

ผลการทดสอบ

1. ผลการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ

การเตรียมเห็ดไมตาเกะ

นำตัวอย่างเห็ดไมตาเกะมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากไอออน วางทิ้งไว้เพื่อสะเด็ดน้ำจากนั้นอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นบดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร คำนวณหาค่าร้อยละปริมาณผลผลิตที่ได้ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณร้อยละของผลผลิตเห็ดไมตาเกะ

น้ำหนักเห็ดไมตาเกะสด	น้ำหนักเห็ดไมตาเกะแห้ง	ปริมาณร้อยละผลผลิต(%)
2 กิโลกรัม	196.4 กรัม	9.8%

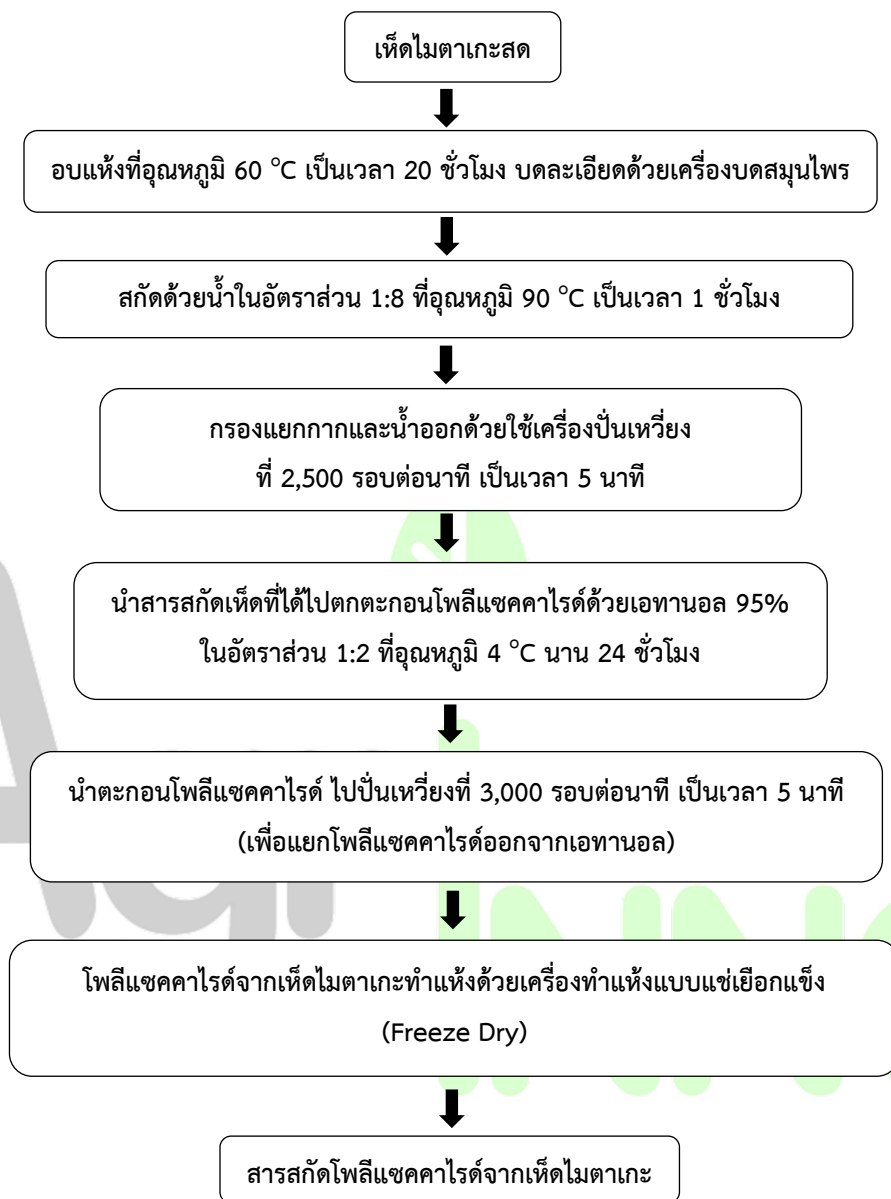
การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ

