

บทความวิจัย (Research Article)

ผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ

พนิตพร เจ็นคำ^{1,2}, กรรณิกา วิบูลกุล^{1,2}, กัญญาลักษณ์ จันทะเกี³, อภิรักษ์ กาตาสาย², ชลธิดา เทพหินลับ^{1,2}, กฤษณะ คู่เทียม^{1,4}, นิจิตติยา สุวรรณสม^{1,2}, อุษรา ปัญญา³ และ จุฑามาศ เทพมาลี^{1,2*}

Effect of aqueous extract from *cordyceps militaris* on the immune cell activation to kill breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines

Phanitaporn Jenkham^{1,2}, Kannika Wibunkul^{1,2}, Kanyaluck Jantakee³, Apirak Katasai², Chonthida Thephinlap^{1,2}, Krissana Khoothiam^{1,4}, Nittiya Suwannasom^{1,2}, Aussara Panya³ and Chutamas Thepmalee^{1,2*}

¹ Unit of excellent of Research and development for cancer therapy, University of Phayao, Phayao, 56000

² Division of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000

³ Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

⁴ Division of Microbiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000

* Correspondence author: th.chutamas@gmail.com, chutamas.th@up.ac.th

Naresuan Phayao J. 2023;16(1): 30-45.

Received; 2 October 2022; Revised: 10 April 2023; Accepted: 30 April 2023

บทคัดย่อ

เห็ดถั่งเช่าสีทองนิยมนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรบำรุงสุขภาพและรักษาโรคต่าง ๆ เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ไดเซปินในสารสกัดด้วย Ultra-performance liquid chromatography พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งหลังสกัด ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 และ MDA-MB-231) เซลล์มะเร็งตับ (Huh-7 และ SNU449) และ PBMCs ด้วย PrestoBlue™ cell viability reagent พบว่า สารสกัดไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ (IC₅₀ มากกว่า 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) หลังบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่สารสกัดมีความเป็นพิษกับ non-adherent cells ที่เวลา 48 ชั่วโมง (IC₅₀ เท่ากับ 354.2 ± 4.41) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการกระตุ้น non-adherent cells ฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ โดยตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งด้วยการย้อมสีคริสตัลไวโอเลต พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ non-adherent cells ที่อัตราส่วน 20:1 ให้ฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7, MDA-MB-

¹ โครงการจัดตั้งหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ: ด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการรักษาโรคมะเร็ง มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

⁴ สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

231, Huh และ SNU-449 ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มร่วมกับสารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่มีเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 61.89 ± 10.86 ($p < 0.0001$) ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 เท่ากับ 70.26 ± 8.29 ($p < 0.0001$) ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 เท่ากับ 62.82 ± 7.97 ($p < 0.0001$) และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ SNU-449 เท่ากับ 66.06 ± 1.68 ($p < 0.0001$) จากการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นเห็ดถั่งเช่าสีทองอาจจะถูกพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันในคนสุขภาพดี หรือใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้

คำสำคัญ: สารสกัดน้ำ, เห็ดถั่งเช่าสีทอง, เซลล์ภูมิคุ้มกัน, เซลล์มะเร็ง

Abstract

Cordyceps militaris is a medicinal herb for health benefits and the treatment of various diseases because it has many biological effects. However, the result of the aqueous extract from *C. militaris* at a temperature of 45°C for 3 hours on the activation of immune cells isolated from humans to destroy cancer cells has not yet been studied. In this study, the amount of cordycepin in the extract was quantified using Ultra-performance liquid chromatography (UPLC). The cordycepin content in the sample was 3.85 mg/g dry weight after extraction. The toxicities of the extracts against breast cancer cell line (MCF-7 and MDA-MB-231), hepatocellular carcinoma (Huh-7 and SNU-449), and effector immune cells (PBMCs and non-adherent cells) were evaluated using PrestoBlue™ cell viability reagent. The results showed that the extract did not have toxicities against cancer cells and PBMCs ($IC_{50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$) after incubation for 24 and 48 hours, while the extract affected the cell viability of non-adherent cells ($IC_{50} = 354.2 \pm 4.41 \mu\text{g/mL}$). The effects of the extract at 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ on the activation of non-adherent cells to kill cancer cells were examined by staining the remaining cancer cells with crystal violet dye. At the effector to target ratio of 20:1, it was found that the extracts at 100 $\mu\text{g/mL}$ significantly increased the efficacy of non-adherent cells in killing MCF-7, MDA-MB-231, Huh-7, and SNU-449 compared to the group treated with extract at 100 $\mu\text{g/mL}$ and without immune cells. The percentage of cell viability of MCF-7 cells was 61.89 ± 10.86 ($p < 0.0001$), while for MDA-MB-231 cells, it was 70.26 ± 8.29 ($p < 0.0001$). Huh-7 cells showed a percentage of cell viability of 62.82 ± 7.97 ($p < 0.0001$), and SNU-449 cells had a percentage of cell viability of 66.06 ± 1.68 ($p < 0.0001$). It was concluded that the aqueous extract from *C. militaris* could activate an effector immune cell to kill cancer cells. Therefore, *C. militaris* might be developed as a natural product to modulate the immune system in healthy people or applied in cancer patients to activate the immune system to fight cancer cells.

Keywords: Aqueous extract, *Cordyceps militaris*, Effector immune cells, Cancer cells

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเชื้อราที่พบว่าเป็นปรสิตของแมลง (Entomofungus) และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes Ashraf, Elkhailifa [1] เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยาในตำราแพทย์แผนจีนมาเป็นเวลากว่าพันปี ซึ่งในปัจจุบัน

ได้มีผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเห็ดถั่งเช่าสีทองที่คนนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในหลายรูปแบบต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น ผงบดเห็ดถั่งเช่า ถังเช่าอบแห้ง แคปซูลเห็ดถั่งเช่าสีทอง และสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่า โดยสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางยาที่มีหลายชนิดที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง เช่น สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) อะดีโนซีน (adenosine)

กรดคอร์ไดเซปิก (cordycepic acid) สารกลุ่มคอร์ดีเซปัสเตอรอล (cordyceps sterol) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ทำให้เห็ดถึงเชื้อราสีทองมีฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย ต้านการมะเร็ง และปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น [2-3]

การศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดเห็ดถ่านอลจากเห็ดถึงเชื้อราสีทองในการปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกันพบว่า ในหนูที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง สารสกัดเห็ดถึงเชื้อราสีทองสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวในม้าม เพิ่มระดับการสร้างไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-2 (IL-2), อินเตอร์ลิวคิน-12 (IL-12), อินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (IFN- γ) และ ทีเอ็นเอฟ-แอลฟา (TNF- α) มากขึ้น และยังกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์เอ็น-เค (NK cell) ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [4]

ในการศึกษาเปรียบเทียบเห็ดถึงเชื้อราสีทอง 2 สายพันธุ์ คือ สารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเชื้อราสีทองปกติกับเห็ดถึงเชื้อราสีทองที่อุดมไปด้วยสารคอร์ไดเซปิกในหนูทดลองที่มีก่อนมะเร็งเต้านม พบว่า สารสกัดน้ำที่อุดมภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จาก fruiting bodies สายพันธุ์ที่อุดมไปด้วยสารคอร์ไดเซปิกได้ปริมาณคอร์ไดเซปิกเท่ากับ 7.42 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง สามารถปรับระบบภูมิคุ้มกัน โดยลดระดับการสร้างไซโตไคน์ (cytokine) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-2 และทีจีเอฟ-เบต้า (TGF- β) และลดการทำงานของทีเซลล์ควบคุม (regulatory T-cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้มากขึ้น ทำให้ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลง และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [5] นอกจากนี้สารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเชื้อราสีทอง (hydrolytic extract) จาก mycelium สด สกัดที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ด้วยวิธี ultrasonic extraction ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปิกและอะดีโนซีนเท่ากับ 11.75 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ สามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจของหนูให้จับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น [6-7] การศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดน้ำเห็ดถึงเชื้อราสีทองด้วยวิธี high-pressure

processing (HPP) หรือ HFCM โดยใช้ Ultrasonic power 680 วัตต์ เวลาในการสกัด 4.5 นาที ให้ปริมาณโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 383.16 ± 17.09 คอร์ไดเซปิกเท่ากับ 73.45 ± 3.45 และฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 119.06 ± 6.71 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันและความเป็นพิษของสารสกัดในหนูทดลอง พบว่า HFCM สามารถกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ (macrophage) สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเพิ่มระดับการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-2 และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมาที่มาจากทีเซลล์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม และสารสกัดไม่เป็นพิษต่อไตและตับของหนูทดลอง [8]

นอกจากนี้การบริโภคสารสกัดเห็ดถึงเชื้อราสีหิมะ (*Paecilomyces hepialid*) บรรจุแคปซูลในอาสาสมัครสุขภาพดีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีความปลอดภัยและช่วยเสริมภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์เอ็น-เคและกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ที่จำเป็นสำหรับการต้านมะเร็ง [9] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดถึงเชื้อราสีทองในการปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผ่านการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันและการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเชื้อราสีทองในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดน้ำที่จากเห็ดถึงเชื้อราสีทอง สกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่แยกได้จากมนุษย์ในการฆ่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดร้ายแรงชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และเป็นชนิดที่พบว่าเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ของคนไทยและทั่วโลก [10] โดยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถึงเชื้อราสีทอง อาจจะนำไปสู่การพัฒนาเห็ดถึงเชื้อราสีทองเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันในคนสุขภาพดี หรือใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคต่าง ๆ ที่มีความผิดปกติกับระบบภูมิคุ้มกันได้

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่า

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองแห้งบดละเอียด (บริษัท ภักร์ทิลา ไทย เฮอรัเบิล จำกัด จ.ลำปาง ประเทศไทย)หนัก 50 กรัม มาแช่ในน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำซ้ำอีก 1 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดปริมาตร 1 ลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 และนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) [11-12] หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาคำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%yield)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินด้วย

เทคนิค Ultra-performance liquid

chromatography (UPLC)

เตรียมสารคอร์ไดเซปินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการฉีดสารปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง UPLC โดยใช้คอลัมน์แบบผัสนกลับ C18 (reverse phase column) ใช้เมทานอลและน้ำกลั่นเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในเวลา 40 นาที โดยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินในตัวอยางสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับชนิด Huh-7 และ SNU449 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มียาต้านแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาต้านเชื้อราความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10 เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

การแยกเซลล์ภูมิคุ้มกันจากเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใส่ตัวอย่างเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งเฮพาริน แล้วทำการปั่นแยกเซลล์ภูมิคุ้มกัน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) โดยใช้ Lymphoprep™ solution แล้วนำเซลล์ภูมิคุ้มกัน PBMCs ที่แยกได้มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกกลุ่มเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ลอย (non-adherent cells) ซึ่งประกอบด้วย ทีเซลล์ (T cells) บีเซลล์ (B cells) เซลล์เอ็นเค (NK cells) และเซลล์เอ็นเคที (NKT cells) ซึ่งเป็น effector immune cells ออกไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงอันใหม่ และทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยพะเยา รหัสโครงการ UP-HEC 1.3/015/64

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

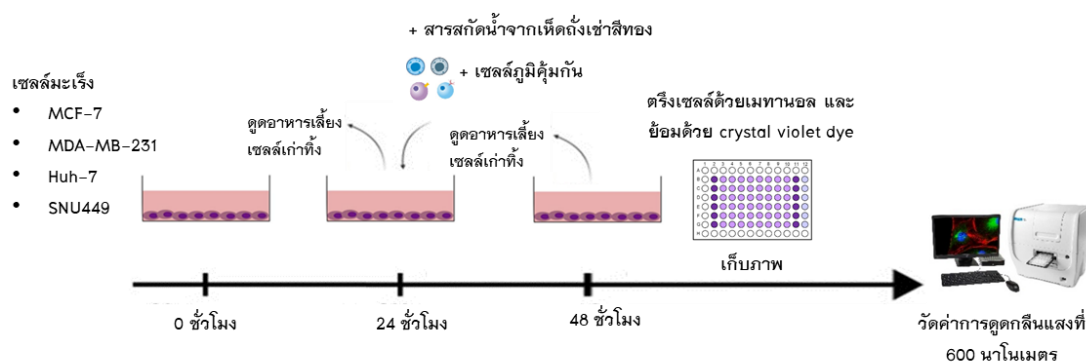
เพาะเลี้ยงมะเร็งและเซลล์ภูมิคุ้มกันในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม และเซลล์ภูมิคุ้มกันจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วเติมสารละลายเจือจางของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองตามความเข้มข้นดังนี้ 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์ไปบ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำถาดหลุมมาเติม PrestoBlue™ cell viability reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมเขย่าเบาๆ ให้สารละลายกระจายทั่วเซลล์ บ่มทิ้งไว้ในตู้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 นาโนเมตร และนำค่ามาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration; IC₅₀) และค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) โดยใช้โปรแกรม

