

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

ผลการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนตามวิธีการในหัวข้อ 3.1 ซึ่งมีการทดลอง 3 ขั้นตอนได้ผลดังนี้

4.1.1 ผลการคัดเลือกเซลล์เชื้อสายเป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

ผลการคัดเลือกเซลล์เชื้อสายทั้ง 3 คือ HeLa, MCF-7 และ MDA-MB-231 ที่มีการตอบสนองต่อการรับกระตุ้นเมื่อได้รับ 17β -estradiol ตามวิธีการข้อ 3.1.1 ข้อ จเมื่อเซลล์ได้รับสารตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว (72 ชั่วโมง) นำมาตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค SRB แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารควบคุมโดยคิดเป็นร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ได้ผลดังนี้

(1) เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa

เมื่อเซลล์ได้รับ 17β -estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-18} , 10^{-16} , 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-5} M พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 84, 78, 74, 71, 68, 63, 61 และ 56 ตามลำดับ จะเห็นว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวที่ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของ 17β -estradiol เพิ่มขึ้น แสดงถึงความเป็นพิษของ 17β -estradiol ต่อเซลล์(ดังภาพ4.1)

(2) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเต้านม MCF-7

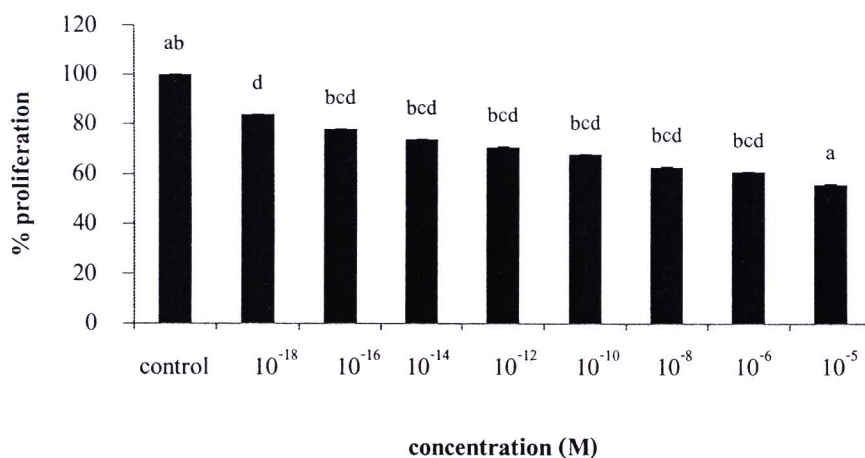
เมื่อเซลล์ได้รับ 17β -estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-18} , 10^{-16} , 10^{-14} และ 10^{-12} M พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 178.98, 184.80, 197.78 และ 210.82 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นที่มากขึ้นหรืออาจกล่าวได้ว่าในช่วงระดับความเข้มข้นของ 17β -estradiol ระหว่าง 10^{-8} - 10^{-12} M เซลล์ได้รับการกระตุ้นให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวนตามความเข้มข้นและ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-5} M จะเห็นว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวลดลง

ผลการแบ่งตัวที่ลดลงเท่ากับ 162.28, 144.44, 135.96 และ 96.49 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวลดลงตามลำดับความเข้มข้นที่มากขึ้น(ดังภาพ 4.2)ซึ่งกล่าวได้ว่าความเข้มข้นที่มากกว่า 10^{-12} M จะเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7

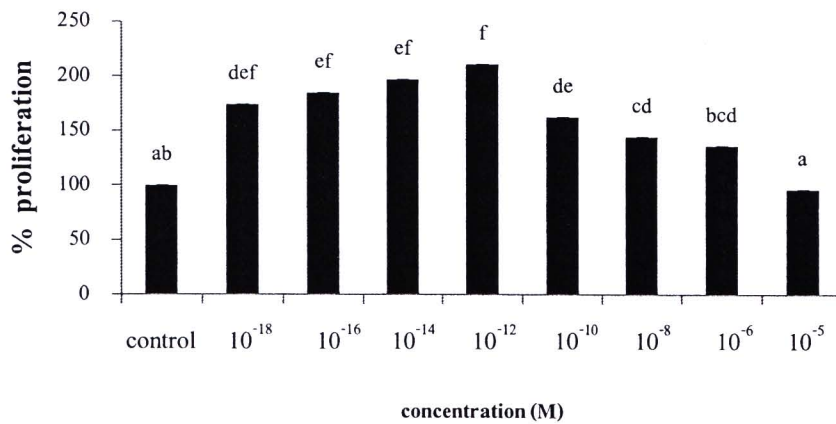
(3) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเต้านม MDA-MB-231

เมื่อเซลล์ได้รับ 17β -estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-18} , 10^{-16} , 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-5} M พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 90, 85, 73, 70, 64, 48, 43 และ 29 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวที่ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า 17β -estradiol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะคล้ายกับที่พบจากการทดลองในเซลล์ HeLa (ดูข้อ 4.1.1 (1)) (ดังภาพ 4.3)