นำตัวอย่างเห็ดไมตาเกะบดผงที่ได้ สกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:8 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกกากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารสกัดเห็ดไมตาเกะไปตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:2 ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง นำตะกอนโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนโพลีแซคคาไรด์แล้วทำแห้งด้วยวิธีการ Freeze dry สารสกัดที่ได้นำไป คำนวณหาค่าปริมาณร้อยละของผลผลิต ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณร้อยละของสารสกัดสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะด้วยน้ำและทำแห้งด้วยวิธีการ Freeze dry

น้ำหนักเห็ดไมตาเกะแห้ง	น้ำหนักโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ	ปริมาณร้อยละผลผลิต(%)
196.4 กรัม	10 กรัม	5%

กระบวนการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ



ภาพที่ 1 แผนผังแสดงกระบวนการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ



เห็ดไมตาเกะสด



อบแห้งอุณหภูมิ 60 -65 °C



เห็ดไมตาเกะบดละเอียด



ต้มสกัดที่อุณหภูมิ 90°C
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



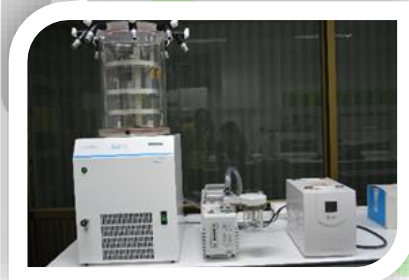
สารสกัดน้ำเห็ดไมตาเกะ



ตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์ด้วย
เอทานอล 95% อัตราส่วน 1:2



ตะกอนโพลีแซคคาไรด์



ทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze Dry



โพลีแซคคาไรด์เห็ดไมตาเกะ

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะ

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ (poly-saccharide)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ polysaccharide ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดไมตาเกะ ด้วยวิธี Phenol Sulfuric Method (Dubois et. al., 1956) ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (glucose) ที่ความเข้มข้น 0-80.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรง $R^2 = 0.9971$ และมีสมการเชิงเส้นตรง $y = 11.392x + 0.0259$ โดยผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ polysaccharide ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดไมตาเกะ

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg glucose eq/ g)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด (mg / 1 g of sample)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด (g/ 1 g of sample)	%W/W
สารสกัด polysaccharide จาก เห็ดไมตาเกะสด	237.78	248.11	0.25	25
	258.44			
	248.11			
สารสกัด 50% polysaccharide จาก เห็ดไมตาเกะ	747.73	719.36	0.72	72
	707.83			
	702.51			
	637.40	644.01	0.64	64
	694.04			
	600.59			

สรุปผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ (poly-saccharide)

- สารสกัด polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะสด 1 กรัม มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ polysaccharide เท่ากับ 0.25 กรัม หรือ 25 %
- สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ 1 กรัม มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของ polysaccharide เท่ากับ 0.72 กรัม หรือ 72 %
-

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน (Beta glucan)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ Beta glucan ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดไมตาเกะ ด้วยวิธี β -glucan Assay Kit (Megazyme) ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 ปริมาณ Beta glucan ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดไมตาเกะ

