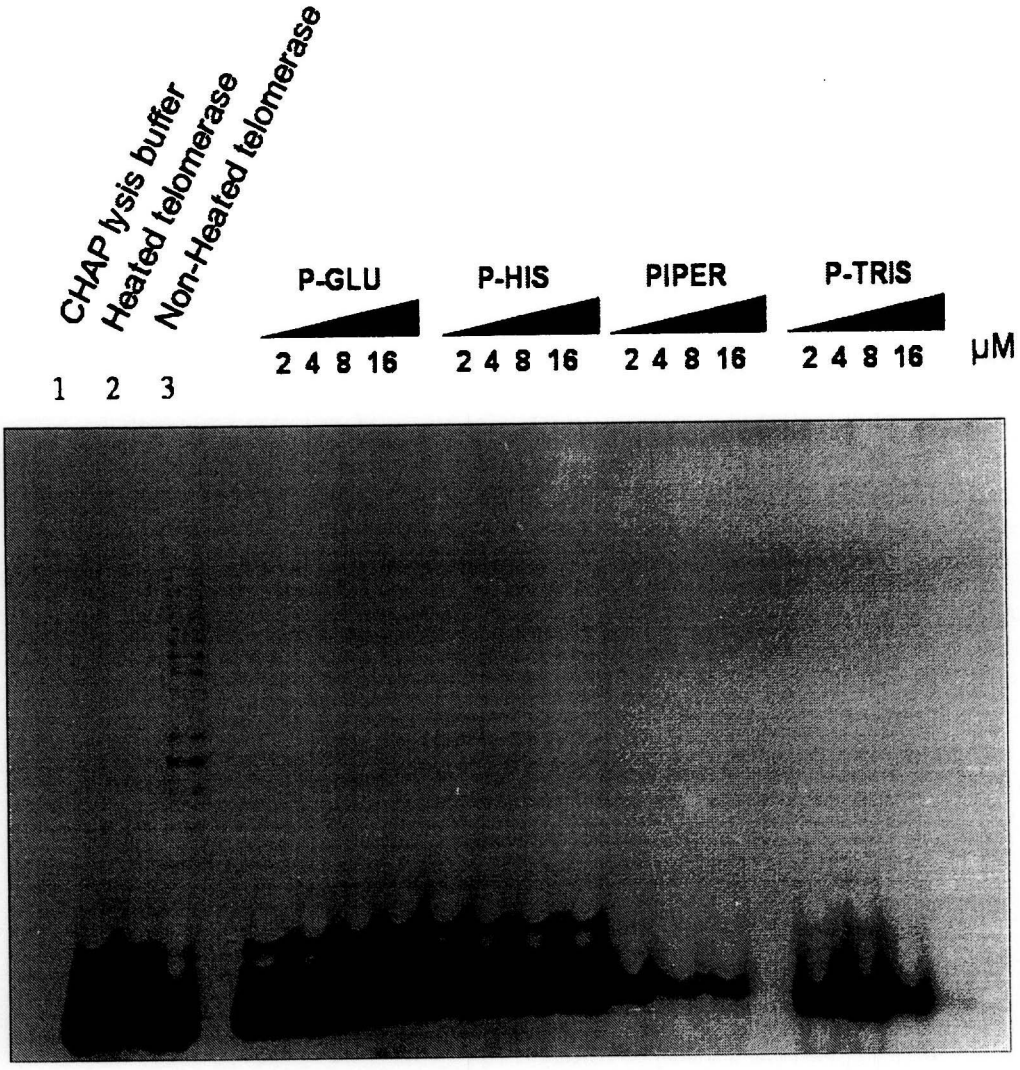
บทที่ 3 ผลและการอภิปรายผล (Result and Discussion)

งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ที่จะหาสารจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส เราเริ่มต้นด้วยการหาสภาวะที่เหมาะสมของ TRAP assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส รวมทั้งทดสอบสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส โดยทดสอบกับสารกลุ่ม Perylene สี่ชนิด ที่มีความสามารถในการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ได้แตกต่างกัน [61] ทำให้ปลายเทโลเมียอยู่ในรูป G-quadruplex ที่ไม่สามารถต่อปลายเทโลเมียโดยเทโลเมอเรสได้

ผลการทดลองที่ 1: การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสของสารกลุ่ม Perylene โดยวิธี TRAP assay

จากผลการทดลองในรูป 3.1 จะเห็นได้ว่า ในช่องที่ 3 เทโลเมอเรสที่เราสกัดได้สามารถต่อไพรเมอร์เป็นลักษณะของแถบขั้นบันได (Ladder) ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหกนิวคลีโอไทด์ อย่างชัดเจน ในขณะที่ในช่อง 1 และ 2 ซึ่งเป็น Negative control (ช่องที่ 1 ใช้ CHAPS lysis buffer และ ช่องที่ 2 ใช้เอนไซม์เทโลเมอเรสหยาบที่ผ่านทำให้เสียสภาพโดยการต้มแล้ว) พบแถบขั้นบันไดได้น้อย ผลที่เห็นเป็นแถบขั้นบันไดจางๆ อาจเกิดจาก Artifact ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ เมื่อทดสอบกับสารกลุ่ม Perylene สี่ชนิด ได้แก่ P-GLU, P-HIS, PIPER, และ P-TRIS พบว่า P-GLU และ P-HIS ซึ่งไม่สามารถทำให้ปลายเทโลเมียอยู่ในรูป G-quadruplex [61] ได้ ก็จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสได้ ในขณะที่ PIPER และ P-TRIS ซึ่งสามารถทำให้ปลายเทโลเมียอยู่ในรูป G-quadruplex [61] ได้ สามารถยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสใน TRAP assay ที่เราจัดตั้งขึ้นได้ แต่การทดสอบนี้ เป็นการทดสอบระบบในระยะเริ่มต้น หากต้องการนำไปใช้งานจริง ต้องมีการควบคุมที่ดีกว่านี้

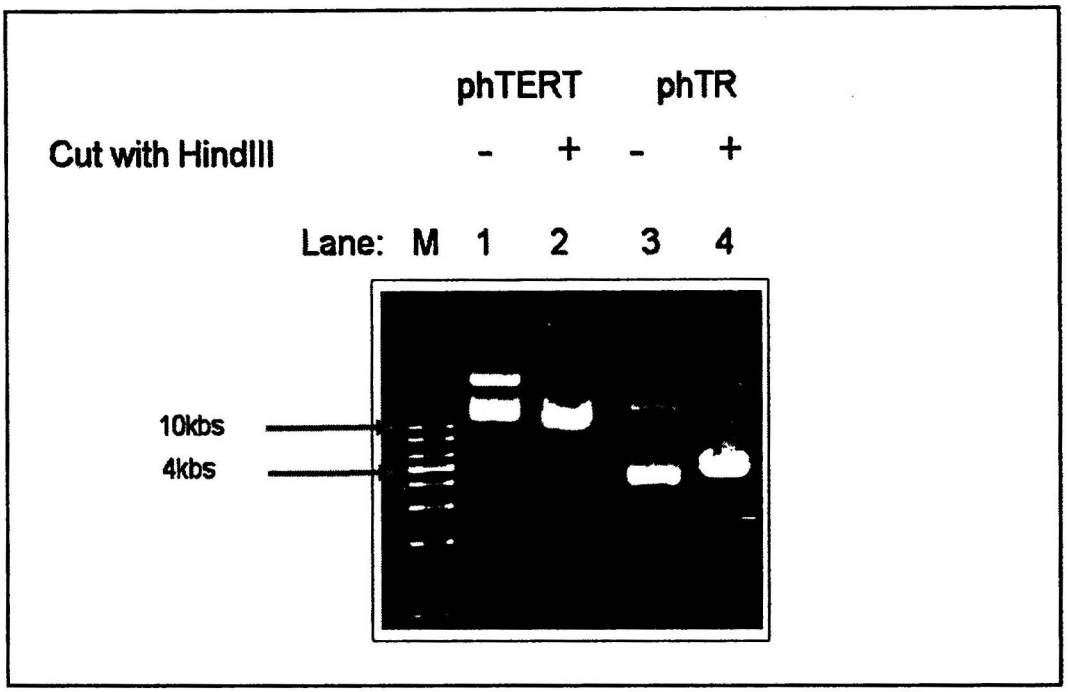


รูปที่ 3.1: ผลการวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสของสารกลุ่ม Perylene โดยใช้วิธี TRAP assay. ช่องที่ 1 และ 2 มีการใช้ CHAPS lysis buffer และ Cell lysate ที่มีเอนไซม์เทโลเมอเรสที่ต้มแล้วลงในปฏิกิริยาเพื่อเป็น Negative control ช่องที่ 3 ใช้ cell lysate ที่มีเอนไซม์เทโลเมอเรส ส่วนช่องถัดไป ทำการบ่มเอนไซม์เทโลเมอเรสกับสารอนุพันธ์ perylene ที่ความเข้มข้น 2, 4, 8, และ16 ไมโครโมลาร์

เราได้หยุดการพัฒนาระบบ TRAP assay นี้ไป เมื่อได้อ่านบทความเรื่อง "Reevaluation of Telomerase Inhibition by Quadruplex Ligands and Their Mechanisms of Action" โดย Anne De Cian และคณะ [56] โดยรายงานวิจัยฉบับนี้มีบทสรุปที่ว่า ไม่ควรใช้ TRAP assay ในการหาผลการยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรสโดย G-quadruplex ligand เนื่องจากสารเหล่านี้ สามารถยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ทำให้ได้ผลบวกลวง ทางผู้วิจัยได้เสนอให้ใช้วิธี Direct telomerase inhibition แต่วิธีการนี้ จำเป็นต้องใช้เทโลเมอเรสจำนวนมาก ที่ได้จากการผลิตเทโลเมอเรสโดยการสอดใส่พลาสมิดสองชนิดที่จำเป็นต่อการสร้างเทโลเมอเรสลงในเซลล์ HEK293T ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยเราจึงได้ทำการขอพลาสมิดทั้งสอง และได้รับการอนุเคราะห์พลาสมิด pVan107-hTERT และ pBS-U1-hTR จาก Dr. Joachim Lingner, Swiss Institute for Experimental Cancer Research เราได้ทำการผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกระยะสั้น (Transient expression) ของยีนเทโลเมอเรสที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง ซึ่งมีผลดังแสดงในผลการทดลองที่ 2

ผลการทดลองที่ 2: การผลิตเทโลเมอเรสโดยการแสดงออกระยะสั้น เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเทโลเมอเรสโดยตรง