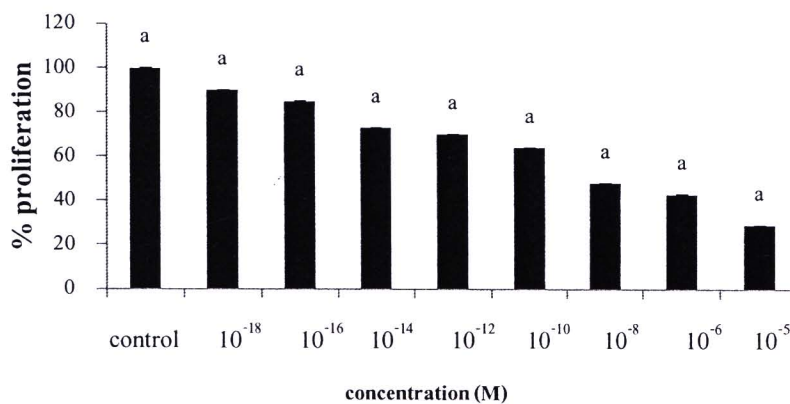
ดังนั้นจากการทดลองทั้ง 3 ข้อข้างต้นนี้ทำให้สามารถเลือกเซลล์ MCF-7 เพื่อใช้เป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนในอีก 2 ขั้นตอนย่อยต่อไป ทั้งนี้เนื่องจาก MCF-7 มีความชัดเจนในการตอบสนองต่อการกระตุ้นของ 17β -estradiol มากกว่าเซลล์อีก 2 เชื้อสาย



ภาพ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่ เซลล์ HeLa ได้รับ 17β -estradiol แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ4.2 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ 17β -estradiolแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ4.3 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่ เซลล์ MDA-MB-231 ได้รับ 17β -estradiolแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.1.2 ผลการทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐาน

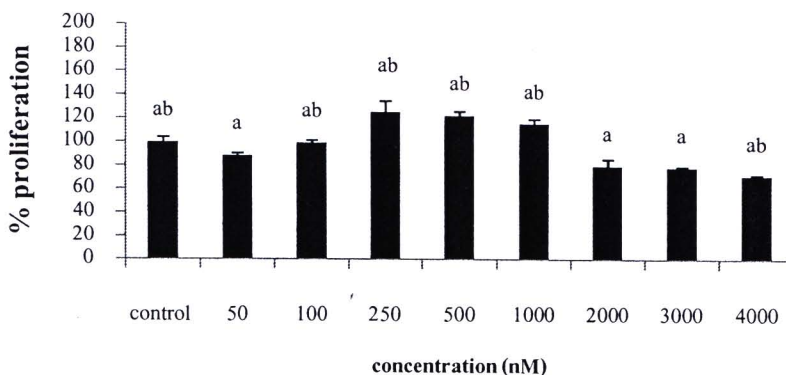
ผลการทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐานต่อเซลล์ MCF-7 (ดูข้อ 3.1.2) โดยศึกษาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7 ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.2 ข้อ 2 เมื่อเซลล์ได้รับสารมาตรฐานแล้วจึงนำเซลล์มาตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค SRB แล้วนำไปวิเคราะห์ดูการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตัวควบคุมโดยคำนวณเป็นร้อยละการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ได้ผลดังนี้

(1) aldrin (AD)

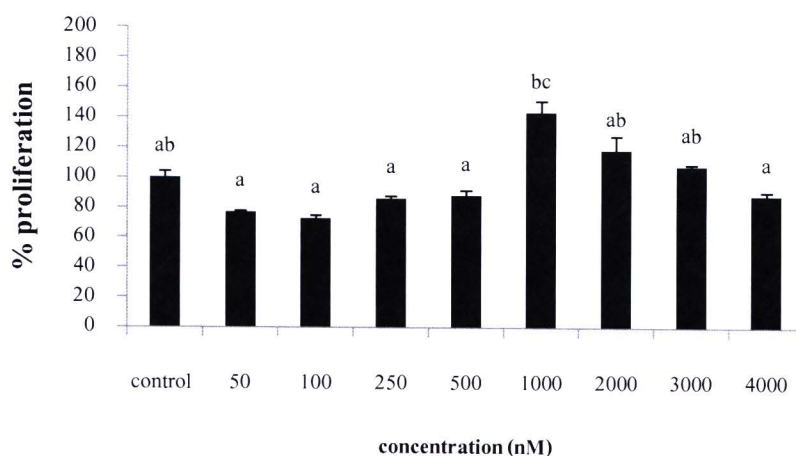
ผลการทดสอบ aldrin ต่อเซลล์ MCF-7 (ภาพ 4.4) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 250 nM พบว่าเซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนเท่ากับ 88.40, 99.20 และ 125.20 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 nM เซลล์มีร้อยละของจำนวนที่ลดลงตามลำดับ คือ 122.20, 115.40, 79.80, 78.60 และ 71.60 โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดคือ 250 nM ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า aldrin ที่ความเข้มข้นเท่ากับและมากกว่า 250 nM เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ถ้าน้อยกว่า 250 nM จะกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน

(2) endrin (ED)

ผลการทดสอบ endrin ต่อเซลล์ MCF-7 (ภาพ 4.5) ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 1,000 nM พบว่า เซลล์มีร้อยละของการเพิ่มจำนวนเท่ากับ 77, 72.60, 86.20, 88 และ 143.60 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีร้อยละของการเพิ่มจำนวนตามระดับความเข้มข้นของ endrin ที่เพิ่มมากขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 2,000, 3,000 และ 4,000 nM มีค่าร้อยละของจำนวนลดลงมีค่าเท่ากับ 118.40, 107.80 และ 88.20 ตามลำดับ โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดคือ 1,000 nM ดังนั้นความเข้มข้นของ endrin ที่เท่ากับและมากกว่า 1,000 nM เป็นพิษต่อเซลล์แต่ถ้าน้อยกว่าจะกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์



ภาพ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ aldrin(AD) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



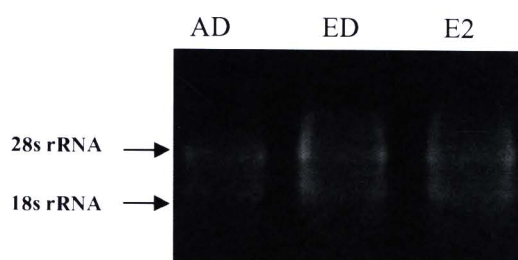
ภาพ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ endrin (ED) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.1.3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันว่าการตอบสนองของเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานตามวิธีการข้อ 3.1.3 เป็นการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถีเอสโตรเจนหรือไม่ แสดงผลเป็นขั้นตอนดังนี้