GraphPad Prism Version 8.0 ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับชนิด Huh-7 และ SNU449 ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) จำนวน 3×10^4 เซลล์ ปุ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วใส่เซลล์ภูมิคุ้มกัน non-adherent cells ในอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 5 ต่อ 1 (5:1), 10 ต่อ 1 (10:1) และ 20 ต่อ 1 (20:1) ปุ่มร่วมกับสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเข้าสีทองที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปุ่มทิ้งไว้เป็นเวลา

24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง และเติร์งเซลล์ด้วยเมทานอลที่เย็นปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 45 นาที จากนั้นดูดเมทานอลทิ้ง แล้วเติมสารละลายคริสตัลไวโอเลตร้อยละ 0.5 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 45 นาที เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลายคริสตัลไวโอเลตทิ้ง นำถาดหลุมไปล้างผ่านน้ำสะอาดและผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเก็บภาพผลการทดลองด้วยกล้องถ่ายภาพ และละลายตะกอนสีต่อด้วยสารละลายกรดอะซิติกปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 1 และคำนวณค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (triplicate)



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

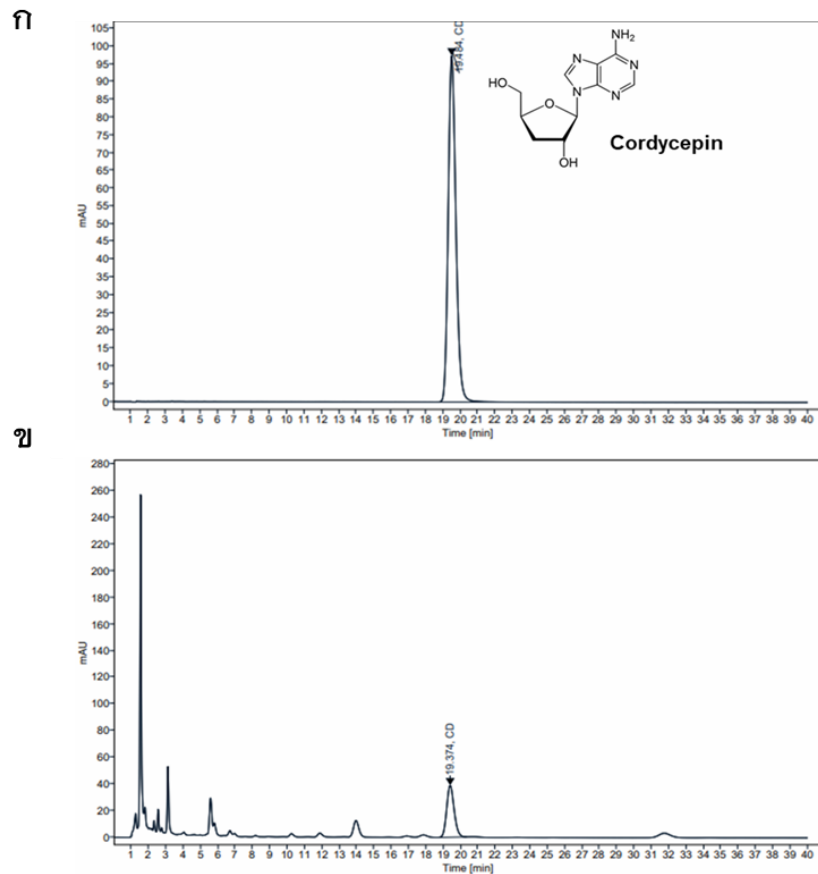
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Mean $\pm$ standard error of mean (SEM) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองโดยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) หรือ two-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Turkey's multiple comparisons test ค่า p -value < 0.05 จะแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูล การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 8.0

ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของสารคอร์ไดเซปินในสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเข้าสีทองด้วยเทคนิค UPLC

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเข้าสีทอง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินด้วยเทคนิค UPLC แสดงดังรูปที่ 2 พบว่า มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่อน้ำหนักแห้งหลังสกัดเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่อน้ำหนักแห้งก่อนสกัดเท่ากับ 2.09 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงดังตารางที่ 1 และจากโครมาโตแกรมในรูปที่ 1x แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเข้าสีทองยังมีสารอื่นๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย



รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของ (ก) สารคอร์ไดเซปินมาตรฐานและ
(ข) ตัวอย่างสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเช่าสีทองที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักและปริมาณของสารคอร์ไดเซปินในสารสกัดน้ำจากเห็ดถึงเช่าสีทอง

ชนิดของ สารสกัด	น้ำหนักแห้ง ก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง หลังสกัด (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต ของสารสกัด	ปริมาณสารคอร์ได เซปินต่อน้ำหนัก แห้งหลังสกัด (มิลลิกรัม/กรัม)	ปริมาณสารคอร์ได เซปินต่อน้ำหนัก แห้งก่อนสกัด (มิลลิกรัม/กรัม)
สารสกัดน้ำ จากเห็ด ถึงเช่าสีทอง	50	27.19	54.38	3.85	2.09

ผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย PrestoBlue™ cell viability reagent

ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับ ชนิด Huh-7 และ SNU449 และเซลล์ภูมิคุ้มกัน คือ PBMCs และ non-adherent cells หลังจากบ่มกับสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วย PrestoBlue™ cell viability reagent พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อเซลล์