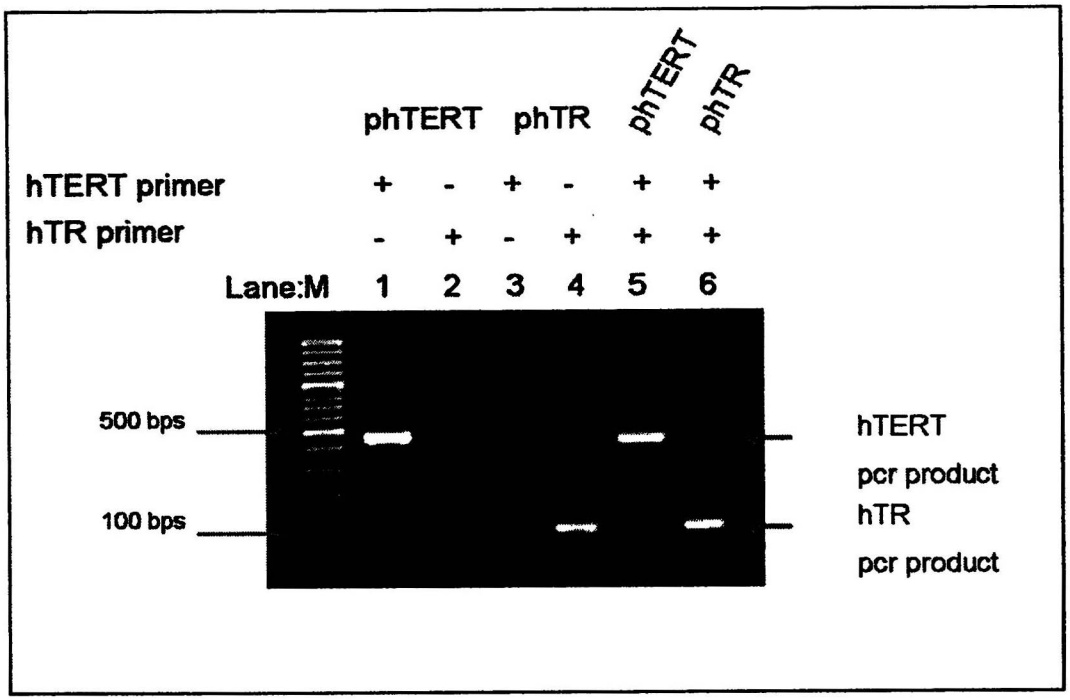
หลังจากที่เราได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองชนิด คือ phTERT (พลาสมิดที่มียีนของ hTERT หรือ catalytic subunit ของเทโลเมอเรส) และ phTR (พลาสมิดที่มียีนของ hTR หรือ RNA subunit ของเทโลเมอเรส) เราได้นำมาการเพิ่มปริมาณในเซลล์ *E.coli* แล้วสกัดเอาพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองชนิดออกมา แล้วทำการทดสอบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ มีขนาดตามที่ต้องการหรือไม่ โดย phTERT ควรจะมีขนาด 9153 bp ส่วน phTR ควรจะมีขนาด 3412 bp โดยเรานำเอาพลาสมิด มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ HindIII ที่มีจุดตัดเพียงตำแหน่งเดียวบนพลาสมิดของทั้งคู่ เพื่อกำจัด Concatenated plasmid และทำให้ พลาสมิดเป็นเส้นตรง หลังจากนั้นนำพลาสมิดก่อนและหลังการตัดโดย HindIII มาแยกดีเอ็นเอตามขนาด โดย Agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2: ผลการวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดโดย Agarose gel electrophoresis. พลาสมิดปริมาณ 1 μg ถูกแยกด้วย 0.8 % agarose gel ช่องที่ 1 และ 2 แสดงพลาสมิด phTERT ที่ไม่ได้ตัดด้วย HindIII และตัดด้วย HindIII ตามลำดับ ส่วนช่องที่ 3 และ 4 แสดงพลาสมิด phTR ที่ไม่ได้ตัดด้วย HindIII และตัดด้วย HindIII ตามลำดับ

จากรูป 3.2 จะเห็นได้ว่า พลาสมิดทั้งคู่ มีขนาดที่ใกล้เคียงกับที่เราคาดไว้ เราจึงได้ทำการทดสอบต่อไปว่า พลาสมิดทั้งสองชนิด มียีนที่เราต้องการอยู่หรือเปล่า โดยเราได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTERT จะให้ PCR product ที่มีขนาด 457 bp และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTR จะให้ PCR product ที่มีขนาด 111 bp ซึ่งมีผลดังในรูปที่ 3.3

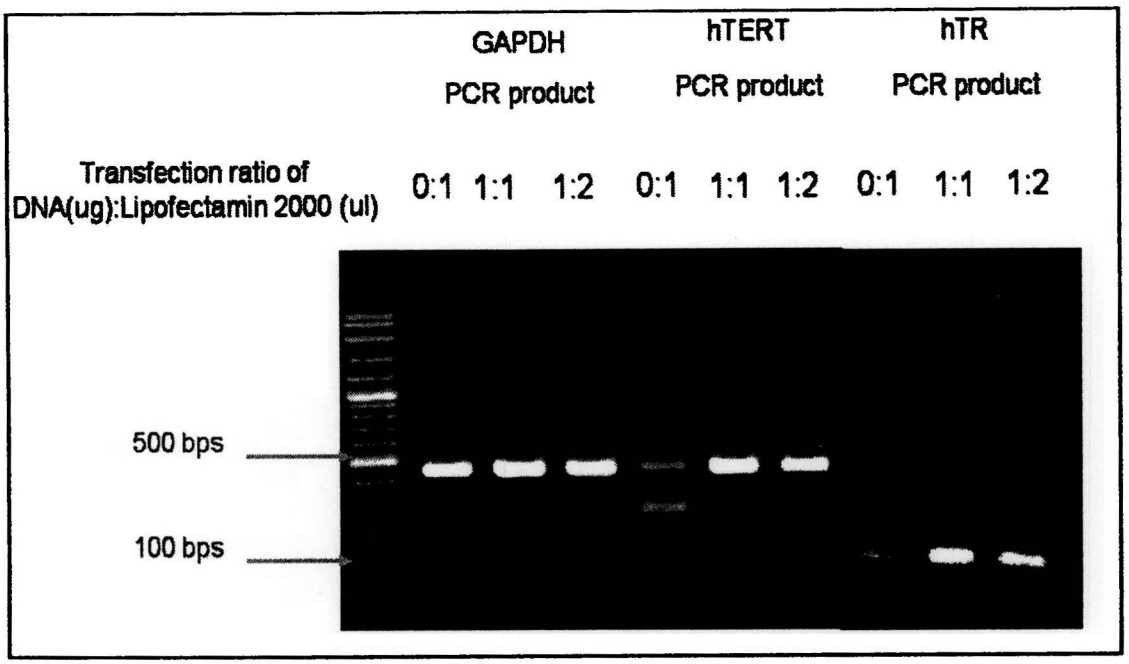
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อนำเอาพลาสมิด phTERT มาทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTERT (ช่องที่ 1) จะได้ PCR product ที่มีขนาด 457 bp โดยจะไม่ได้ PCR product เลย เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTR (ช่องที่ 2) ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำเอาพลาสมิด phTR มาทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTR (ช่องที่ 4) จะได้ PCR product ที่มีขนาด 111 bp โดยจะไม่ได้ PCR product เลย เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ hTERT (ช่องที่ 3) และเมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ ใส่ในพลาสมิด phTERT (ช่องที่ 5) หรือพลาสมิด phTR (ช่องที่ 6) ก็จะได้ PCR product เพียงชนิดเดียว แสดงว่าพลาสมิดทั้งคู่มียีนที่ต้องการ และไม่มีการปนเปื้อนในแต่ละตัวอย่าง (Cross contamination)



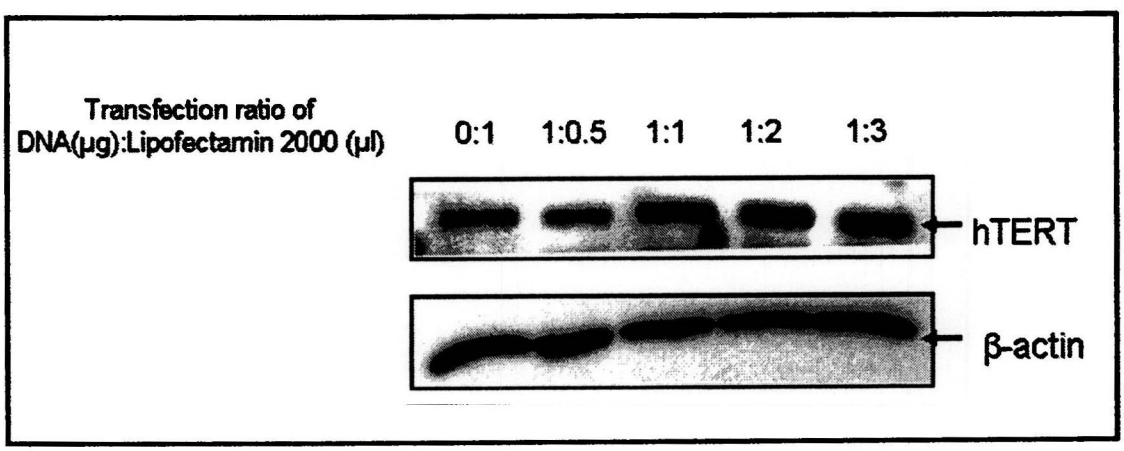
รูปที่ 3.3: ผลการตรวจสอบยีน hTERT และ ยีน hTR ในพลาสมิดที่สกัดแยกได้โดยใช้วิธีพีซีอาร์. พลาสมิด phTERT (ช่องที่ 1, 2 และ 5) และ พลาสมิด phTR (ช่องที่ 3, 4 และ 6) ถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน hTERT และยีน hTR โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น ขนาดของ hTERT PCR product มีขนาด 457 bps และ hTR PCR product มีขนาด 111 bps

หลังจากที่เราได้ทำการพิสูจน์พลาสมิดทั้งสองแล้ว เราก็ได้ทำการทรานสเฟคชั่นของพลาสมิดทั้งสองเข้าสู่เซลล์ HEK293T โดยใช้ทั้งวิธีการทรานสเฟคชั่นโดย Lipofectamine 2000 ™ (Invitrogen) และ วิธีการทรานสเฟคชั่นโดยแคลเซียมฟอสเฟต แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยใช้ Reverse transcriptase–PCR และ Western blotting analysis ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.4-3.7

รูปที่ 3.4 แสดงผลของการวิเคราะห์ระดับของ hTERT mRNA และ hTR mRNA ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิดโดย Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) โดยใช้อัตราส่วนของพลาสมิดต่อ Lipofectamine 2000 ที่ต่างกัน จากผลการทดลอง พบว่า ในเซลล์ที่มีการทรานสเฟคชั่น มีการเพิ่มจำนวนของ hTERT mRNA และ hTR RNA มากกว่าในเซลล์ที่ไม่มีการทรานสเฟคชั่น ในขณะที่จำนวนของ GAPDH mRNA ไม่แตกต่างกัน ระหว่างเซลล์ที่มีหรือไม่มีการทรานสเฟคชั่น (ให้สังเกตว่า hTERT mRNA ที่ได้จาก HEK293T cells จะมี β-variant ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาด 275 bp)

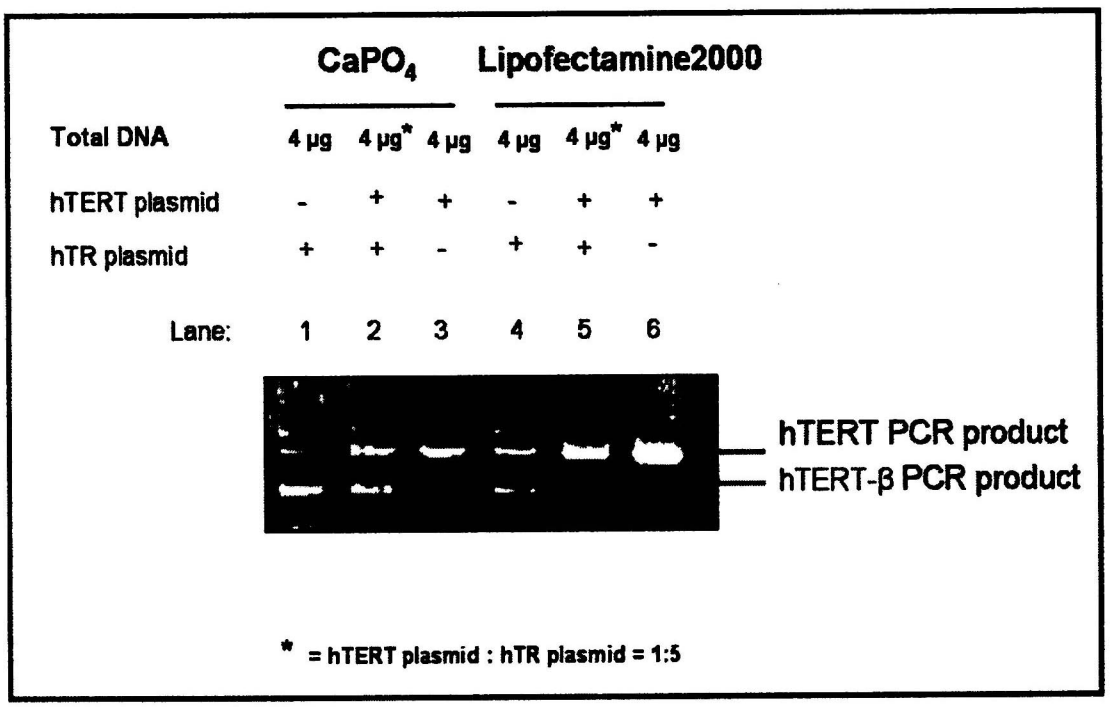


รูปที่ 3.4: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT mRNA และ hTR mRNA ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด เซลล์ HEK293T ถูกทรานสเฟคด้วย 4 μg ของ พลาสมิดดีเอ็นเอ (พลาสมิด phTERT : พลาสมิดของ phTR เท่ากับ 1:5) โดยใช้อัตราส่วนของ DNA ต่อ Lipofectamine 2000 ที่ต่างกัน RNA 2 μg จาก HEK293T cells ได้นำมาทำ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของ hTERT และยีนของ hTR ขนาดของ hTERT PCR product มีขนาด 457 bps และ hTR PCR product มีขนาด 111 bps ขนาดของ GAPDH PCR product มีขนาด 452 bps