ก. ผลการสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ RNA

หลังจากที่เซลล์ MCF-7 ได้รับสารตัวอย่าง aldrin, endrin และ 17β -estradiol ตามลำดับ ตามวิธีการข้อ 3.1.3 ข้อ ก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัด RNA ด้วย Trizol® reagent และตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วย 1.5% agarose gelelectrophoresis ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ข ปรากฏผลดังภาพ 4.6



ภาพ 4.6 ผลการสกัด RNA จากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ aldrin (AD), endrin (ED) และ 17β -estradiol (E2) ตามลำดับ

จากการตรวจหา RNA จะเห็นว่าพบแถบ RNA 2 แถบ คือ 28s และ 18s โดยแถบของ 28s rRNA จะมีความเข้มมากกว่า 18s rRNA ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่า 2 เท่า แสดงว่าประสบความสำเร็จในการสกัด RNA ถึงแม้ว่าแถบของ RNA นี้จะมีลักษณะต่อเนื่องไม่คมชัด หรือที่เรียกว่า smear ซึ่งแสดงว่ามีการสูญเสียสภาพ (degrade) ของ RNA ไปบ้าง แต่ไม่ใช่ทั้งหมด และ RNA ที่สกัดได้จะต้องทำการเปลี่ยนให้เป็น cDNA ทันที เนื่องจากลดการสูญเสียสภาพ ทั้งนี้เพราะ RNA มีลักษณะเป็นสายเดี่ยวมีความไม่เสถียร สามารถสลายตัวได้ง่าย

ข. ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA

RNA ที่สกัดได้จากข้อ ก จะถูกเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV[®] Revertid reverse transcriptase (ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ค) จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ cDNA ที่เกิดขึ้นโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณตามสูตร ในหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ง ได้ผลดังแสดงในตาราง 4.1 จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm อยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่ามีความบริสุทธิ์สูง

ตาราง 4.1การวัดค่าดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA

ชื่อสารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ของตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสง		ค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ความเข้มข้น DNA (ng/ml)
		260 nm	280 nm		
Aldrin(AD)	250 nM	0.078	0.040	1.95	1,560
Endrin(ED)	1000 nM	0.063	0.035	1.80	1,260
17β-estradiol(E2)	10 ⁻¹² M	0.076	0.0042	1.80	1,520

ค. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

นำค่าปริมาณ cDNA ทั้งหมดที่คำนวณได้จากผลการทดลอง ข้อ ข มาใช้ในการปรับความเข้มข้นของปริมาณ cDNA เริ่มต้นให้เป็น 100 ng/ml จากนั้นนำมาตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) จากนั้นจึงตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วนำไปตรวจวัดค่าความสว่างของแถบ PCR product (band intensity) โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (ดูข้อ 3.1.3 ข้อ ฉ) นำค่าที่

ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนของการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี normalization (ภาคผนวก ข) โดยเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน β -actin ยีนในชุดควบคุม จากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ (ข้อ 3.1.3 ข้อ ข) ปรากฏว่าสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน รายละเอียดผลการทดลอง ดังนี้

(1) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับ aldrin

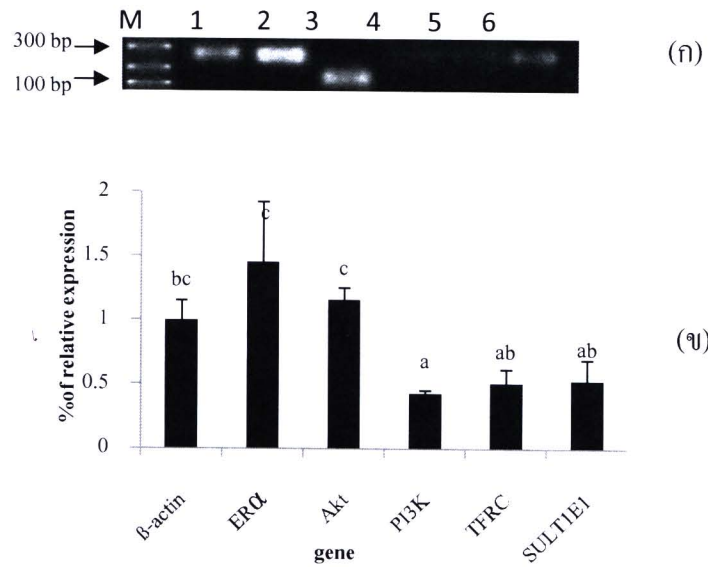
วิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* มีค่าเท่ากับ 1.45, 1.15, 0.43, 0.50 และ 0.53 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ER α* สูงสุด รองลงมาคือ *Akt*, *SULT1E1*, *TFRC* และ *PI3K* ตามลำดับ (ดังภาพ 4.7)

(2) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับ endrin

ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* มีค่าเท่ากับ 1.38, 0.88, 0.29, 0.50 และ 0.29 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *ER α* สูงสุด รองลงมาคือ *Akt*, *TFRC*, *SULT1E1* และ *PI3K* ตามลำดับ (ดังภาพ 4.8)