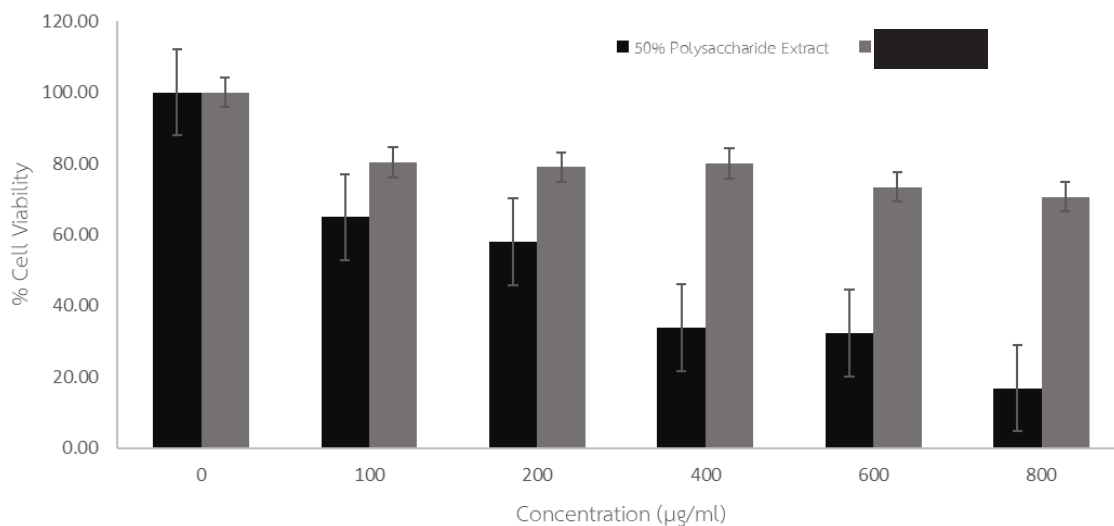
ตัวอย่าง	ปริมาณ Beta-glucan (g / 100 g of sample)	%W/W
สารสกัด polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะสด	13.47	13
สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ	69.41	69
	51.04	51

สรุปผลการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน (Beta glucan)

- สารสกัด polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะสด มีปริมาณ Beta glucan เท่ากับ 13%
- สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ มีปริมาณ Beta glucan เท่ากับ 69%
- มีปริมาณ Beta glucan เท่ากับ 51%

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT assay

การทดลองเพื่อศึกษาผลของสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองเพาะเลี้ยงของมนุษย์ (SU-DHL-4) โดยเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plates และบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย 3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]- 2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) เข้าไปในเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ ละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm (Zhang, Y. et al., 2017) พบว่าสารสกัด 50% polysaccharide ที่ความเข้มข้น $359.27 \pm 32.69 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (SU-DHL-4) ได้ 50% และ ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (SU-DHL-4) ได้ 80.32, 78.98, 79.97, 73.36 และ 70.66% ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6, ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลของตัวอย่างสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ และ

ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม (SU-DHL-4) Mean $\pm$ SEM (n = 3)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ของตัวอย่างสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ

Sample test	IC ₅₀ (µg/ml)
สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ	359.27 $\pm$ 32.69

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เอ็มโปร

Sample test	% Cell Viability
(100 µg/ml)	80.32
(200 µg/ml)	78.98
(400 µg/ml)	79.97
(600 µg/ml)	73.36
(800 µg/ml)	70.66

สรุปผลการวิเคราะห์การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT assay

1. สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะที่ความเข้มข้น 359.27 $\pm$ 32.69 µg/ml สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (SU-DHL-4) ได้ 50%
2. ที่ความเข้มข้น 100-800 µg/ml สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (SU-DHL-4) ได้ 19.68-29.34 %

5. การตายของเซลล์แบบ apoptosis

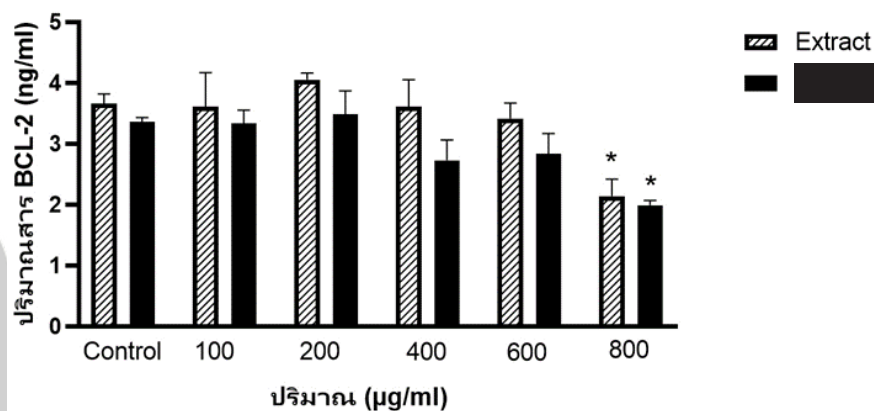
โรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองพบมากในประเทศไทยคิดเป็น 59.3% ของโรคมะเร็งทั้งหมด (Perry et al., 2016) โดยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดดิลฟิวลาจบีเซลล์ (Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) ประเภท B-cell เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองที่พบได้มากที่สุดของกลุ่มโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจกิน (non-Hodgkin lymphomas; NHL) (Nyman et al., 2007) และในปี ค.ศ. 2017 มีรายงานการเกิดอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL ต่อกลุ่ม NHL ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ฮ่องกง, เซี่ยงไฮ้, อินโดนีเซีย และ ไทย) สูงถึง 58.1% (Intragumtornchai et al., 2018)