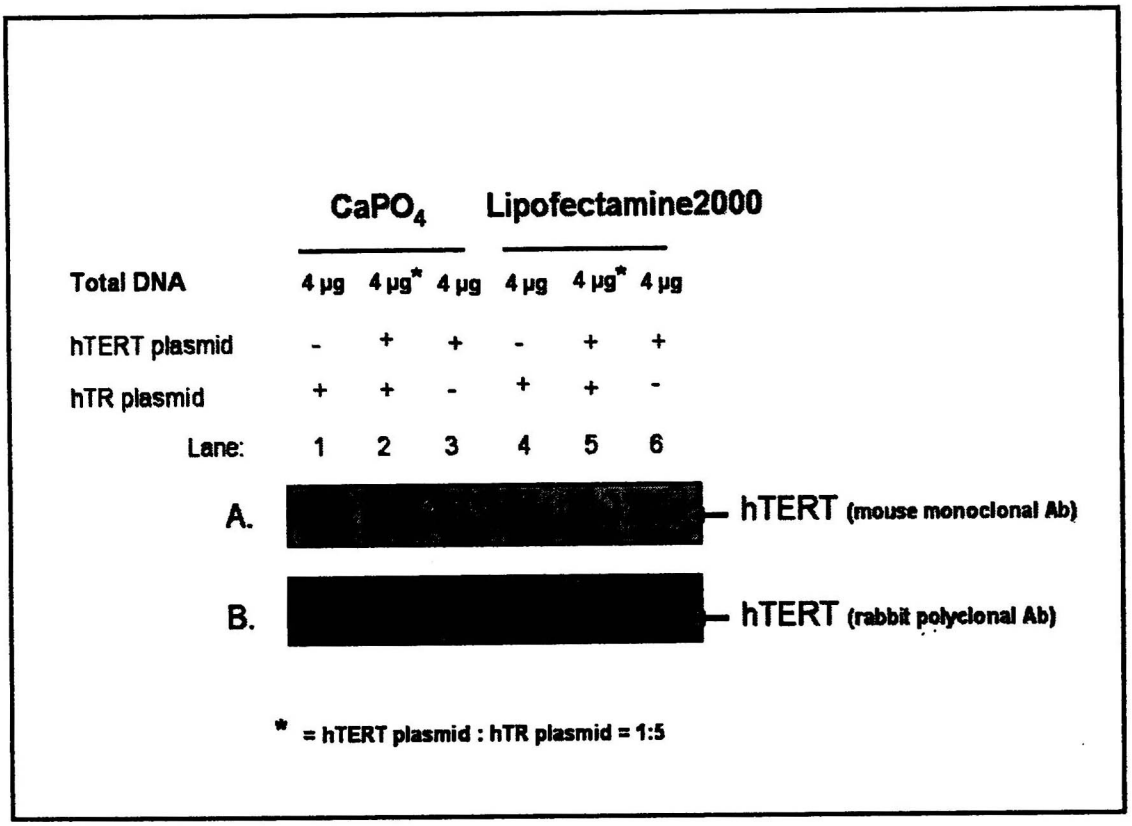
รูปที่ 3.5: ผลการวิเคราะห์โปรตีนเทโลเมอเรสของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด เซลล์ HEK293T ถูกทรานสเฟคด้วย 4 μg ของพลาสมิดดีเอ็นเอ (พลาสมิด phTERT : พลาสมิดของ phTR เท่ากับ 1:5) โดยใช้อัตราส่วนของ DNA ต่อ Lipofectamine 2000 ที่ต่างกัน cell lysate ของแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากัน นำมาแยกบน 8 % SDS-PAGE

รูปที่ 3.5 แสดงผลของการวิเคราะห์ระดับของ hTERT protein ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิดโดย Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) โดยใช้อัตราส่วนของพลาสมิดต่อ Lipofectamine 2000 ที่ต่างกัน จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณของ hTERT protein ไม่แตกต่างกัน ระหว่างเซลล์ที่มีหรือไม่มีการทรานสเฟคชั่น นอกจากนั้น เรายังพบว่า การใช้ Lipofectamine 2000™ ในอัตราส่วนที่สูง (1:2 หรือ 1:3) ทำให้เซลล์ตาย ดังนั้น เราจึงได้ทดสอบกระบวนการทรานสเฟคชั่นใหม่ โดยใช้ วิธีการทรานสเฟคชั่นโดยแคลเซียมฟอสเฟต เปรียบเทียบกับวิธีการทรานสเฟคชั่นโดย Lipofectamine 2000 ™ ผลที่ได้ แสดงในรูปที่ 3.6 และ 3.7



รูปที่ 3.6: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT mRNA ของเซลล์ HEK293T ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด โดยแคลเซียมฟอสเฟตเปรียบเทียบกับ Lipofectamine 2000. เซลล์ HEK293T ถูกทรานสเฟคด้วย 4 µg ของพลาสมิด phTERT และ/หรือ พลาสมิด phTR โดยวิธี $CaPO_4$ และใช้ Lipofectamine 2000 RNA 2 µg จาก HEK293T cells ได้นำมาทำ RT-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนของ *hTERT*

ผลการทดลองในรูป 3.6 พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของ hTERT mRNA ในเซลล์ที่มีการทรานสเฟคชั่น มากกว่าในเซลล์ที่ไม่มีการทรานสเฟคชั่น แต่การใช้ Lipofectamine 2000 จะให้ผลที่ดีกว่า เช่นเดียวกับผลในรูป 3.4 วิธีวัดการแสดงออกของยีนจากพลาสมิดโดย RT-PCR อาจไม่ใช่วิธีที่ดีนัก เนื่องจากเราไม่ทราบว่า ส่วนของ RNA ที่เราสกัดมา จะมีพลาสมิดปนเปื้อนมาหรือไม่



รูปที่ 3.7: ผลการวิเคราะห์ระดับของ hTERT protein **ของเซลล์** HEK293T **ที่ถูกทรานสเฟคด้วยพลาสมิด โดยแคลเซียมฟอสเฟตเปรียบเทียบกับ** Lipofectamine 2000 **และเปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีสองชนิด.** เซลล์ HEK293T ถูก ทรานสเฟคด้วย 4 µg ของพลาสมิด phTERT และ/หรือ พลาสมิด phTR โดยวิธี $CaPO_4$ และใช้ Lipofectamine 2000 นำ cell lysate ของแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากัน นำมาแยกบน 8 % SDS-PAGE แล้วตรวจย้อมโปรตีนของ hTERT โดยใช้ Mouse monoclonal antibody ต่อ hTERT (AB5181, Abcam) เทียบกับการใช้ Rabbit polyclonal antibody ต่อ hTERT (AB63370, Abcam)

เราได้ทำการสืบค้นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เราได้พบบทความหนึ่ง ซึ่งได้พิสูจน์ว่าแอนติบอดีต่อเทโลเมอเรส ที่ใช้ในท้องตลาด อาจไม่มีความจำเพาะต่อเทโลเมอเรสอย่างแท้จริง [62] จึงทำให้เราไม่สามารถตรวจพบปริมาณของ hTERT ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น เราจึงได้ซื้อแอนติบอดีต่อเทโลเมอเรสตัวใหม่ ซึ่งเป็น Rabbit polyclonal antibody ต่อ hTERT (AB63370, Abcam) มาเปรียบเทียบกับ Mouse monoclonal antibody ต่อ hTERT (AB5181, Abcam) ที่เรามีอยู่ และใช้วิธีการทรานสเฟคชั่นโดยแคลเซียมฟอสเฟตเปรียบเทียบกับวิธีการทรานสเฟคชั่นโดย Lipofectamine 2000 ได้ผลการทดลองดังในรูป 3.7 ซึ่งเราก็ไม่พบว่า มีการเพิ่มปริมาณของ hTERT protein แต่อย่างไร

เราได้ทำการสอบถามไปยังกลุ่มวิจัยที่ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ที่ให้พลาสมิดเรามาว่ามีประสบการณ์ในลักษณะเดียวกันหรือไม่ ทางผู้วิจัยที่นั่นบอกว่า ทุกกลุ่มที่ได้รับ พลาสมิดไป สามารถเพิ่มการผลิตเทโลเมอเรส ได้ไม่ต่ำกว่าสองร้อยเท่า แต่ที่เราไม่สามารถตรวจพบระดับโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ ไม่สามารถตรวจเทโลเมอเรสได้ ทางผู้วิจัยที่นั่นได้แนะนำให้ใช้แอนติบอดีต่อเทโลเมอเรส ที่มาจากบริษัท Rockland แต่บริษัทนี้ไม่มีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย ทางผู้วิจัยที่นั่นจึงได้แนะนำให้เราลองวัดการทำงานของเทโลเมอเรสโดย TRAP assay โดยตรงเลย เขามั่นใจว่า เราจะสามารถได้ผลบวกที่มากกว่าเดิมอย่างน้อยสองร้อยเท่า ซึ่งเราจะได้ทำการศึกษาต่อไป

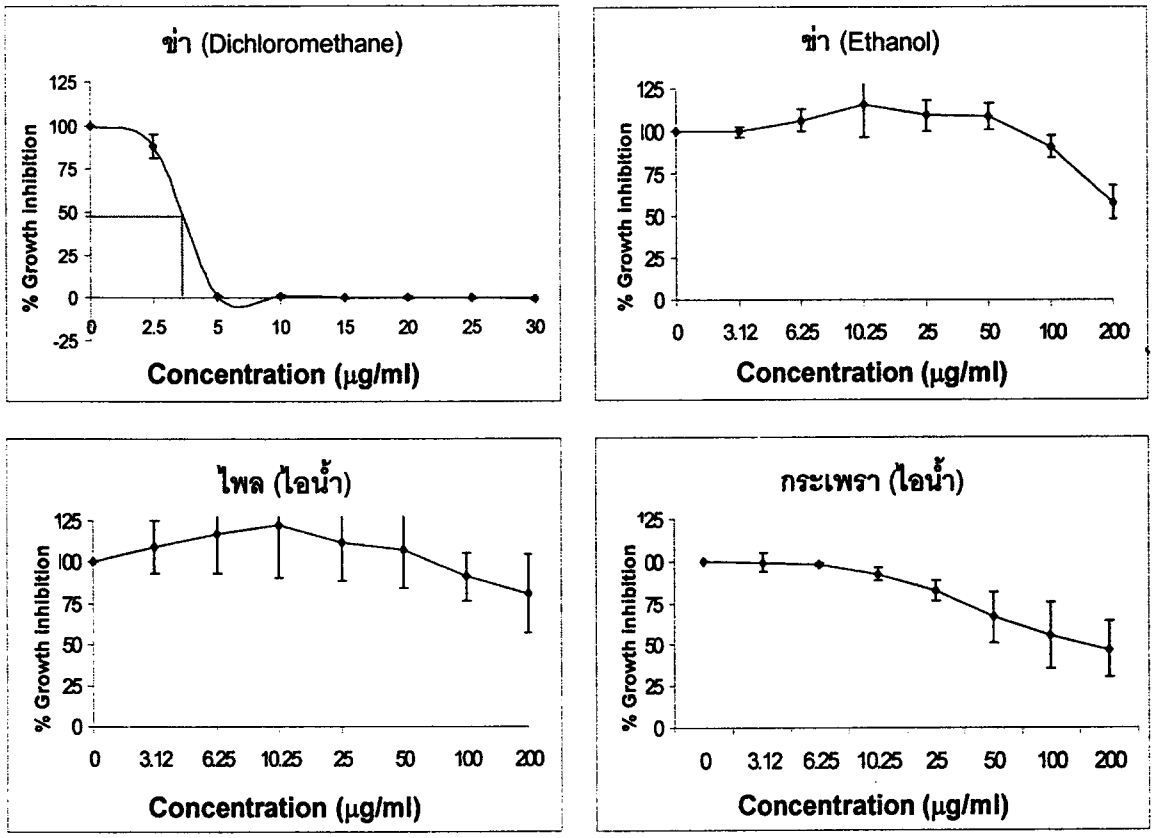
การทดลองที่ 3: การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Sulforhodamine B assay

