438.69 \pm 14.31 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณหรือสารเคมีของเห็ดหลินจือที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ก็อาจมีผลต่อความพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายหรือยับยั้งการเจริญ ซึ่งสารเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญอาจจะสกัดได้ดีจากตัวทำละลายเมทานอลมากกว่าสกัดด้วยน้ำ^{13, 17-20, 26} และกรรมวิธีที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน อาจมีผลต่อกับสารเคมีที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือ ส่งผลให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน^{19-20, 26}

สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือต่อการยับยั้งการแทรกผ่านเมมเบรน (anti-invasion) และการยับยั้งการเคลื่อนที่ (anti-motility) ผ่าน extracellular matrix membrane (ECM) ที่เคลือบและไม่เคลือบด้วย Matrigel ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นแบบจำลองการศึกษากระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจาย (metastasis) ของ

เซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลองนั้น พบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือในตัวทำละลายทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ (dose-dependent) ซึ่งสารสกัดจากเมทานอล จะออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำเช่นเดียวกับการทดสอบแรก โดยการทดสอบศักยภาพของสารสกัดต่อการแทรกผ่านเมมเบรนและการเคลื่อนที่ของเซลล์นั้น ต้องศึกษาควบคู่กับการประเมินการเจริญของเซลล์มะเร็งในช่วงเวลาเดียวกัน นั่นคือ 24 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเมทานอลถูกยับยั้งการเจริญมากกว่าสารสกัดจากน้ำ ดังนั้นจึงคาดว่าความสามารถของการยับยั้งการแทรกตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ในสารสกัดจากเมทานอลที่เพิ่มขึ้นและยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำ อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณเซลล์ที่ลดลง ในขณะที่สารสกัดจากน้ำมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ 24 ชั่วโมงลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ผลการยับยั้งกระบวนการแพร่กระจายทั้งสองวิธีที่ 400 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าการยับยั้งที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับผลการทดสอบด้วยสารสกัดจากเมทานอล และมีผลการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการยับยั้งการแทรกผ่านเมมเบรน หรือการเคลื่อนที่ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ผ่าน ECM น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และอาจส่งผลให้ประเมินการนำไปใช้ในทางพรีคลินิก (Preclinic) อื่นๆ

ในการประเมินศักยภาพของสารสกัดจากธรรมชาติหรือยาต่อการแสดงออกของสาร

พันธุกรรมหรือยีนที่มีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของ ECM ก็มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังเซลล์เนื้อเยื่อข้างเคียงหรืออวัยวะอื่นๆ³⁻⁵ ซึ่ง *Matrix metalloproteinase (MMPs) gene* เป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง¹⁹⁻²⁰ โดยเฉพาะกลไกการทำงานของสารพันธุกรรมทั้ง 2 ชนิดคือ MMP-2 และ MMP-9 ที่สร้างเอนไซม์ในการย่อยสลาย Type IV collagen ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของ basement membrane²¹ จากผลการทดสอบใน MCF-7 พบว่า สารสกัดจากเมทานอลและน้ำของเห็ดหลินจือสามารถลดระดับการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 mRNA ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกัน และผลการยับยั้งการแสดงออกของ MMP-9 mRNA มากกว่า MMP-2 mRNA ทั้งนี้อาจเพราะ *MMP-9 gene* จะไวต่อการถูกกระตุ้นหรือถูกยับยั้งด้วยปัจจัยจากภายนอก เช่น สารเคมีหรือการกระตุ้นทางกายภาพในช่วง transcription level มากกว่า *MMP-2 gene* ที่มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีในช่วง post-transcription level^{19-21,27} ดังนั้นช่วงระยะเวลาของการศึกษาต่อการแสดงออกของสารพันธุกรรมก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเห็ดหลินจือมีศักยภาพในการต้านการเจริญและด้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ในระดับหลอดทดลอง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อยอดในการศึกษาทางพรีคลินิกหรือทางเภสัชวิทยาอื่นๆต่อไป รวมทั้งการทดสอบทางพิษวิทยาของสารสกัดจากเห็ดหลินจือเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูล