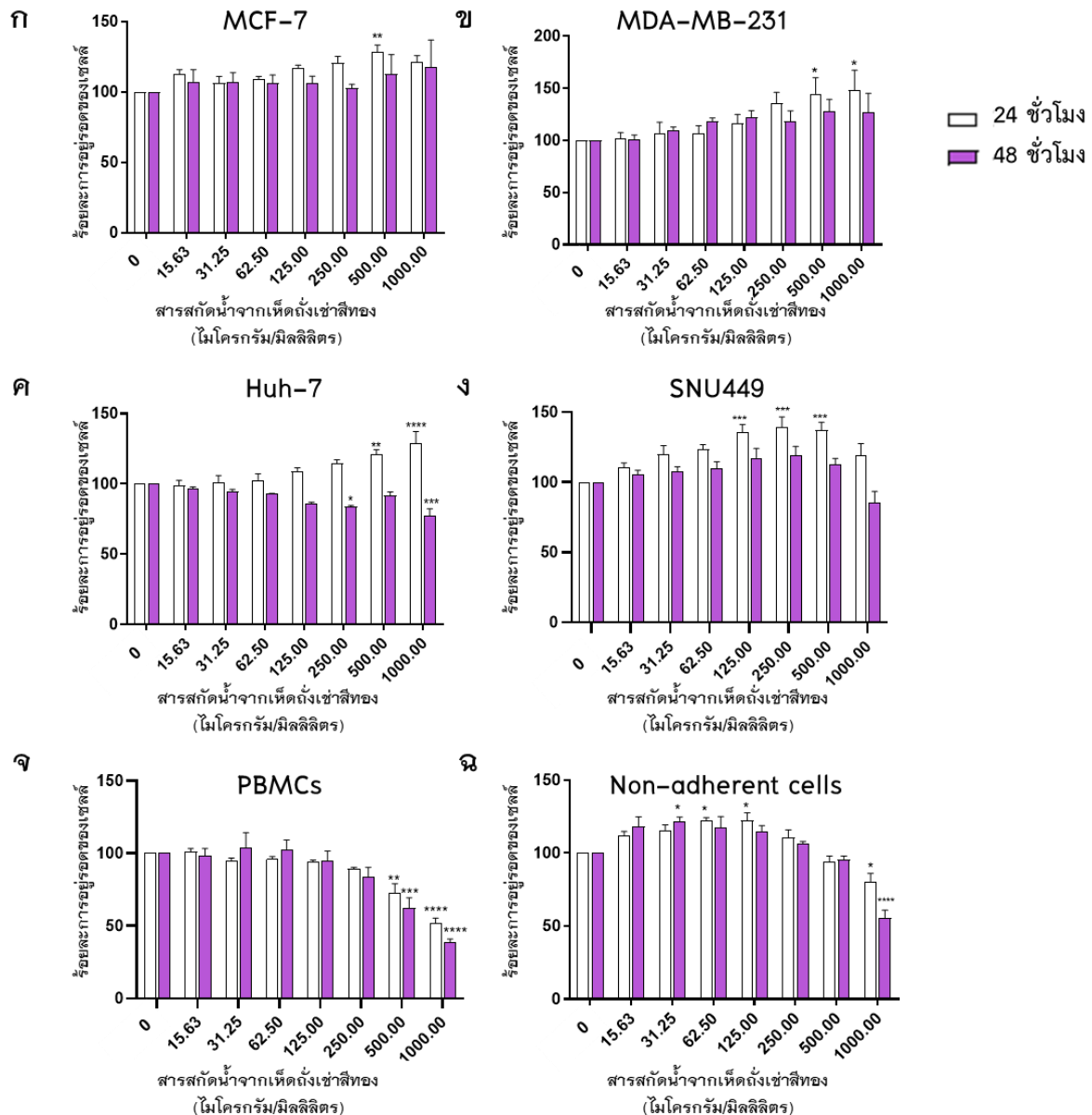
เพาะเลี้ยงมะเร็งทุกชนิด และ PBMCs ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่ามากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อ non-adherent cells ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง คือ มากกว่า 1,000 และ 354.2 ± 4.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ดังตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ และเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด PBMCs แต่มีความเป็นพิษกับ non-adherent cells เมื่อบ่มสารสกัดไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในเซลล์ต่าง ๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วย PrestoBlue™ cell viability reagent

ชนิดเซลล์	สารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (IC_{50}) (ไมโครกรัม/มิลลิเมตร)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
MCF-7	>1000	>1000
MDA-MB-231	>1000	>1000
Huh-7	>1000	>1000
Snu449	>1000	>1000
PBMC	>1000	>1000
Non-adherent cells	>1000	354.2 ± 4.41

และนำค่าที่ได้มาแสดงให้อยู่ในรูปร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าการอยู่รอดของเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่าน้อยกว่า 24 ชั่วโมง จากนั้นในการทดสอบต่อไปจะ

เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งและเซลล์ภูมิคุ้มกัน



รูปที่ 3 แสดงร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม (ก) MCF-7 และ (ข) MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับ (ค) Huh-7 และ (ง) SNU449 และเซลล์ภูมิคุ้มกัน (จ) PBMCs และ (ฉ) non-adherent cells หลังจากบ่มทิ้งไว้กับสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย PrestoBlue™ cell viability reagent และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้บ่มกับสารสกัด)

ผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งตับ Huh-7 และ SNU-449 กับเซลล์ภูมิคุ้มกัน non-adherent cells ที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 5 ต่อ 1

(5:1), 10 ต่อ 1 (10:1) และ 20 ต่อ 1 (20:1) บ่มร่วมกับสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์มะเร็งที่เหลือเกาะในภาดหลุมด้วย crystal violet dye ละลายตะกอนสี วัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ภูมิคุ้มกันหรือสารสกัดเพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อการตายของเซลล์ MCF-7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 หลังจากบ่มร่วมกับ non-adherent cells ที่ 5:1, 10:1 และ 20:1 เท่ากับ 86.20 ± 6.00 , 83.73 ± 9.52 และ 77.74 ± 8.60 ตามลำดับ ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 หลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 101.6 ± 8.20 , 100.3 ± 8.30 และ 100.20 ± 5.31 ตามลำดับ และเมื่อบ่ม MCF-7 ร่วมกับสารสกัดและ non-adherent cells พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 73.71 ± 13.31 และ 70.17 ± 16.08 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 70.90 ± 12.51 และ 63.19 ± 11.57 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว สารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 5:1, 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MCF-7 เท่ากับ 76.29 ± 13.27 , 68.25 ± 11.31 และ 61.89 ± 10.86 ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $p < 0.01$ และ $p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว แสดงดังรูปที่ 4ก

ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันหรือสารสกัดเพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 หลังจากบ่มร่วมกับ non-adherent cells ที่ 5:1, 10 10:1 และ 20:1 เท่ากับ 93.00 ± 4.89 , 88.75 ± 5.74 และ 83.00 ± 3.92 ตามลำดับ ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 หลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 101.4 ± 1.75 ,

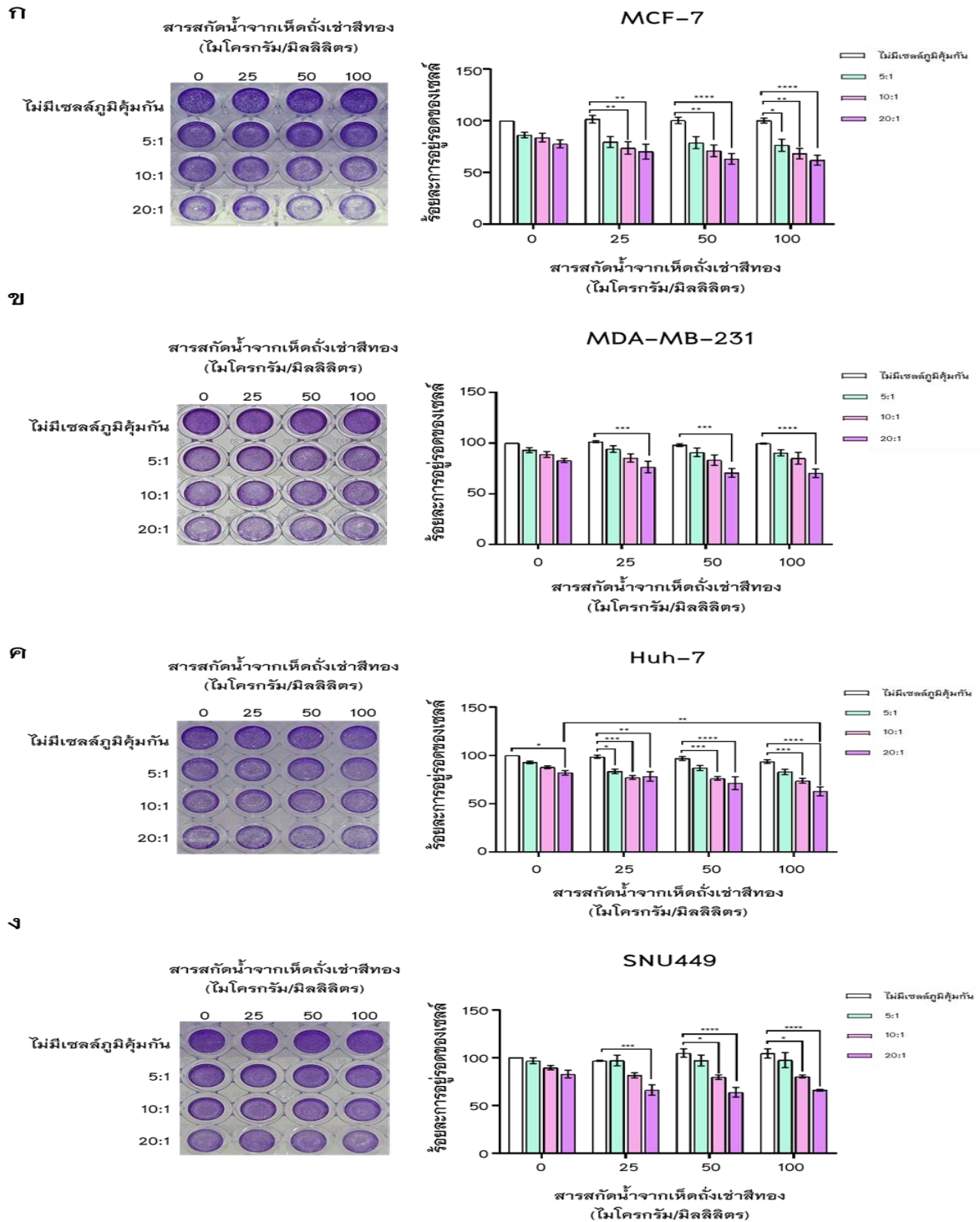
97.97 ± 2.64 และ 99.59 ± 1.17 ตามลำดับ และเมื่อบ่ม MDA-MB-231 ร่วมกับสารสกัดและ non-adherent cells พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ MDA-MB-231 เท่ากับ 76.41 ± 11.37 , 70.67 ± 8.69 และ 70.26 ± 8.29 ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว แสดงดังรูปที่ 4ข จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีผลในการกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกันฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งแนวโน้มการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มากขึ้น จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ใช้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า MCF-7 เป็น non-triple negative breast cancer (TNBC) จะมีความไวต่อการตายมากกว่า MDA-MB-231 ซึ่งเป็น TNBC

ในเซลล์มะเร็งตับ Huh-7 ผลการทดลองพบว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ 5:1 และ 10:1 หรือสารสกัดเพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 หลังจากบ่มร่วมกับ non-adherent cells ที่ 5:1 และ 10:1 เท่ากับ 92.75 ± 2.87 และ 87.80 ± 3.35 แต่ที่ 20:1 ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 เท่ากับ 82.00 ± 4.00 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 หลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 98.58 ± 2.95 , 93.32 ± 7.47 และ 93.69 ± 3.28 ตามลำดับ และเมื่อบ่ม Huh-7 ร่วมกับสารสกัดและ non-adherent cells พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 5:1, 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 เท่ากับ 83.45 ± 4.71 , 77.24 ± 4.623 และ 78.28 ± 8.40 ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $p < 0.001$ และ $p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7