จากที่เรากล่าวในเบื้องต้นแล้วว่า สารที่ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จะไม่ทำลายเซลล์มะเร็งอย่างฉับพลัน แต่จะทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดอีกต่อไป ดังนั้น วิธีการหาสารที่ยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จึงต่างจากการหาสารฆ่าเซลล์มะเร็งโดยทั่วไป ที่ใช้ผลจากการเป็นพิษต่อเซลล์ในระยะเวลาอันสั้น เป็นวิธีการคัดกรองในขั้นแรก แต่เราก็ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่าง ต่อเซลล์มะเร็งปอด โดยวิธี Sulforhodamine B assay เพื่อที่เราจะได้ข้อมูล ความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป โดยอย่างน้อยที่สุด ความเข้มข้นที่มากที่สุด ที่เราจะนำไปศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ก็ไม่ควรจะทำให้เซลล์ตายเกินครึ่ง นอกจากนั้น ถ้าสารสกัดใดเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ในความเข้มข้นต่ำ เราก็จะนำไปศึกษาหากลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งต่อไป

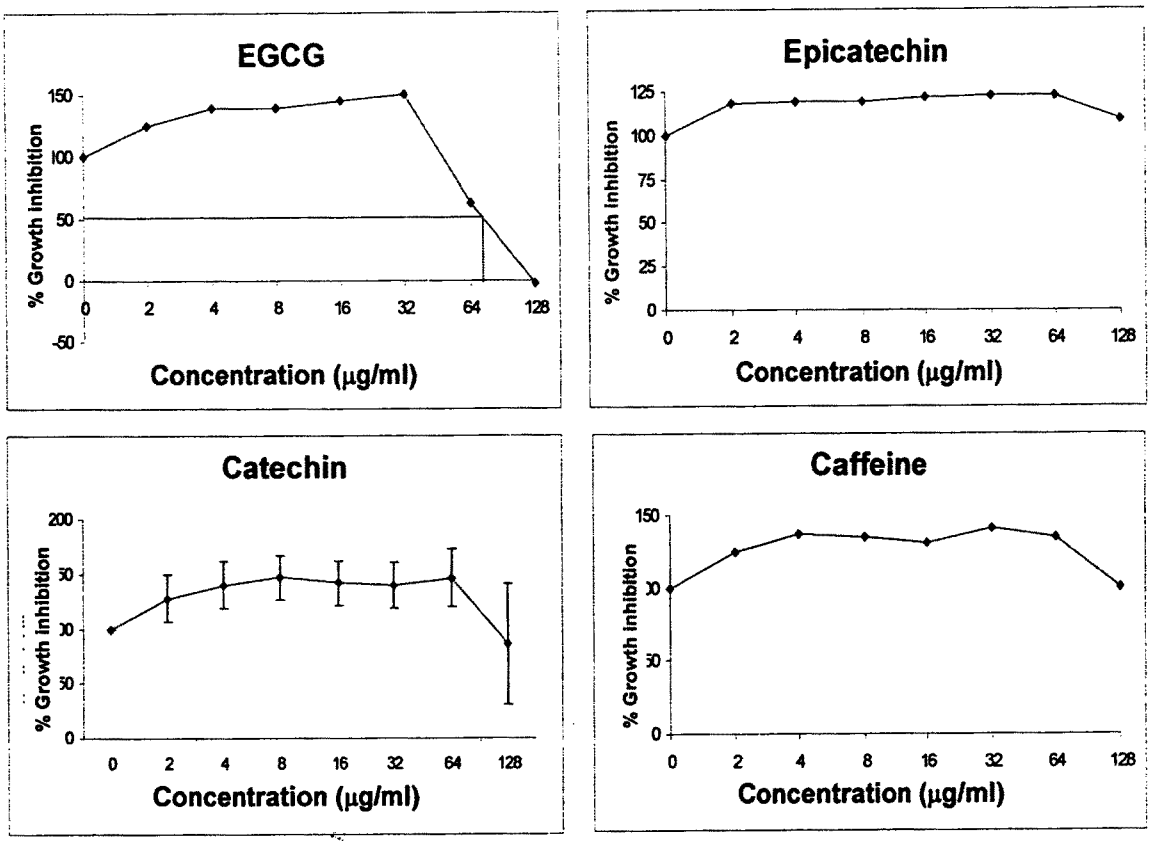
เราเริ่มต้นจากทดสอบสารสกัดสมุนไพร ซึ่งได้แก่ สารสกัดจากขิงในชั้น Acetone และชั้น Ethanol, สารสกัดจากกระเพราโดยการใช้ไอน้ำ, สารสกัดจากข่าในชั้น Dichlromethane, และสารสกัดจากไพลโดยการใช้ไอน้ำ นอกจากนั้น เรายังทดสอบสารบริสุทธิ์จากชา ซึ่งได้แก่ Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin และ Caffeine ผลการศึกษาแสดงในรูป 3.8 - 3.9 และ ตารางสรุปรวม ค่า IC_{50} แสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2

ในช่วงปี พ.ศ. 2551 ทางกลุ่มวิจัยเราได้ติดต่อ ผศ.ดร. วิลาศ พุ่มพิมล จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง ให้เข้าร่วมในโครงการ โดยรับผิดชอบในการสกัดสารจากพืชสิบชนิด โดยใช้สารละลายที่มีขั้วแตกต่างกันสี่ชนิด เรียงจากน้อยไปหามาก ดังนี้ Hexane, Ethyl acetate, Acetone, และ Methanol โดยเราได้ทำการทดสอบความ

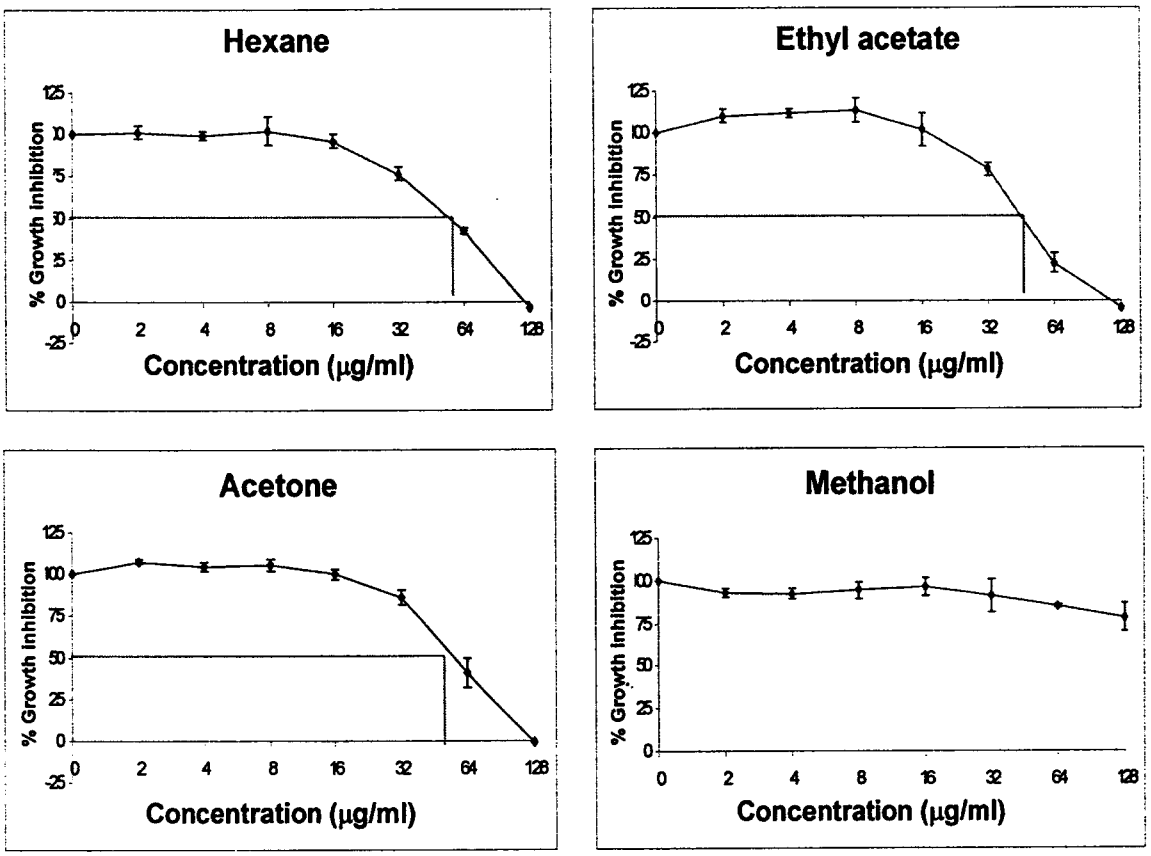
เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Sulforhodamine B assay ไปแล้วเจ็ดชนิด ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale*), จิงโจ้ (*Capparis micracantha*), ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum*), หัวยาข้าวเย็น (*Smilax micro-china*), หมากดิบน้ำค้าง (*Hedyotis biflora*), กระเจียน (*Polyalthia cerasoides*), และ มะคำไก่ (*Drypetes roxburghii*) ดังผลที่แสดงในรูป 3.10 – 3.16 และ ตารางสรุปรวมค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 3.3