เบื้องต้นและแนวทางในการพัฒนาหรือสารบำบัดมะเร็ง สำหรับการบำบัดหรือเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. พรทิพา พิชชา ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 สำหรับใช้ในการวิจัยคำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารสกัด งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Vital statistic, Bureau of Health Policy and Statistics A.D. 2015; 27-78. Available at http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/health_statistic2558.pdf. Accessed July 3, 2017.
2. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available at <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Accessed April 17, 2015.
3. Cooper GM. The Cell: A molecular approach 2nd ed. 2000; 609-40.
4. Elisa CW, Roddrigo FC, Lance AL. General mechanism of metastasis, *Cancer Supplement* 1997;80:1529-31.
5. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003;3:55-63.

6. Page-McCaw A, Ewald AJ, Wer Z. Matrix metalloproteinase and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.
7. Surh Y-J. Cancer chemopreventive with dietary phytochemical, *Nat Rev Cancer* 2003;10:768-80.
8. Sekiya M, Funabashi H, Tsukamura K, *et al.* Intracellular signaling in the induction of apoptosis in a human breast cancer cell line by water extract of Makabu. *Int J Clin Oncol* 2005;10:122-6.
9. Gu S, Pei J. Innovating Chinese herbal medicine: From traditional health practice to scientific drug discovery. *Front Pharmacol* 2017; 16:381.
10. Pang JS, Yen JH, Wu HT, *et al.* Gallic acid inhibited matrix invasion and AP-1/ETS-1-mediated MMP-1 transcription in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1354.
11. Silva D. Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Mini-Rev Med Chem* 2004; 4: 873-9.
12. Silva D. *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leuk Res* 2006;30:767-8.
13. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, *et al.* *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). In Benzie IFF and Wachtel-Galor S eds. Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects, 2nd ed: CRC Press/Taylor&Francis, 2011
13. Hsu HY, Hua KF, Lin CC, *et al.* Extract of Reishi polysaccharides induces Cytochrome expression via TLR-4 modulated protein kinase signaling pathways. *J Immunol* 2004;173:5898-9.
14. Wong YY, Khoo KH, Chen ST, *et al.* Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharide: functional and proteomic analysis of fructose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem* 2002;10:1057-62.
15. Ajith TA, Janardhanan KK. Indian medicine mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr* 2007;40:157-62.
16. Hu H, Ahn NS, Yang X, *et al.* *Ganoderma lucidum* extract induce cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* 2002;102:250-3.
17. Cao QZ, Lin ZB. *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sci* 2006;78:1457-63.
18. Liang ZE, Yi YJ, Guo YT, *et al.* Inhibition of migration and induction of apoptosis in LoVo human colon cancer cells by polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Mol Med Rep* 2015;12: 7629-36.
19. Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. *Ganoderma* Acid Me inhibits tumor invasion through down-regulating matrix metalloproteinase 2/9 gene expression. *J Pharmacol Sci* 2008;108:212-6.

20. Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. Ganoderma acid T inhibits tumor invasion in vitro and in vivo through of MMP expression. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 150-63.
21. Weng CJ, Chau CF, Hsieh YS, *et al.* Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF- κ B and AP-1. *Carcinogenesis* 2008;29:147-56.
22. Oyama VI, Eagle H. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent. *Proc Soc Exp Med* 1959;91:305-7.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
24. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 2003;37:961-9.
25. Jung S, Peak Y-W, Moon K-S, *et al.* Expression of *Nm23* in gliomas and its effects on migration and invasion in vitro. *Anticancer Res* 2006;26:49-58.
26. Reis FS, Lima RT, Morales P, *et al.* Vasconcelos MH. Methanolic extract of *Ganoderma lucidum* induce autophagy of AGS human gastric tumor cells. *Molecules* 2015;20: 17852-82.
27. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, *et al.* Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer* 2001;93:507-15.