Apoptosis เป็นกระบวนการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบใช้พลังงานอย่างเป็นระบบ (Nakagawa et al., 1995) เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำกระบวนการดังกล่าวผ่านการได้รับความเสียหายในระดับเซลล์ เช่น สายโครมาตินจับกันแน่น, เกิดความเสียหายใน DNA หรือเซลล์ที่ตายเกิดการหดตัวลง (Joselin et al., 2006) กระบวนการ apoptosis นั้นมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานหลายชนิด เช่น p53 และ B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของวัฏจักรเซลล์ และยับยั้งกระบวนการ apoptosis โดยยับยั้งการหลั่งสาร cytochrome c (Hemann et al., 2006 และ Scorrano et al., 2003) โดยในเซลล์ปกติจะมีการแสดงออกของโปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ในระดับที่คงที่หรือขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพของเซลล์ แต่เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4) จะมีการแสดงออกของ B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ที่สูงขึ้น นอกจากนั้นยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ส่งเสริมกระบวนการ apoptosis เช่น caspase-3 ที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูป active form หรือเรียกว่า cleaved caspase-3 ผ่านการหลั่งของสาร cytochrome c ระหว่างการเกิดกระบวนการ apoptosis (Cai et al., 2002) โดย cleaved caspase-3 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งจะไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวแต่หากเกิดกระบวนการ apoptosis จะมีปริมาณของ cleaved caspase-3 เพิ่มขึ้น

ดังนั้นในการทดสอบสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะและ [REDACTED] ทำการทดสอบโดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Zhang et al., 2017 ที่ศึกษาสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดไมตาเกะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของโปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ที่เหมือนกับเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4) ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ โดยทำการวัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) และ เอนไซม์ cleaved caspase-3 ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Porter et al., 1999) โดยที่ปริมาณของโปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ถ้ามีปริมาณโปรตีนลดลงแสดงว่า [REDACTED] มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง แต่หากมีปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นแสดงว่า [REDACTED] ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณเอนไซม์ cleaved caspase-3 เพิ่มขึ้นแสดงว่า [REDACTED] มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และหากมีปริมาณเอนไซม์ลดลงแสดงว่า [REDACTED] ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง

ผลการศึกษาสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ ██████████ ต่อการสังเคราะห์โปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4)