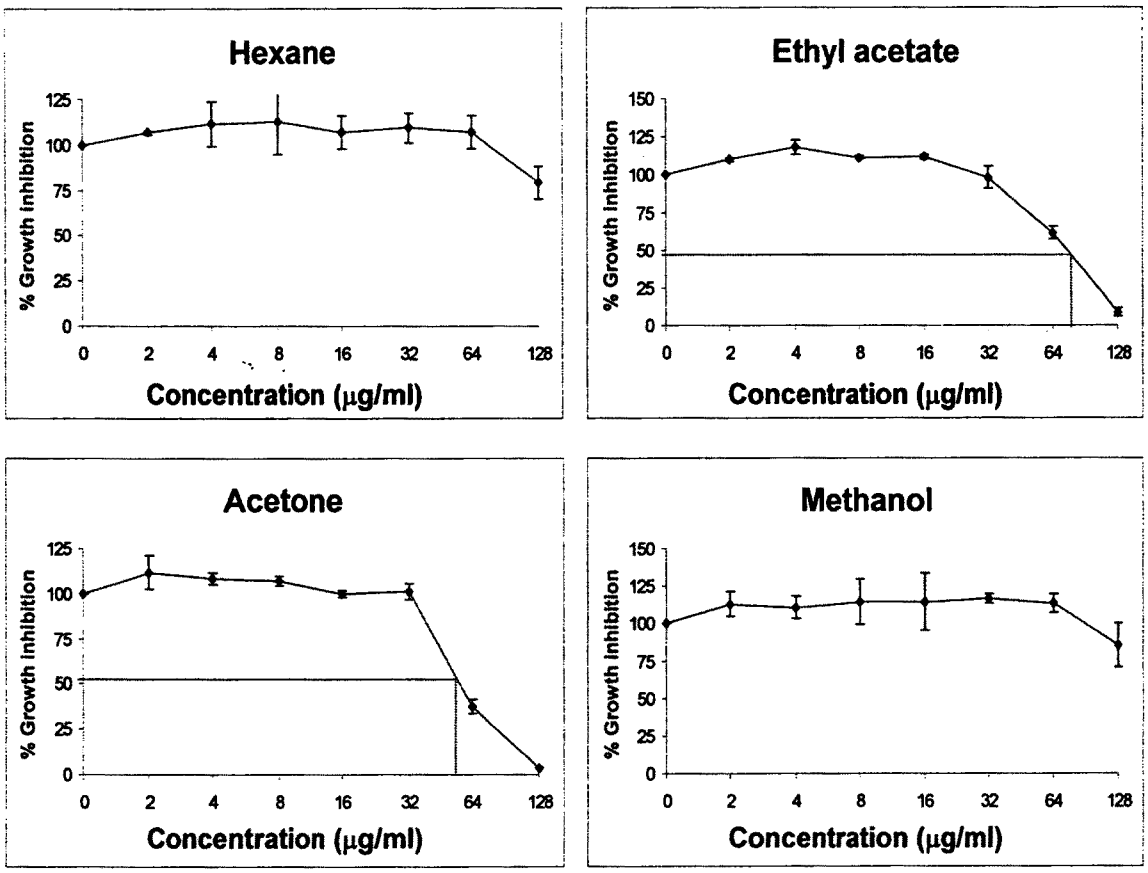
รูปที่ 3.8: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากข่า ไพล หรือกระเพราต่อเซลล์มะเร็งปอด A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay



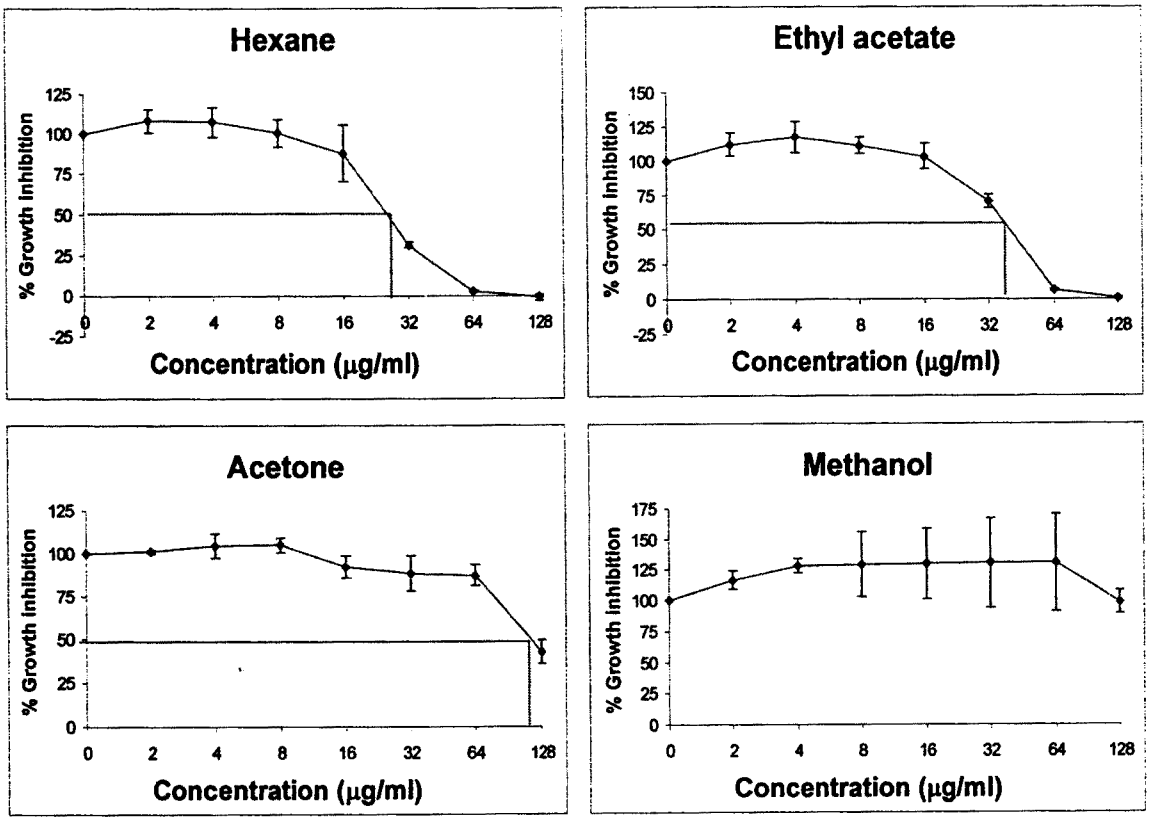
รูปที่ 3.9: ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากชา (*Camellia sinensis*) ต่อเซลล์มะเร็งปอด A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารสกัดบริสุทธิ์จากชาชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay



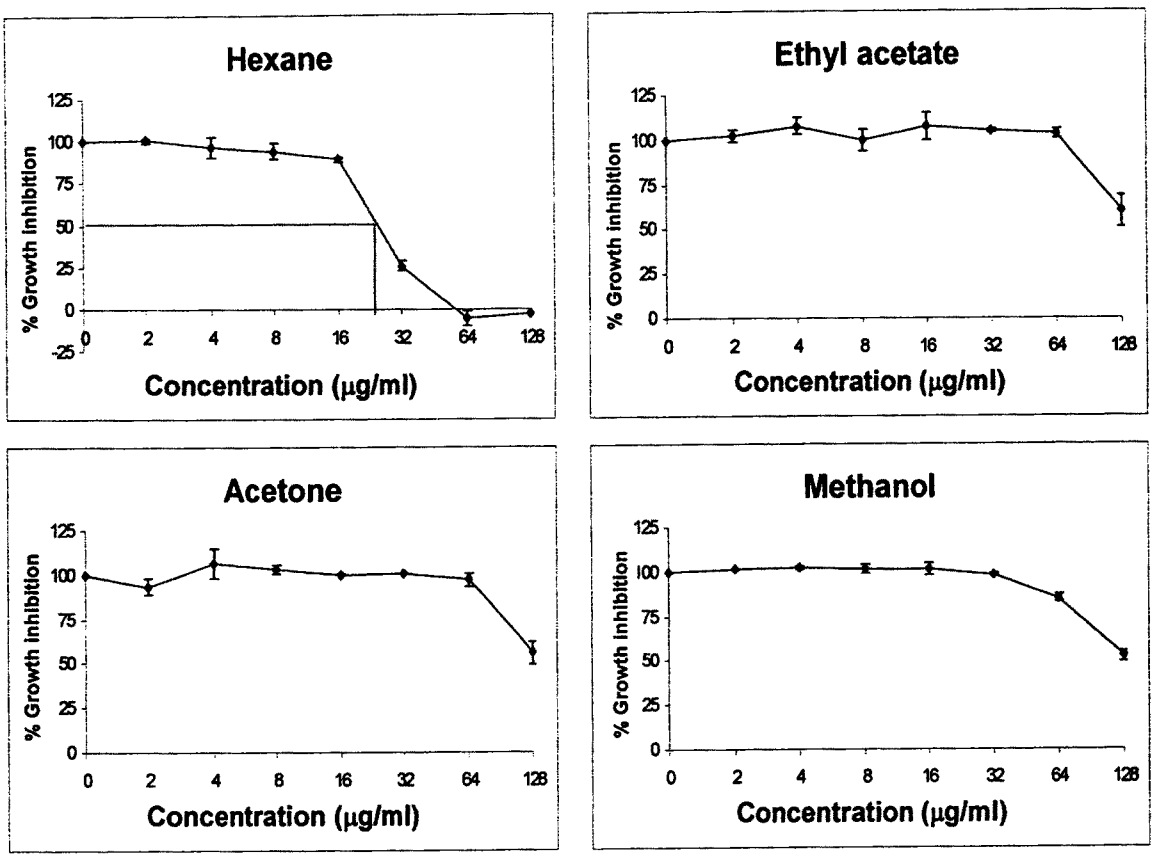
รูปที่ 3.10: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดขิง** (*Zingiber officinale*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay



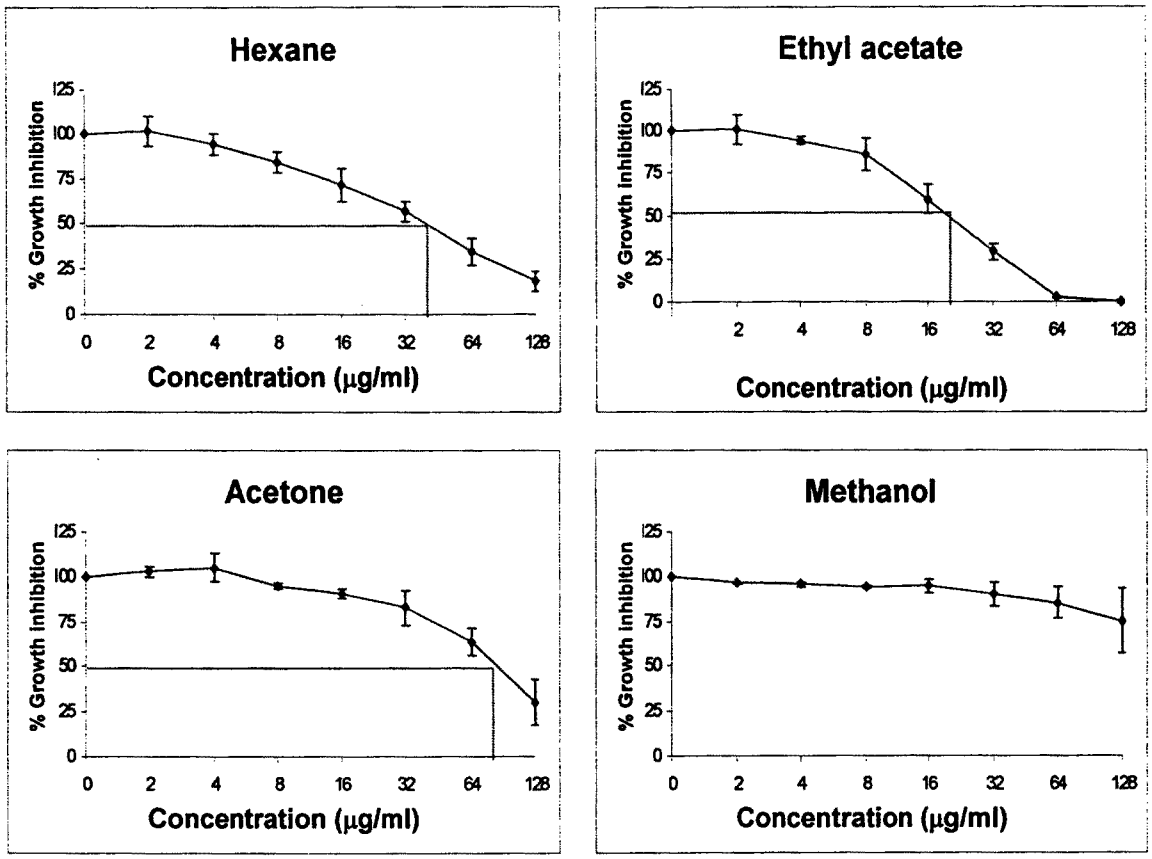
รูปที่ 3.11: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจิงโจ้** (*Capparis micracantha*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay (ผลจากการทดลองเพียงหนึ่งครั้ง)