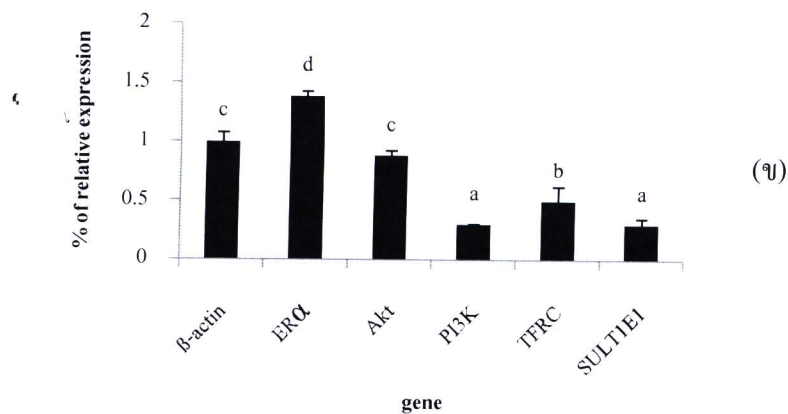
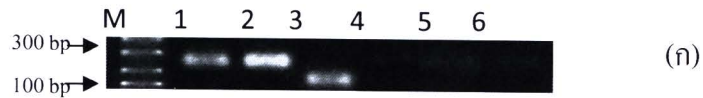
(3) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับ 17 β -estradiol

ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* มีค่าเท่ากับ 1.44, 0.94, 1.14, 0.25 และ 0.30 ตามลำดับ จะเห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน *ER α* สูงที่สุด รองลงมาคือ *PI3K*, *Akt*, *SULT1E1* และ *TFRC* ตามลำดับ (ดังภาพ 4.9)



ภาพ 4.7 ผลจากการได้รับ aldrin ของเซลล์ MCF-7

- (ก) PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2= *ERα*, 3= *Akt*, 4= *PI3K*, 5= *TFRC*, 6= *SULT1E1*)
- (ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)

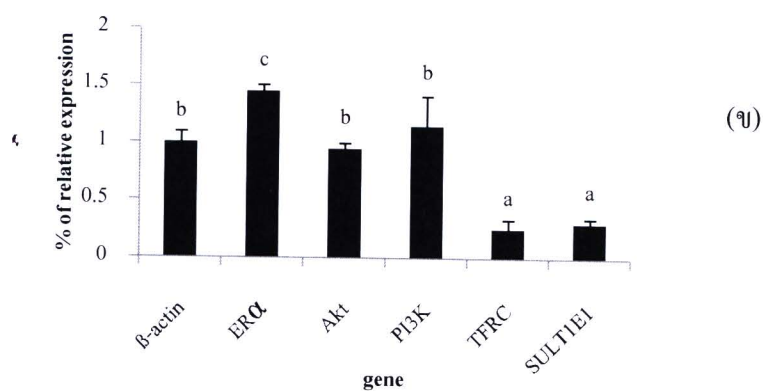


ภาพ 4.8 ผลจากการได้รับ endrin ของเซลล์ MCF-7

- (ก) PCR product การแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β -actin (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1= β -actin, 2= *ER α* , 3= *Akt*, 4= *PI3K*, 5= *TFRC*, 6= *SULT1E1*)
- (ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน β -actin (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



(ก)



(ข)

ภาพ 4.9 ผลจากการได้รับ 17β -estradiol ของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2=*ERα*, 3=*Akt*, 4=*PI3K*, 5=*TFRC*, 6= *SULT1E1*)

(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)

4.2 ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ

ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีการปล่อยน้ำทิ้งลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ ในผลการทดลองนี้ได้แสดงผลเป็นขั้นตอนต่อไปสำหรับการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ โปรดดูหัวข้อ 4.4

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ

ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ ตามวิธีการข้อ 3.2.2 เมื่อเซลล์ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้ง(ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง) แล้วจึงนำเซลล์มาตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค SRB จากนั้นนำไปวิเคราะห์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยคำนวณคิดเป็นร้อยละการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ได้ผลดังนี้

(1) น้ำทิ้งฟาร์มสุกร (PF)

ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร ต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2} และ $10 \mu\text{L/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 98.67, 99.67, 105.14, 105.80, 113.93 และ 116.74 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้น โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ $10 \mu\text{L/ml}$ (ดั่งภาพ 4.10)

(2) น้ำทิ้งฟาร์มวัว (CF)

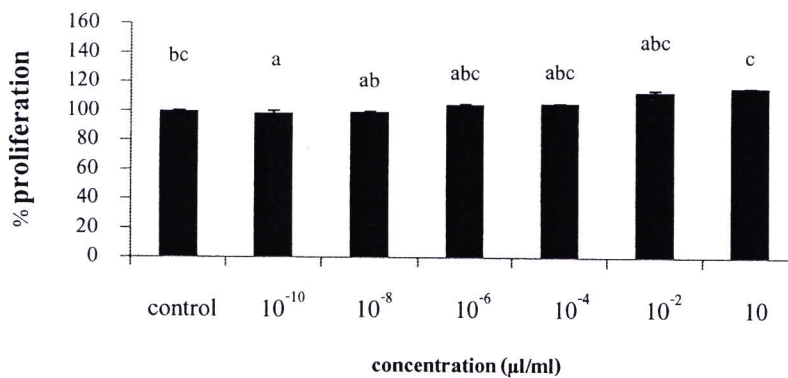
ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มวัว ต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2} และ $10 \mu\text{L/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 81.75, 93.20, 98.83, 101.16, 107.131 และ 111.76 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้น โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ $10 \mu\text{L/ml}$ (ดั่งภาพ 4.11)

(3) น้ำทิ้งฟาร์มกบ (FF)