เท่ากับ 76.26 ± 4.29 และ 71.27 ± 11.49 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ และ $p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว สารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 เท่ากับ 73.78 ± 5.78 และ 62.82 ± 7.97 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ และ $p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว ในอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็ง Huh-7 เท่ากับ 20:1 บ่มกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 ที่ลดลงกว่าเมื่อเปรียบเทียบการสภาวะที่ไม่บ่มกับสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงดังรูปที่ 4ค

ในเซลล์มะเร็งตับ SNU-449 พบว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันหรือสารสกัดเพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ SNU-449 หลังจากบ่มร่วมกับ non-adherent cells ที่ 5:1, 10 10:1 และ 20:1 เท่ากับ 97.00 ± 5.20 , 89.67 ± 4.04 และ 83.00 ± 7.00 ตามลำดับ ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ SNU-449 หลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เท่ากับ 96.99 ± 1.05 , 105.00 ± 7.56 และ 104.6 ± 8.41 ตามลำดับ และเมื่อบ่ม SNU-449 ร่วมกับสารสกัดและ non-adherent cells พบว่าสารสกัด

ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ SNU-449 เท่ากับ 66.33 ± 9.43 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และอัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 10:1 และ 20:1 ให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ SNU-449 เท่ากับ 79.76 ± 4.10 และ 64.01 ± 8.79 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ และ $p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับบ่มกับสารสกัดเพียงอย่างเดียว แสดงดังรูปที่ 4ง ในทำนองเดียวกัน จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีผลในการกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกันฆ่าเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งแนวโน้มการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มากขึ้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ใช้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า Huh-7 เป็นเซลล์ชนิด well-differentiated cells จะมีความไวต่อการตายมากกว่า SNU-449 ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด poorly-differentiated cells



รูปที่ 4 แสดงร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม (ก) MCF-7 และ (ข) MDA-MB-231) เซลล์มะเร็งตับ (ค) Huh-7 และ (ง) SNU449 หลังจากบ่มทิ้งไว้กับเซลล์ภูมิคุ้มกัน (non-adherent cells) จากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 3-5 คน ที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ 5 ต่อ 1 (5:1), 10 ต่อ 1 (10:1) และ 20 ต่อ 1 (20:1) และ สารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ความเข้มข้นต่าง 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ ด้วยสียคริสตัลไวโอเลต และบันทึกภาพ จากนั้นละลายตะกอนด้วยกรดอะซิติก วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

วิจารณ์

เห็ดถั่งเช่าจัดอยู่ในกลุ่มของเห็ดเป็นยา (medicinal mushroom) มีประวัติในการใช้งานทางการแพทย์แผนโบราณของจีนมาเป็นเวลายาวนานหลายร้อยปี [2] ในปัจจุบันเห็ดถั่งเช่าสีทองได้รับความนิยมจากกลุ่มผู้บริโภคเป็นอย่างมาก จึงได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบต่าง ๆ ออกมาอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เห็ดชนิดนี้มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างสูง เห็ดชนิดนี้มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ คอไรโดเซปิน อะดีโนซีน และโพลีแซ็กคาไรด์ เป็นต้น ทำให้เห็ดถั่งเช่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และปรับสมดุลการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน [2-3] อย่างไรก็ตามผลของเห็ดถั่งเช่าในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่แยกจากมนุษย์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่แยกได้จากเลือดของมนุษย์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดง และตับ ซึ่งเป็นชนิดมะเร็งที่พบมากและเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ในประเทศไทยและทั่วโลก [10]

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารคอไรโดเซปินซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการมะเร็ง และฤทธิ์ในการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน [2-3] โดยในสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง สกัดที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งหลังสกัด 1 กรัม และจากผลโครมาโตแกรมของ UPLC ของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสดงให้เห็นว่า นอกจากคอไรโดเซปินแล้ว ในสารสกัดยังมีสารสำคัญอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองจาก fruiting body แบบแห้ง ด้วยวิธีการสกัดต่าง ๆ ได้แก่ การสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล การสกัดด้วยอัลตราโซนิก และการใช้หลายวิธีร่วมกัน พบว่าวิธีที่เหมาะสมคือการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ร่วมกับการใช้อัลตราโซนิก ทำให้ได้

ปริมาณสารคอไรโดเซปินเท่ากับ 9.559 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งหลังสกัด 1 กรัม ซึ่งได้ปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยน้ำเพียงวิธีการเดียว[13] ในการศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองจาก fruiting body และ mycelium ต่อปริมาณของคอไรโดเซปิน พบว่าการใช้น้ำในการสกัดจะได้ปริมาณของคอไรโดเซปินเท่ากับ 7.792 ± 0.107 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งหลังสกัด และการใช้เอทานอลจะได้ปริมาณของคอไรโดเซปินเท่ากับ 15.206 ± 0.120 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งหลังสกัด โดยในการสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองจาก mycelium พบว่าการใช้น้ำในการสกัดจะได้ปริมาณของคอไรโดเซปินเท่ากับ 2.717 ± 0.025 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งหลังสกัด และการใช้เอทานอลจะได้ปริมาณของคอไรโดเซปินเท่ากับ 3.961 ± 0.161 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งหลังสกัด [14] จะเห็นได้ว่าวิธีการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และส่วนของเห็ดถั่งเช่าที่นำมาใช้สกัดจะมีผลต่อปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัด

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม และมะเร็งตับ รวมถึงเซลล์ภูมิคุ้มกันทั้งใน PBMCs และเซลล์ลอย (non-adherent cell) พบว่าสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีความเป็นพิษต่ำกว่าเซลล์ทุกชนิด ยกเว้น non-adherent cell ที่ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 354.2 ± 4.41 ที่ 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจาก fruiting body ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง สกัดที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0 ถึง 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7 cell) ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดไม่เป็นพิษกับเซลล์[15] และในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และเฮกเซนต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน PBMC ที่แยกได้จากมนุษย์ พบว่าให้ค่า IC_{50} ที่มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemic cell line) [16] แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์

เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมที่เวลา 24 ชั่วโมง คือ ในเซลล์ MCF-7 พบว่ามีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย แต่ในเซลล์ MDA-MB-231 พบว่า สารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [17] นอกจากนี้การศึกษาในปี 2016 พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำจาก fruiting body ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยทำการสกัดที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีค่าเท่ากับ 1,096 และ 791 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [12] ซึ่งให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับการวิจัยครั้งนี้ใน MCF-7 จากผลการทดลองทั้งหมดสะท้อนให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันของทั้งมนุษย์และสัตว์ แต่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งบางชนิด

ผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัดไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งทุกชนิด โดย non-adherent cells ซึ่งจะประกอบด้วย เซลล์ที บีเซลล์ เซลล์เอ็นเค และเซลล์เอ็นเคที ซึ่งเป็นกลุ่ม effector immune cell ที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ที่อัตราส่วน 5:1, 10:1 และ 20:1 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7, MDA-MB-231, Huh-7 และ SNU-449 พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งอยู่ในช่วง 75-100 ดังนั้นสารสกัดหรือเซลล์ภูมิคุ้มกันเพียงอย่างเดียวไม่ได้มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็ง MCF-7, MDA-MB-231, Huh-7 และ SNU-449 ยกเว้น non-adherent cells ที่อัตราส่วนที่ 20:1 พบว่าทำให้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Huh-7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าเซลล์ Huh-7 มีความไวต่อการถูกทำลายด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น โดยเฉพาะที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็งเท่ากับ

20:1 จะเห็นว่าค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งทุกชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาถึงค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่า MCF-7 จะมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นจากสารสกัดกว่าเซลล์ MDA-MB-231 อาจจะเนื่องมาจากชนิดของเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน โดย MCF-7 จัดเป็น non-TNBC (มีการแสดงออก estrogen receptor และ progesterone receptor) ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยยาเคมีบำบัด ส่วน MDA-MB-231 จัดเป็น TNBC (ไม่มีการแสดงออกของ estrogen receptor, progesterone receptor และ human epithelial receptor 2; HER2) ซึ่งมีการรายงานว่าดื้อต่อยาเคมีบำบัด และเป็นเซลล์ชนิดที่มีความรุนแรงสูง (aggressive breast cancer cell line) [18-19] ในเซลล์มะเร็งตับ พบว่า Huh-7 จัดเป็น well-differentiated cells (early stage) จะมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นจากสารสกัดกว่าเซลล์ SNU-449 จัดเป็น poorly-differentiated cells (late stage) ซึ่ง well-differentiated cells จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เหมือนกับเซลล์ตับปกติ แต่ poorly-differentiated cells จะมีความแตกต่างไปจากเซลล์ตับปกติ [20]

ดังนั้นชนิดของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน (cancer cell heterogeneity) ก็จะส่งผลต่อความไวในการถูกทำลายด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันหลังจากถูกกระตุ้นจากตัวสารสกัด อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารมาตรฐานคอร์ไดเซป็นความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ในการ sensitization เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นเค-92 (NK-92 cell) ให้ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ดีขึ้น โดยสารคอร์ไดเซป็นจะไปเพิ่มระดับการแสดงออกของ TRAIL receptor (DR4 และ DR5) บนผิวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKKU-213A ทำให้ NK-92 cell สามารถจดจำและทำลายเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์หาสารคอร์ไดเซป็นในสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองและถั่งเช่าหิมะ *Isaria tenuipes* สกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีสารคอร์ไดเซป็นเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง แต่คอร์ไดเซป็นไม่พบในเห็ดถั่งเช่าหิมะ นอกจากนี้สารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีฤทธิ์

ในการกระตุ้นการทำงาน NK-92 cell ที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันกับเซลล์มะเร็ง เท่ากับ 1:1 ให้ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ดีขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้แต่แตกต่างกันที่ชนิดของเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลอง [11] ผลของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครสุขภาพดีของประเทศเกาหลี พบว่าการบริโภคสารสกัดปริมาณ 1.5 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์มีความปลอดภัย และทำให้มีระดับไซโตไคน์ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-2 และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เอ็นเค และกระตุ้นให้ทีเซลล์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น [21] สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจาก fruiting body ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยน้ำร้อน เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในสัตว์ทดลอง พบว่าการให้สารสกัดทางปากปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนูทดลอง สามารถเพิ่มปริมาณการหลั่งอินเตอร์เฟอรอน-แกมมาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ [22] ผลของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองแห้งและสดที่ผ่านคลื่นอัลตราโซนิกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ปริมาณคอร์ไดเซปินต่อน้ำหนักแห้งหลังสกัดเท่ากับ 1.937 ± 0.08 (สด) และ 1.857 ± 0.07 (แห้ง) มิลลิกรัมต่อกรัม ทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดในหนูที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (immunosuppressive mice) โดยให้หนูกินสารสกัดที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 15 วัน พบว่าสารสกัดแบบสดสามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจทำงานได้ดีขึ้น และมีระดับการสร้างไซโตไคน์อินเตอร์ลิวคิน-2 และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมาเพิ่มขึ้นมากกว่าสารสกัดแบบแห้ง [23]

นอกจากนี้การศึกษาผลของคอร์ไดเซปินในการกระตุ้นเซลล์ทีของหนู พบว่าคอร์ไดเซปินสามารถลดจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในตับที่ถูกกระตุ้นให้ด้วยสารคอนคานาวัลิน-เอ (Concanavalin-A) และลดระดับการสร้างอินเตอร์ลิวคิน-2 อินเตอร์ลิวคิน-4 อินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา [24] จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าและสารคอร์ไดเซปินมีฤทธิ์ในการปรับการทำงานของระบบเซลล์ภูมิคุ้มกัน

และมีฤทธิ์ในกระตุ้นหรือยับยั้งให้เซลล์ภูมิคุ้มกันมีการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญได้หลายชนิด

จากการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าสารคอร์ไดเซปินร่วมกับสารสำคัญตัวอื่น ๆ ในสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันให้ทำงานในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดสอบให้แน่ชัดว่าในสารสกัดยังมีสารสำคัญตัวอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่หรือไม่ แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสำคัญตัวอื่น ๆ เช่น สารอะดีโนซีน (adenosine) กรดคอร์ไดเซปิก (cordycepic acid) สารกลุ่มคอร์ดีเซป สเตอรอล (cordyceps sterol) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน [2] นอกจากนี้กลไกในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันในการฆ่าเซลล์มะเร็งของสารสกัดน้ำจากเห็ดถั่งเช่าสีทองในระดับเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์และการหลั่งไซโตไคน์ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาและทำการทดสอบต่อไป เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และเกิดการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง โดยการศึกษานี้อาจจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เห็ดถั่งเช่า เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันในคนสุขภาพดี หรือใช้ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยพะเยา โครงการจัดตั้งหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ (Unit of Excellent) ด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการรักษาโรคมะเร็ง เลขที่สัญญา UoE62015 กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา FF64-RIB004 ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สป.อ.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม และมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา RGNS 63-145 และทุนสนับสนุนการวิจัยเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา MS 221010

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Siddiqui AJ, Patel M, Awadelkareem AM, Snoussi M, et al. Cordycepin for Health and Wellbeing: A Potent Bioactive Metabolite of an Entomopathogenic Cordyceps Medicinal Fungus and Its Nutraceutical and Therapeutic Potential. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020;25(12).
- [2] Das G, Shin H-S, Leyva-Gómez G, Prado-Audelo MLD, Cortes H, Singh YD, et al. Cordyceps spp.: A Review on Its Immune-Stimulatory and Other Biological Potentials. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;11.
- [3] Jin Y, Meng X, Qiu Z, Su Y, Yu P, Qu P. Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of Cordyceps militaris. *Saudi journal of biological sciences*. 2018;25(5):991-5.
- [4] Kim H-J, Lee T-H, Yong Sam K, Son M-W, Kim C-K. Immunomodulatory Activities of Ethanol Extract of Cordyceps militaris in Immunocompromised Mice. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2012;41:494-500.
- [5] Jeong MH, Lee CM, Lee SW, Seo SY, Seo MJ, Kang BW, et al. Cordycepin-enriched Cordyceps militaris induces immunomodulation and tumor growth delay in mouse-derived breast cancer. *Oncology reports*. 2013;30(4):1996-2002.
- [6] Park Y, Choi S, Kim B. Effects of Cordyceps militaris Extracts on Macrophage as Immune Conductors. *Applied Sciences*. 2021;11:2206.
- [7] Park Y, Choi S, Kim B, Lee SG. Effects of Cordyceps militaris Extracts on Macrophage as Immune Conductors. *Applied Sciences*. 2021;11(5):2206.
- [8] Zhu S-J, Pan J, Yang J-J, Zhou A. Immune activation and toxicity evaluation of fresh Cordyceps militaris extracts by high-pressure processing. *Food and Agricultural Immunology*. 2015;26(5):645-58.
- [9] Jung SJ, Jung ES, Choi EK, Sin HS, Ha KC, Chae SW. Immunomodulatory effects of a mycelium extract of Cordyceps (Paecilomyces hepiali; CBG-CS-2): a randomized and double-blind clinical trial. *BMC complementary and alternative medicine*. 2019;19(1):77.
- [10] Virani S, Bilheem S, Chansaard W, Chitapanarux I, Daoprasert K, Khuanchana S, et al. National and Subnational Population-Based Incidence of Cancer in Thailand: Assessing Cancers with the Highest Burdens. *Cancers*. 2017;9(8):108.
- [11] Panwong S, Wathikhinnakon M, Kaewkod T, Sawasdee N, Tragoolpua Y, Yenchitsomanus PT, et al. Cordycepin Sensitizes Cholangiocarcinoma Cells to Be Killed by Natural Killer-92 (NK-92) Cells. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2021;26(19).
- [12] Song J, Wang Y, Teng M, Zhang S, Yin M, Lu J, et al. Cordyceps militaris induces tumor cell death via the caspase-dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF-7 cells. *Molecular medicine reports*. 2016;13(6):5132-40.
- [13] Zhang H, Wang J, Dong S, Xu F, Wang S. The Optimization of Extraction of Cordycepin from Fruiting Body of Cordyceps militaris (L.) Link</i>. *Advanced Materials Research*. 2011;393-395:1024-8.

- [14] Choi J, Paje L, Kwon B, Noh J, Lee S. Quantitative analysis of cordycepin in *Cordyceps militaris* under different extraction methods. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2021;64:153-8.
- [15] Jo WS, Choi YJ, Kim HJ, Lee JY, Nam BH, Lee JD, et al. The Anti-inflammatory Effects of Water Extract from *Cordyceps militaris* in Murine Macrophage. *Mycobiology*. 2010;38(1):46-51.
- [16] Tima S, Tapingkae T, To-Anun C, Noireung P, Intaparn P, Chaiyana W, et al. Antileukaemic Cell Proliferation and Cytotoxic Activity of Edible Golden Cordyceps (*Cordyceps militaris*) Extracts. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2022;2022:5347718.
- [17] Jin CY, Kim GY, Choi YH. Induction of apoptosis by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 Cells. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008;18(12):1997-2003.
- [18] Theodossiou TA, Ali M, Grigalavicius M, Grallert B, Dillard P, Schink KO, et al. Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy. *npj Breast Cancer*.
- [19] Huang Z, Yu P, Tang J. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *OncoTargets and therapy*. 2020;13:5395-405.
- [20] Nwosu ZC, Battello N, Rothley M, Piorońska W, Sitek B, Ebert MP, et al. Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):211.
- [21] Kang HJ, Baik HW, Kim SJ, Lee SG, Ahn HY, Park JS, et al. *Cordyceps militaris* Enhances Cell-Mediated Immunity in Healthy Korean Men. *J Med Food*. 2015;18(10):1164-72.
- [22] Kim CS, Lee SY, Cho SH, Ko YM, Kim BH, Kim HJ, et al. *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-gamma production. *J Ethnopharmacol*. 2008;120(3):366-71.
- [23] Zhu SJ, Pan J, Zhao B, Liang J, Ze-Yu W, Yang JJ. Comparisons on enhancing the immunity of fresh and dry *Cordyceps militaris* in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):713-9.
- [24] Xiong Y, Zhang S, Xu L, Song B, Huang G, Lu J, et al. Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*. *J Surg Res*. 2013;185(2):912-22.