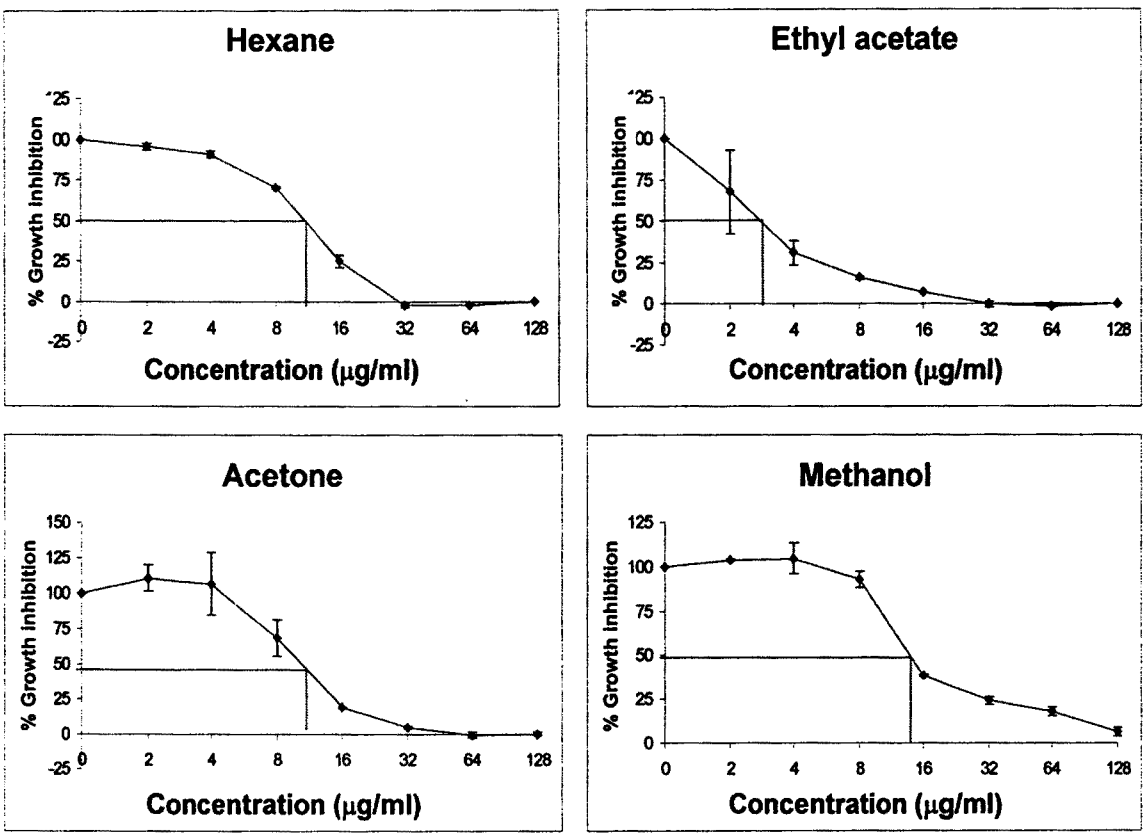
รูปที่ 3.12: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดขันทองพยาบาท** (*Suregada multiflorum*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay (ผลจากการทดลองเพียงหนึ่งครั้ง)



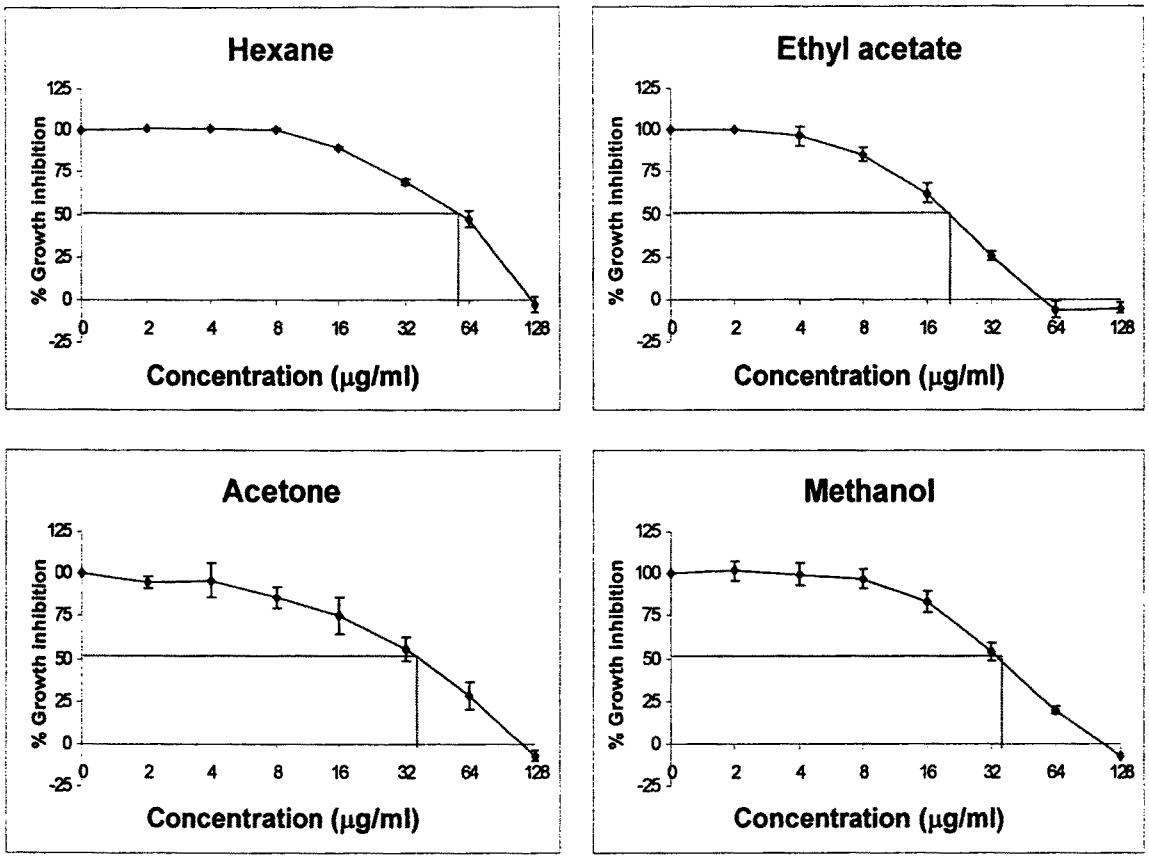
รูปที่ 3.13: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหัวยาข้าวเย็น** (*Smilax micro-china*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay



รูปที่ 3.14: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหมากดิบน้ำค้าง** (*Hedyotis biflora*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay



รูปที่ 3.15: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดกระเจียน** (*Polyalthia cerasoides*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay (ผลจากการทดลองเพียงหนึ่งครั้ง)



รูปที่ 3.16: **ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะคำไก่** (*Drypetes roxburghii*) **ต่อเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI Medium 1640 ที่มี 10% FCS และสารที่สกัดได้ใน Hexane, Ethyl acetate, Acetone, หรือ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ % Growth inhibition โดย SRB assay

ตารางที่ 3.1: ค่า IC_{50} จากสารสกัดข่า ไพล และ กระเพราต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ชื่อพืช	IC_{50} (µg/ml)*		
	Dichloromethane	Ethanol	ไอน้ำ
ข่า (*Alpinia galanga*)	2.5-5	>150	-
ไพล (*Zingiber cassumunar*)	-	-	>150
กระเพรา (*Ocimum sanctum*)	-	-	>150

ตารางที่ 3.2: ค่า IC_{50} จากสารบริสุทธิ์ในชาต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ชื่อพืช	IC_{50} (µg/ml)*			
	EGCG	Epicatechin	Catechin	Cafeine
ชา (*Camellia sinensis*)	64-128	>128	>128	>128

ตารางที่ 3.3: ค่า IC_{50} จากสารสกัดพืชเจ็ดชนิดในสารละลายที่มีขั้วต่างกันสี่ชนิดต่อเซลล์มะเร็งปอด A549

ชื่อพืช	IC_{50} (µg/ml)*			
	Hexane	Ethyl acetate	Acetone	Methanol
ขิง (*Zingiber officinale*)	32-64	32-64	32-64	>128
จิงโจ้ (*Capparis micracantha*)	>128	64-128	32-64	>128
ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum*)	16-32	32-64	64-128	>128
หัวยาข้าวเย็น (*Smilax micro-china*)	16-32	>128	>128	>128
หมากดิบน้ำค้าง (*Hedyotis biflora*)	32-64	16-32	64-128	>128
กระเจียน (*Polyalthia cerasoides*)	8-16	2-4	8-16	8-16
มะคำไก่ (*Drypetes roxburghii*)	32-64	16-32	32-64	32-64

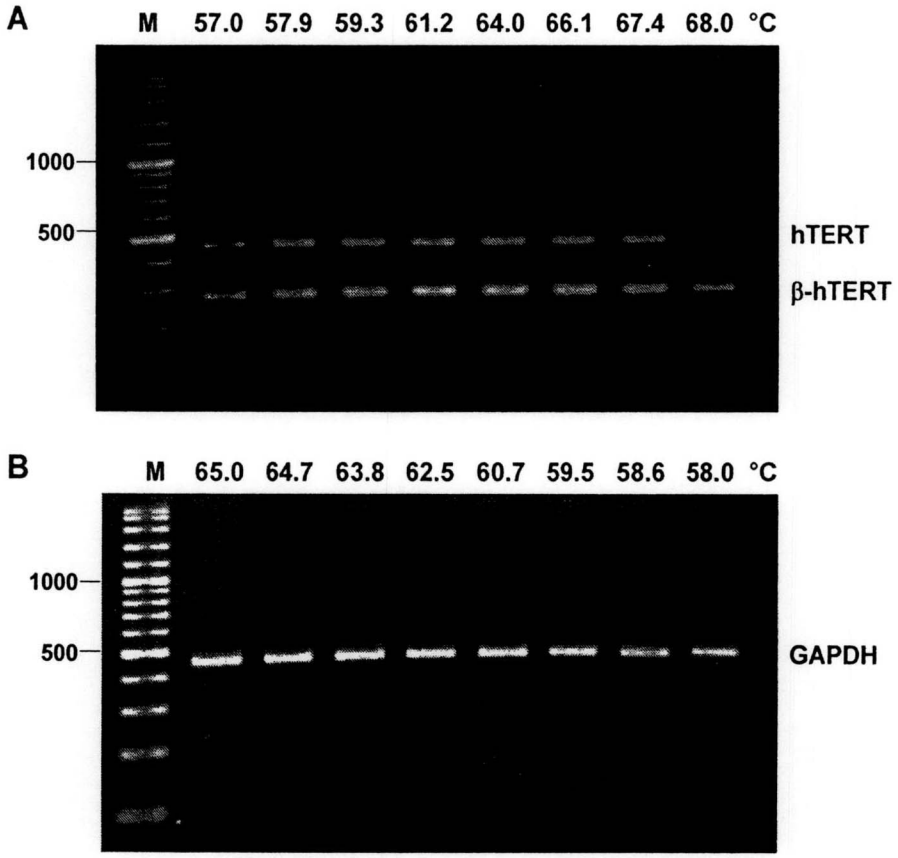
* เป็นค่าระหว่างความเข้มข้นสองจุดที่ทำการทดลอง

ผลการทดลองที่ 4: การศึกษาผลของสารสกัดขิงต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR

ในเบื้องต้น เราได้ทำการทดสอบสารสกัดจากขิงในชั้น Acetone และชั้น Ethanol, สารสกัดจากกระเพราโดยการใช้ไอน้ำ, สารสกัดจากข่าในชั้น Dichlromethane, และสารสกัดจากไพลโดยการใช้ไอน้ำ รวมทั้งสารบริสุทธิ์จากชา ซึ่งได้แก่ Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin และ Cafeine เราพบว่า มีเพียงสารสกัดจากขิงในชั้น Acetone เท่านั้น ที่ให้ผลในการลดการแสดงออกของยีน *hTERT* ในเซลล์มะเร็งปอด A549 ดังนั้น การทดลองต่อไป เราจึงมุ่งเน้นไปยังสารสกัดจากขิง โดยเราได้ทำการสกัดสารจากขิงในสารละลายต่างๆสี่ชนิด ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate, Acetone, และ Methanol และนำมาทดสอบผลในการลดการแสดงออกของยีน *hTERT*