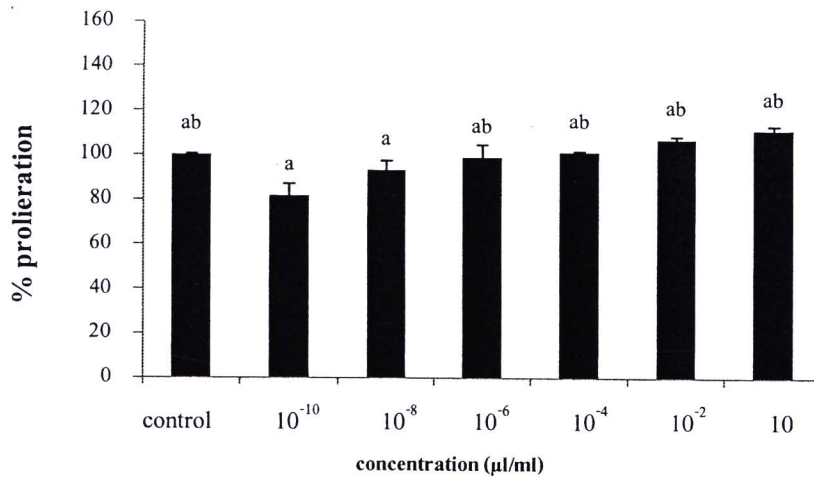
ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มกบต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2} และ $10 \mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 83.38, 85.85, 86.86, 88.16, 96.39 และ 107.64 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นโดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ $10 \mu\text{l/ml}$ (ดังภาพ 4.12)

(4) น้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ (SH)

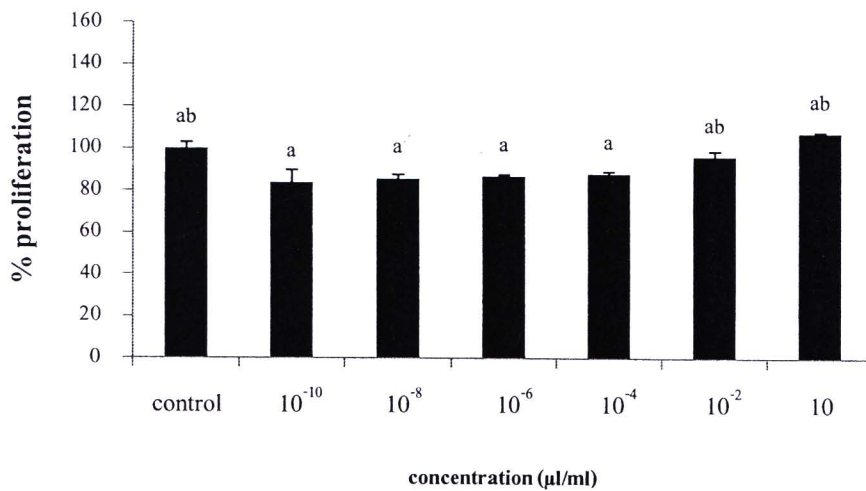
ผลการทดสอบตัวอย่างน้ำเสียบำบัดสวนดอก ต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ $10^{-4} \mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 50.89, 63.29, 76.01 และ 118.92 ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นและที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ $10 \mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวที่ลดลงเท่ากับ 94.12 และ 87.27 ตามลำดับโดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ $10^{-4} \mu\text{l/ml}$ (ดังภาพ 4.13)



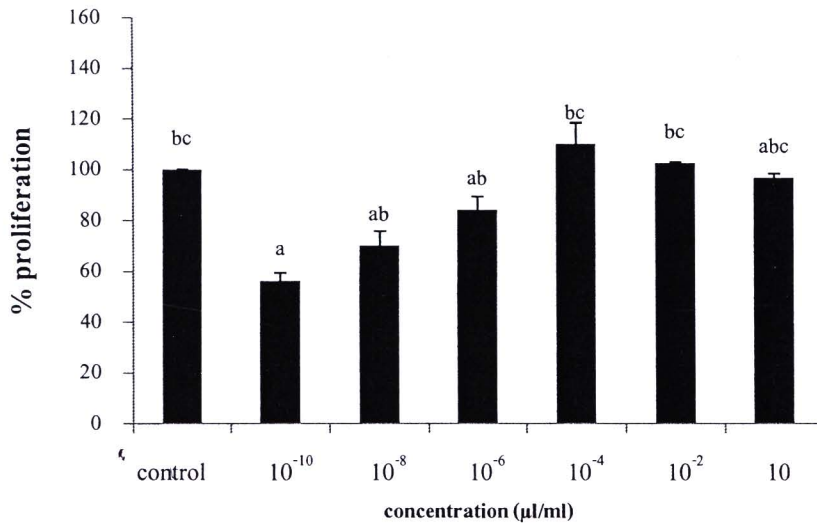
ภาพ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร (PF) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟ แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มวัว (CF) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มกบ (FF) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



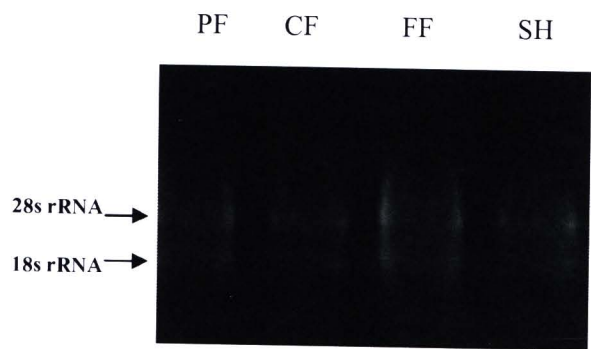
ภาพ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำเสียบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล (SH) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.2.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนเพื่อยืนยันว่าการตอบสนองของเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร, น้ำทิ้งฟาร์มวัว, น้ำทิ้งฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล ตามวิธีการข้อ 3.2.3 มีการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถีเอสโตรเจนหรือไม่ แสดงผลเป็นขั้นตอนดังนี้