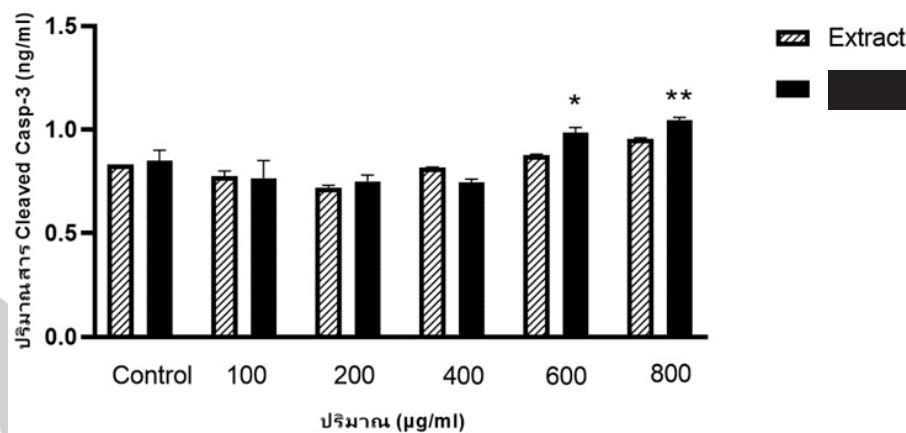
จากการทดสอบสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ ██████████ ที่ขนาด 100-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4) พบว่าสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ และ ██████████ ที่ปริมาณ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย (anti-apoptotic protein) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 ผลการศึกษาสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ ██████████ ต่อการสังเคราะห์โปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4), Mean $\pm$ SEM, (n = 2), * เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ [redacted] ต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ Cleaved Caspase-3 ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4)

จากการทดสอบสารสกัด 50% polysaccharide [redacted] ที่ขนาด 100-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4) พบว่า [redacted] ที่ปริมาณ 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ Cleaved Caspase-3 ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตาย (apoptosis) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 5 ผลการศึกษาสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ [redacted] ต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ Cleaved Caspase-3 ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4), Mean $\pm$ SEM, (n = 2), * เปรียบเทียบกับกลุ่ม control (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ [redacted] ในเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด diffuse large B cell lymphoma (SU-DHL-4) พบว่า [redacted] ปริมาณ 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันไม่ให้เซลล์ตาย (anti-apoptotic protein) ให้มีปริมาณลดลง อีกทั้งยังทำให้ปริมาณเอนไซม์ Cleaved Caspase-3 ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (apoptosis) เพิ่มขึ้นมากขึ้น ส่วน **สารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ** ที่ปริมาณ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ Cleaved Caspase-3 ผลการทดสอบนี้ยังเป็นการทดสอบเบื้องต้น [redacted] และสารสกัด 50% polysaccharide จากเห็ดไมตาเกะ ในระดับเซลล์ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., & Kang, Y. J. (2002). Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*, 51(6), 1938-1948.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Hemann, M. T., & Lowe, S. W. (2006). The p53-BCL-2 connection. *Cell death and differentiation*, 13(8), 1256.
- Intragumtornchai, T., Bunworasate, U., Wudhikarn, K., Lekhakula, A., Julamanee, J., Chansung, K., ... & Warnnissorn, N. (2018). Non-Hodgkin lymphoma in South East Asia: An analysis of the histopathology, clinical features, and survival from Thailand. *Hematological oncology*, 36(1), 28-36.
- Joselin, A. P., Schulze-Osthoff, K., & Schwerk, C. (2006). Loss of Acinus inhibits oligonucleosomal DNA fragmentation but not chromatin condensation during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12475-12484.
- Nakagawa, S., Shiraishi, T., Kihara, S. I., & Tabuchi, K. (1995). Detection of DNA strand breaks associated with apoptosis in human brain tumors. *Virchows Archiv*, 427, 175-179.
- Nyman, H., Adde, M., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Taskinen, M., Berglund, M., Amini, R. M., ... & Leppä, S. (2007). Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 109(11), 4930-4935.
- Perry, A. M., Diebold, J., Nathwani, B. N., MacLennan, K. A., Müller-Hermelink, H. K., Bast, M., ... & Weisenburger, D. D. (2016). Non-Hodgkin lymphoma in the Far East: review of 730 cases from the international non-Hodgkin lymphoma classification project. *Annals of hematology*, 95, 245-251.
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*, 6(2), 99-104.
- Scorrano, L., & Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 437-444.
- Zhang, Y., Sun, D., Meng, Q., Guo, W., Chen, Q., & Zhang, Y. (2017). Grifola frondosa polysaccharides induce breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial-dependent apoptotic pathway Corrigendum in/10.3892/ijmm. 2022.5192. *International journal of molecular medicine*, 40(4), 1089-1095.