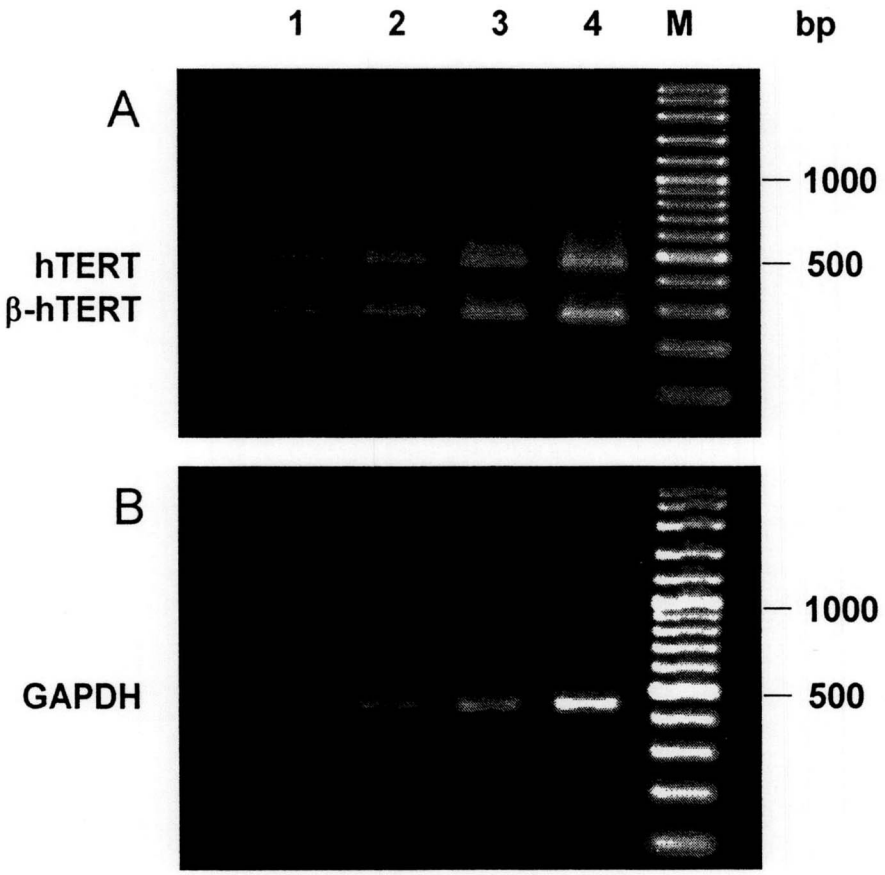
ในขั้นแรก เราทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของ mRNA จากยีน *hTERT* และ ยีน *GAPDH* (ใช้เป็น Internal control) โดยเทคนิค RT-PCR โดย cDNA ที่ได้มาจากการทำ Reverse transcription จาก RNA 1 μg ถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยมีการใช้ Annealing temparature ตั้งแต่ 57.0-68.0 °C ตามลำดับ และใช้จำนวนรอบ 30 รอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR product ของยีน *hTERT* ที่ได้มีขนาด 457 และ 275 bp ส่วน PCR product ของยีน *GAPDH* ที่ได้มีขนาด 452 bp ผลการทดลองดังแสดงในรูป 3.17

ในการทำ Semi-quantitative RT-PCR นั้น ถ้าเราต้องการที่จะสามารถบอกความแตกต่างของจำนวน RNA (หรือ cDNA template) ที่มีอยู่ก่อนทำ PCR จำนวนรอบของ PCR จะต้องอยู่ในช่วง Exponential phase เพื่อที่ปริมาณ PCR product ที่ได้ จะมีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนกับจำนวน RNA (หรือ cDNA template) ที่มีแรกเริ่ม การทดลองในรูปที่ 3.00 เราได้ใช้ RNA ที่สกัดได้ในปริมาณ 0.125, 0.25, 0.5, และ 1 μg เพื่อต้องการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อที่จะสามารถได้ปริมาณ PCR product ที่มีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนกับจำนวน RNA (หรือ cDNA template) ที่มีแรกเริ่ม ผลของการใช้จำนวนรอบของ PCR 30 รอบในการเพิ่มจำนวน cDNA จากยีน *hTERT* (A) และผลของการใช้จำนวนรอบของ PCR 20 รอบในการเพิ่มจำนวน cDNA จากยีน *GAPDH* (B) แสดงได้ในรูป 3.18



รูปที่ 3.17: **ผลของการหา** Annealing temperature **ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน** cDNA **ของยีน** *hTERT* (A) **และยีน** *GAPDH* (B) **โดยวิธี** PCR. cDNA ที่ได้มาจากการทำ Reverse transcription จาก RNA 1 μg ถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยมีการใช้ Annealing temparature ที่อุณหภูมิต่างๆตามที่ระบุ จำนวนรอบที่ใช้สำหรับยีน *hTERT* คือ 30 รอบ ส่วนจำนวนรอบที่ใช้สำหรับยีน *GAPDH* คือ 20 รอบ PCR product ถูกแยกโดย 1.5% Agarose gel electrophoresis PCR product ของยีน hTERT ที่ได้มีขนาด 457 และ 275 bp (Lane M = Standard DNA 100 bp molecular weight maker)

รูปที่ 3.17 แสดงให้เห็นว่า ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *hTERT* โดย PCR Annealing temperature ตั้งแต่ 57.0-68.0 °C สามารถให้ PCR product ที่มีขนาด 457 และ 275 bp โดยไม่พบ Non-specific band อื่น ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *GAPDH* โดย PCR Annealing temperature ตั้งแต่ 58.0-65.0 °C สามารถให้ PCR product ที่ขนาด 452 bp โดยไม่พบ Non-specific band อื่น



รูปที่ 3.18: ผลของการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำ Semi-quantitative RT-PCR จากยีน *hTERT* (A) และยีน *GAPDH* (B) โดยวิธี PCR. cDNA ที่ได้มาจากการทำ Reverse transcription จาก RNA ปริมาณ 0.125, 0.25, 0.5, และ 1 μg (ช่องที่ 1-4) ถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยมีการใช้ Annealing temperature ที่ 66 °C โดยใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณของยีน *hTERT* (A) = 30 รอบ หรือ *GAPDH* (B) = 20 รอบ PCR product ถูกแยกโดย 1.5% Agarose gel electrophoresis PCR product ของยีน hTERT ที่ได้มีขนาด 457 และ 275 bp และสำหรับยีน *GAPDH* มีขนาด 452 bp (Lane M = Standard DNA 100 bp molecular weight maker)

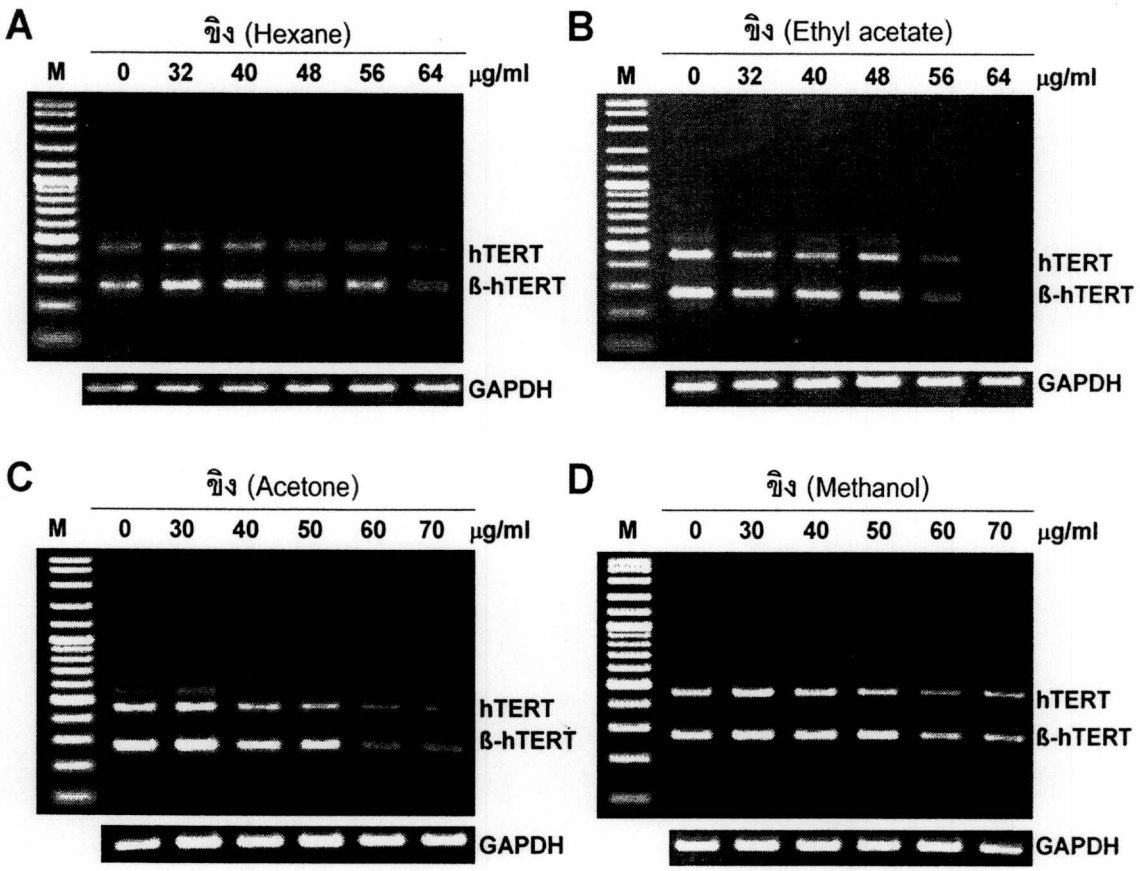
รูปที่ 3.18 แสดงให้เห็นว่า จำนวนรอบของ PCR 30 รอบในการเพิ่มจำนวน cDNA จากยีน *hTERT* (A) และจำนวนรอบของ PCR 20 รอบในการเพิ่มจำนวน cDNA จากยีน *GAPDH* (B) มีความเหมาะสม เนื่องจากปริมาณ PCR product มีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนกับจำนวน RNA (หรือ cDNA template) ที่มีแรกเริ่มอย่างชัดเจน และแสดงว่าจำนวนรอบของ PCR ที่เลือก ยังอยู่ในช่วง Exponential phase

เมื่อเราได้สภาวะที่เหมาะสม ในการทำ RT-PCR แล้ว เราก็นำเอาสารสกัดขิงในทั้งสี่ส่วน (Hexane, Ethyl acetate, Acetone, Methanol) มาทำการทดสอบผลต่อการแสดงออกของยีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยทำการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดในปริมาณต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัด RNA มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *hTERT* เทียบกับ *GAPDH* ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม โดยวิธี RT-PCR