ก. ผลการสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ RNA

หลังจากที่เซลล์ MCF-7 ได้รับสารตัวอย่าง น้ำทิ้งฟาร์มสุกร, น้ำทิ้งฟาร์มวัว, น้ำทิ้งฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลตามลำดับ ตามวิธีการข้อ 3.1.3 ข้อ ก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเซลล์มาสกัด total RNA ด้วย Trizol® reagent และตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วย 1.5% agarose gelelectrophoresis ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ข ปรากฏผลดังภาพ 4.14



ภาพ 4.14 ผลการสกัด RNAจากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับน้ำทิ้งฟาร์มสุกร (PF), น้ำทิ้งฟาร์มวัว(CF), น้ำทิ้งฟาร์มกบ (FF) และ น้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล (SH) ตามลำดับ

ข. ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA

RNA ที่สกัดได้จากข้อ ก จะถูกเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV[®] Revertid reverse transcriptase (ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ค) จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ cDNA ที่เกิดขึ้นโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณตามสูตร ในหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ง ได้ผลดังแสดงในตาราง 4.2 จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm อยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่ามีความบริสุทธิ์สูง

ตาราง 4.2 การวัดค่าดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA

ชื่อสารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ของตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสง		ค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ความเข้มข้น DNA (ng/ml)
		260 nm	280 nm		
น้ำทิ้งฟาร์มสุกร(PF)	10 µl/ml	0.113	0.060	1.88	2,260
น้ำทิ้งฟาร์มวัว (CF)	10 µl/ml	0.077	0.040	1.92	1,540
น้ำทิ้งฟาร์มกบ(FF)	10 µl/ml	0.095	0.050	1.90	1,900
น้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล (SH)	10 ⁻⁴ µl/ml	0.070	0.035	2.00	1,400

ค. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

นำค่าปริมาณ cDNA ทั้งหมดที่คำนวณได้จากผลการทดลอง ข้อ ข มาใช้ในการปรับความเข้มข้นของปริมาณ cDNA เริ่มต้นให้เป็น 100 ng/ml จากนั้นนำมาตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) จากนั้นจึงตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วนำไปตรวจวัดค่าความสว่างของแถบ PCR product

(band intensity) โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (ดูข้อ 3.1.3 ข้อ จ) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนของการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี normalization (ภาคผนวก ข) โดยเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน β -actin ยีนในชุดควบคุม จากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ (ข้อ 3.1.3 ข้อ ข) ปรากฏว่าสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน รายละเอียดผลการทดลองดังนี้

(1) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร

ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 1.09, 0.93, 0.04, 0.88 และ 0.26 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน $ER\alpha$ สูงที่สุด รองลงมาคือ Akt , $TFRC$, $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.15)

(2) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มวัว

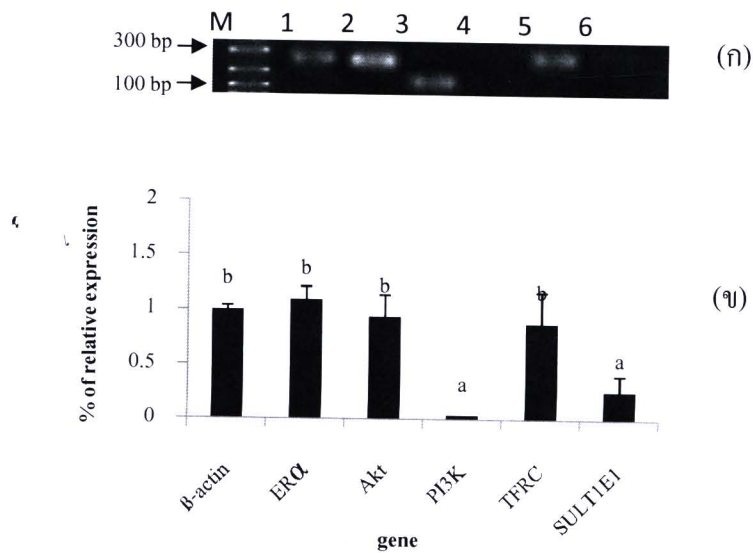
ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 0.50, 1.02, 0.06, 0.19 และ 0.17 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า Akt มีระดับการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมาคือ $ER\alpha$, $SULT1E1$, $TFRC$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.16)

(3) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มกบ

ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 1.19, 1.17, 0.05, 0.91 และ 0.41 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า $ER\alpha$ มีระดับการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมาคือ Akt , $TFRC$, $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.17)

(4) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล

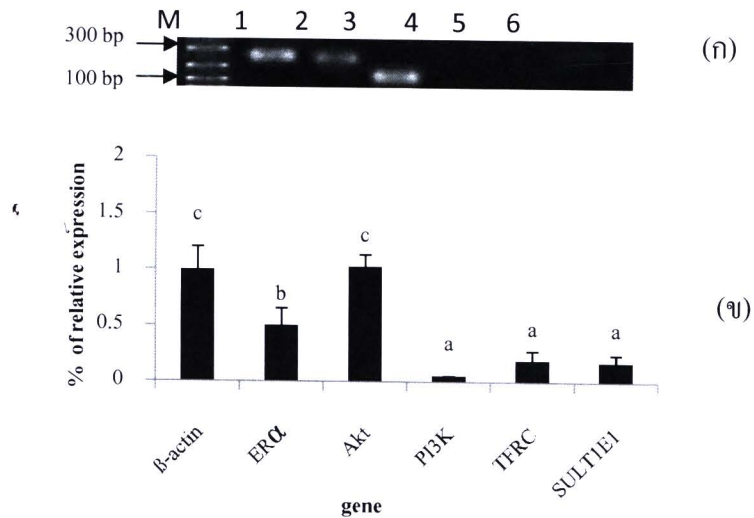
ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 0.63, 0.99, 0.08, 1.46 และ 0.29 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน $TFRC$ สูงที่สุด รองลงมาคือ Akt , $ER\alpha$, $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.18)



ภาพ 4.15 ผลจากการได้รับน้ำทั้งฟาร์มสุกรของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2=*ERα*, 3=*Akt*, 4=*PI3K*, 5=*TFRC*, 6= *SULT1E1*)

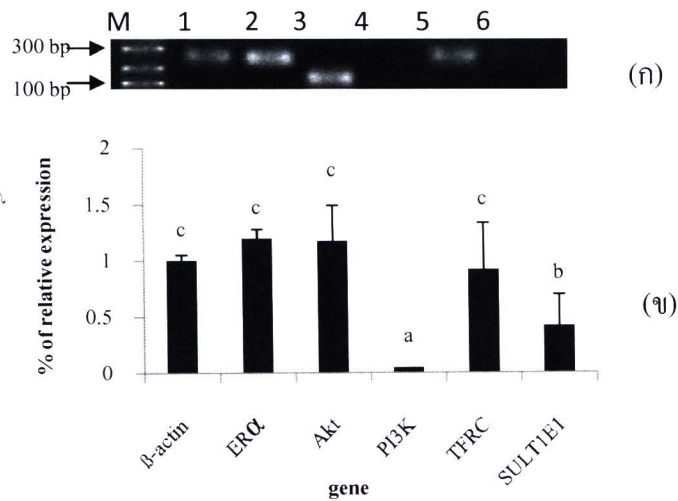
(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



ภาพ 4.16 ผลจากการได้รับน้ำทิ้งฟาร์มวัวของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β -actin (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1= β -actin, 2= *ER α* , 3= *Akt*, 4= *PI3K*, 5=*TFRC*, 6= *SULT1E1*)

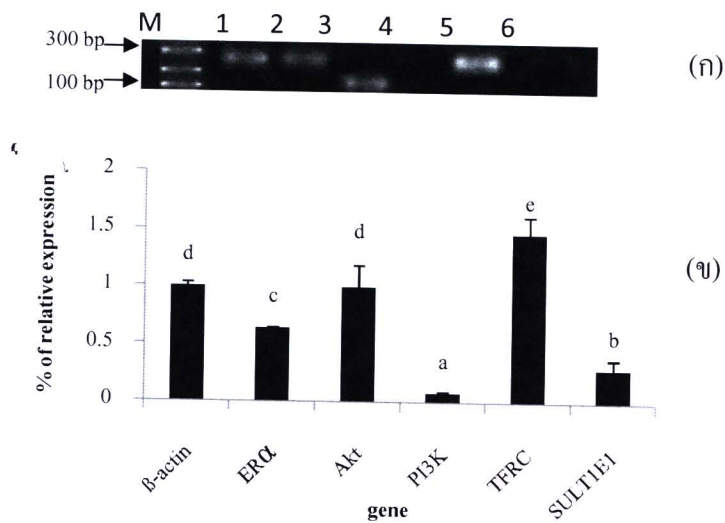
(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน β -actin (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



ภาพ 4.17 ผลจากการได้รับน้ำทั้งฟาร์มกบของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2=*ERα*, 3=*Akt*, 4=*PI3K*, 5=*TFRC*, 6=*SULT1E1*)

(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



ภาพ 4.18 ผลจากการได้รับน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2= *ERα*, 3= *Akt*, 4= *PI3K*, 5=*TFRC*, 6= *SULT1E1*)

(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)

4.3 ผลการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด

ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิดโดยแสดงผลเป็นขั้นตอนดังนี้

4.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด

ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิดตามวิธีการหัวข้อ 3.2.2 เมื่อเซลล์ MCF-7 ได้รับสารตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเซลล์มาตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค SRB แล้วนำไปวิเคราะห์ดูการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตัวควบคุมโดยคำนวณเป็นร้อยละการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ได้ผลดังนี้

(1) สมุนไพรบำรุงกำลัง (AH)

ผลการทดสอบตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลังต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 109.73, 112.11, 123.04, 134.20, 138.47 และ 145.84 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นและที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ 10 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวลดลงเท่ากับ 101.90, 61.52 ตามลำดับ โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดคือ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ (ดังภาพ 4.19)

(2) สารสกัดกวางเครือขาว (BH)

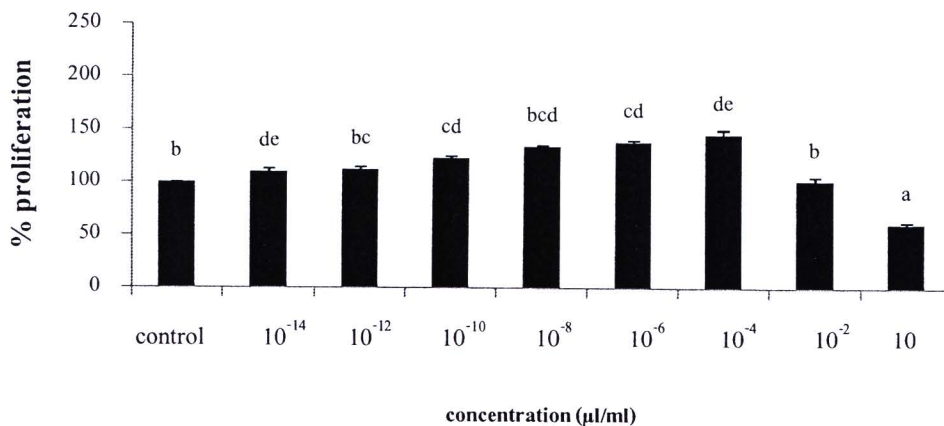
ผลการทดสอบตัวอย่างสารสกัดกวางเครือขาวต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 175.73, 185.67 และ 230.117 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากกวางเครือขาวเพิ่มมากขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} , 10^{-1} , 1×10^3 , 2×10^3 และ 4×10^3 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 199.41, 195.32, 183.04, 136.25 และ 107.89 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกวางเครือขาวเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดคือ 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ (ดังภาพ 4.20)