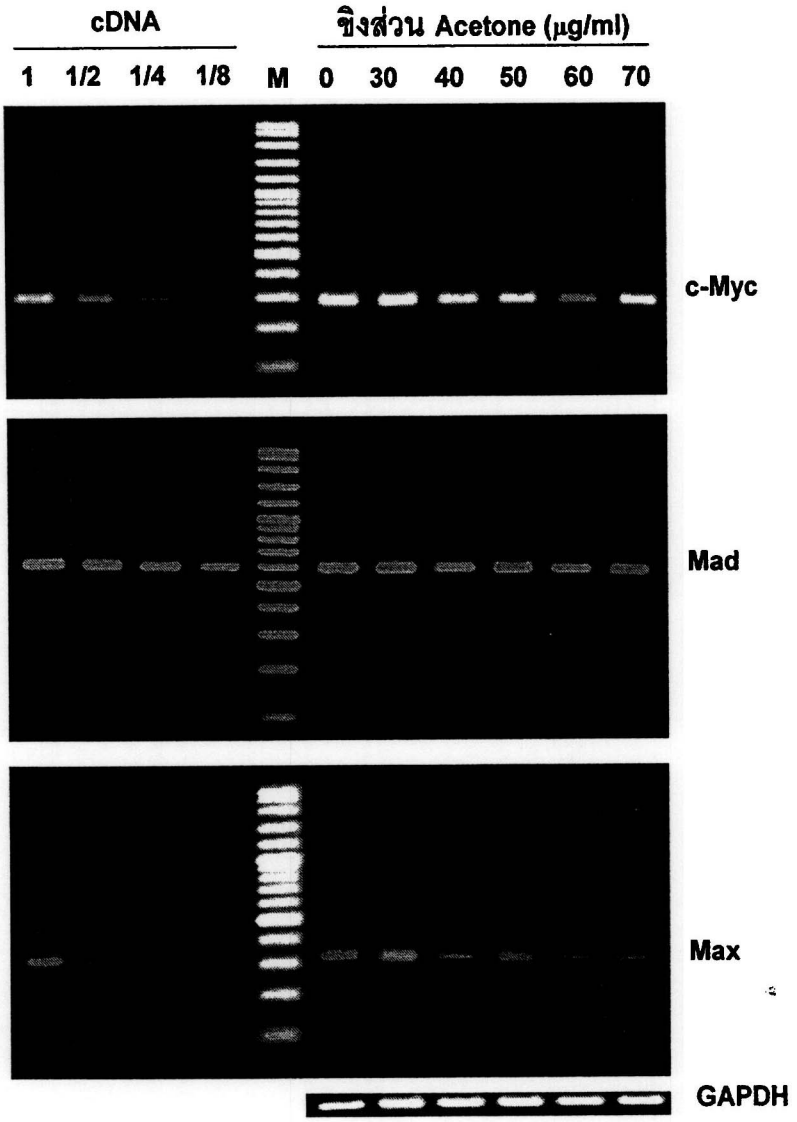
ผลในรูปที่ 3.19 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดในส่วนของ Hexane และ Methanol ไม่ส่งผลให้มีความแตกต่างในการแสดงออกของยีน *hTERT* อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่สารสกัดในส่วนของ Ethyl acetate และส่วนของ Acetone มีการลดการแสดงออกของยีน *hTERT* อย่างชัดเจน และเป็นไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ ดังนั้น สารสกัดในส่วนของ Ethyl acetate และส่วนของ Acetone น่าจะมีสารที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *hTERT* ทั้งนี้ ให้สังเกตว่า การแสดงออกของยีน *GAPDH* ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน (ในสภาวะที่ใช้จำนวนรอบของ PCR เพียง 20 รอบ เท่ากับผลการทดลองในรูป 3.18 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของปริมาณ RNA template ได้)

นอกจากยีน *hTERT* แล้ว เรายังทำการศึกษาผลของสารสกัดในส่วนของ Acetone ต่อยีน *c-Myc*, ยีน *Mad*, และ ยีน *Max* ยีนสามชนิดนี้ สร้าง Transcription factor ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน *hTERT* โดย *c-Myc* จะรวมตัวกับ Max แล้วไปจับที่ E-box บนโปรโมเตอร์ของ hTERT ทำให้มีการแสดงออกของยีน *hTERT* มากขึ้น ในขณะที่ การเพิ่มการแสดงออกของ *Mad* ซึ่งจะไปจับกับ Max แล้วไปจับที่ E-box เช่นกัน กลับทำให้มีการแสดงออกของยีน *hTERT* น้อยลง [22]

เราได้นำ cDNA ชุดเดียวกับผลในรูป 3.19 C ซึ่งเป็นผลของสารสกัดในส่วนของ Acetone ต่อการแสดงออกของยีน *hTERT* เพื่อมาดูผลต่อยีน *c-Myc*, *Mad*, และ *Max* โดยวิธี RT-PCR ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 3.20



รูปที่ 3.19: ผลของสารสกัดขิงต่อการแสดงออกของยีน *hTERT* ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี RT-PCR. เซลล์มะเร็งปอด A549 บ่มร่วมกับสารสกัดขิงที่สกัดได้ในขั้นต่างๆ (A = Hexane, B = Ethyl acetate, C = Acetone, D = Methanol) ในปริมาณต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัด RNA ปริมาณ 1 µg ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี Reverse transcription แล้วนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณของยีน *hTERT* (30 รอบ) และ *GAPDH* (20 รอบ) โดยวิธี PCR หลังจากนั้น PCR product ถูกแยกโดย 1.5% Agarose gel electrophoresis PCR product ของยีน *hTERT* ที่ได้มีขนาด 457 และ 275 bp และสำหรับยีน *GAPDH* มีขนาด 452 bp (Lane M = Standard DNA 100 bp molecular weight maker)



รูปที่ 3.20: **ผลของสารสกัดขิงในส่วน** Acetone **ต่อการแสดงออกของยีน** *c-Myc*, *Mad*, **และ** *Max* **ในเซลล์มะเร็งปอด** A549 **โดยวิธี** RT-PCR. เซลล์มะเร็งปอด A549 บ่มร่วมกับสารสกัดขิงในส่วน Acetone ในปริมาณต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัด RNA ปริมาณ 1 μg ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี Reverse transcription แล้วนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณของยีน *c-Myc* (25 รอบ), *Mad* (30 รอบ), *Max* (25 รอบ) และ *GAPDH* (20 รอบ) โดยวิธี PCR หลังจากนั้น PCR product ถูกแยกโดย 1.5% Agarose gel electrophoresis PCR product ที่ได้มีขนาด ดังนี้ : *c-Myc* = 290 bp, *Mad* = 592 bp, *Max* = 333 bp และ *GAPDH* = 452 bp (Lane M = Standard DNA 100 bp molecular weight maker) ทางด้านซ้ายของแต่ละรูป แสดงให้เห็นผลของการทำ PCR ของแต่ละยีน ในจำนวนรอบที่ใช้ เมื่อมีปริมาณ cDNA ที่แตกต่างกันเป็นจำนวนเท่าของที่ใช้ในการทดลอง

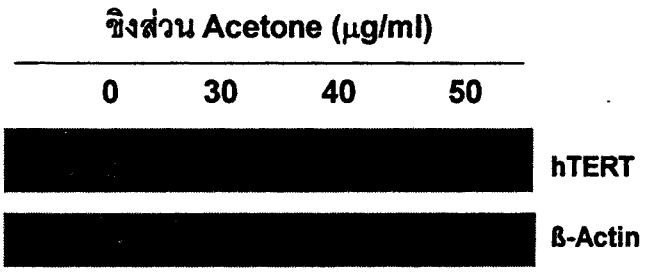
ผลในรูปที่ 3.20 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดขิงในส่วน Acetone มีการลดการแสดงออกของยีน *c-Myc* ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ ในช่วงความเข้มข้น จาก 0-60 μg/ml แต่กลับเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 70 μg/ml คาดว่า น่าจะเป็นการผิดพลาดจากการทดลอง ซึ่งเราจะได้ทำการทดลองซ้ำดูอีก สำหรับผลของสารสกัดขิงในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของยีน *Mad* เราไม่สังเกตเห็นการลดการแสดงออกของยีน *Mad* แต่มีข้อสังเกตว่า จำนวนรอบที่เราใช้ในกระบวนการ PCR สำหรับยีนนี้ (30 รอบ) อาจจะมากเกินไป เนื่องจาก เมื่อมี cDNA template ลดลง แถบ PCR product ที่ได้ ไม่ได้ลดลงชัดเจนนัก สำหรับผลของสารสกัดขิงในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของยีน *Max* เราไม่สังเกตเห็นการลดการแสดงออกของยีน Max ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้

การทดลองเท่าที่ผ่านมา เป็นการทดลองเริ่มแรกเท่านั้น หลังจากนี้ เราจะได้ทำการแยกสกัดสารออกจากชั้น Acetone และ Ethyl acetate ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แล้วนำมาทดสอบอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งคาดว่าน่าจะได้ผลที่ดียิ่งขึ้น ในปริมาณของสารที่ลดลง

ผลการทดลองที่ 5: การศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าขิงต่อการแสดงออกของโปรตีน hTERT ในเซลล์มะเร็งปอด A549 โดยวิธี Western blot

จากการทดลองที่ 4 ตามรูปที่ 3.19 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดขิงในส่วนของ Ethyl acetate และส่วนของ Acetone มีการลดการแสดงออกของยีน *hTERT* ในระดับ mRNA ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ ในเซลล์มะเร็งปอด A549 เราจึงทำการศึกษา เพิ่มเติมว่า สารสกัดขิงในส่วนของ Acetone มีผลลดปริมาณของ hTERT protein หรือไม่ เพื่อเป็นการยืนยันผลในทั้งสองระดับ

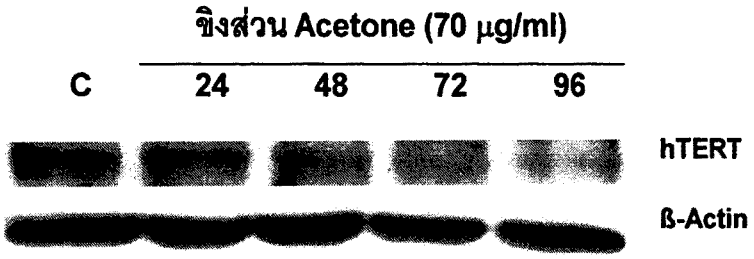
รูปที่ 3.21 แสดงผลของการทำ Western blot analysis เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของ hTERT protein ในในเซลล์มะเร็งปอด A549 ภายหลังการบ่มกับสารสกัดขิงในส่วนของ Acetone เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้โปรตีน Beta-actin ซึ่งเป็น house keeping gene เป็นโปรตีนควบคุมปริมาณ (internal control) เพื่อยืนยันปริมาณโปรตีนที่ทำการทดสอบว่ามีปริมาณที่เท่ากัน



รูปที่ 3.21: ผลของความเข้มข้นของสารสกัดขิงในส่วน Acetone ต่อการแสดงออกของ hTERT protein ในเซลล์มะเร็งปอด A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 บ่มร่วมกับสารสกัดขิงในส่วน Acetone ในปริมาณต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะสกัดเอาโปรตีนมาทำการวิเคราะห์หา hTERT protein โดย Western blot analysis โปรตีน hTERT มีขนาด 127 KDa

รูปที่ 3.21 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ hTERT protein มีจำนวนน้อยลง เมื่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ถูกบ่มด้วยสารสกัดขิงในส่วนของ Acetone เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ให้ ดังนั้น สารสกัดในส่วนของ Acetone น่าจะมีสารที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *hTERT*

เราได้ศึกษาต่อไปว่า เมื่อทำการบ่มสารสกัดขิงในส่วนของ Acetone ในปริมาณ 70 μg/ml เป็นเวลาต่างๆกัน ผลที่ได้จะมีการลดลงของ hTERT protein ตามเวลาในการบ่มหรือไม่ ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 3.22



รูปที่ 3.21: **ผลของเวลาในการบ่มสารสกัดขิงในส่วน** Acetone **ต่อการแสดงออกของ** hTERT protein **ในเซลล์มะเร็งปอด** A549. เซลล์มะเร็งปอด A549 บ่มร่วมกับสารสกัดขิงในส่วน Acetone ในปริมาณ 70 μg/ml เป็นเวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ก่อนที่จะสกัดเอาโปรตีนมาทำการวิเคราะห์หา hTERT protein โดย Western blot analysis โปรตีน hTERT มีขนาด 127 KDa