(3) น้ำใบบวบก (TH)

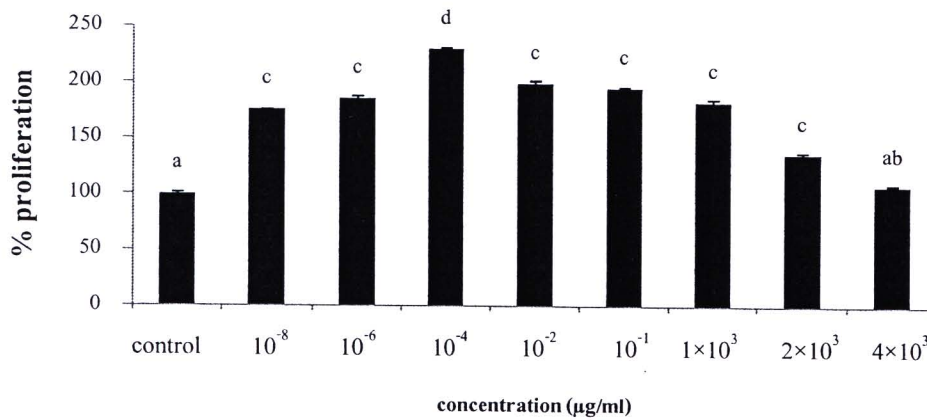
ผลการทดสอบด้วยน้ำใบบวบก ต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} และ 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 170.30, 157.24, 145.13, 136.10, 133.72 และ 105.46 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นและที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ 10 $\mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวที่ลดลงเท่ากับ 94.12 และ 87.27 ตามลำดับ (ดังภาพ 4.21)

(4) น้ำมะพร้าวอ่อน (CJ)

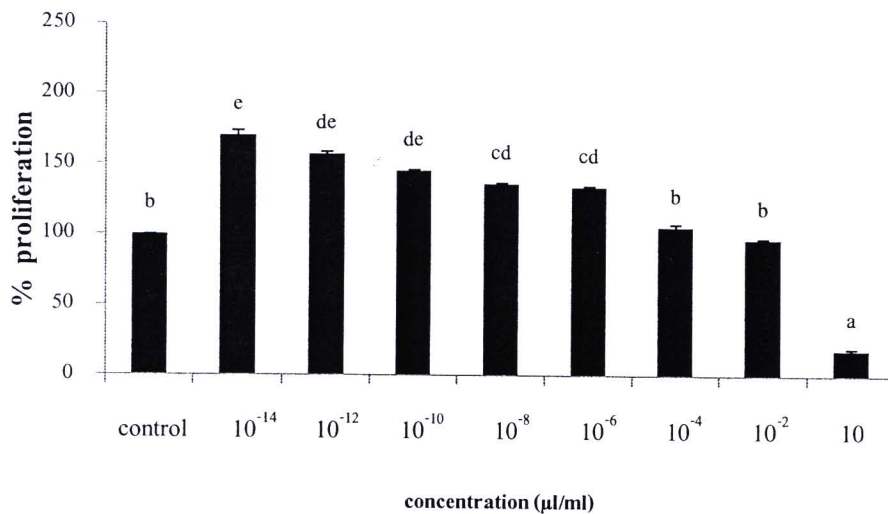
ผลการทดสอบด้วยน้ำมะพร้าวอ่อน ต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2} และ 10 $\mu\text{l/ml}$ พบว่าเซลล์มีร้อยละการแบ่งตัวเท่ากับ 69.07, 85.17, 94.39, 101.08, 104.34, 112.11, 114.82 และ 123.14 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีแนวโน้มการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นที่กระตุ้นให้เซลล์มีร้อยละการเพิ่มจำนวนมากที่สุดคือ 10 $\mu\text{l/ml}$ (ดังภาพ 4.22)



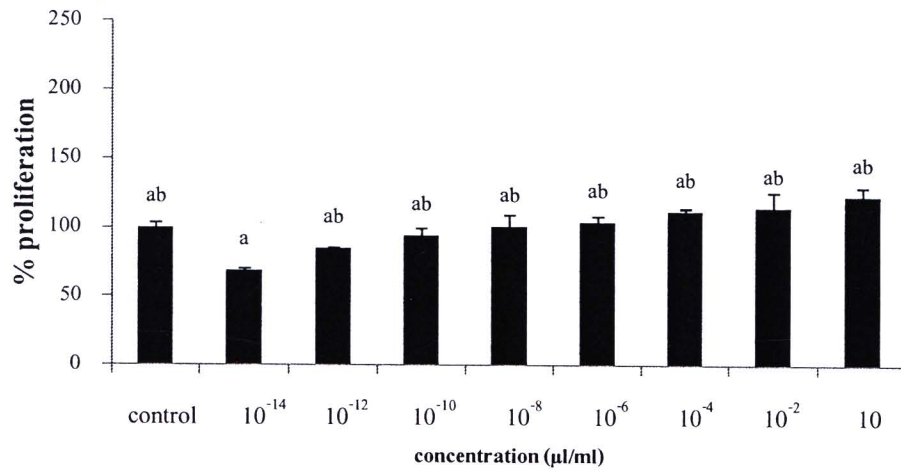
ภาพ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง (AH) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ4.20 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างสารสกัดกาวเครือขาว (BH) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 4.21 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำใบบัวบก (TH) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



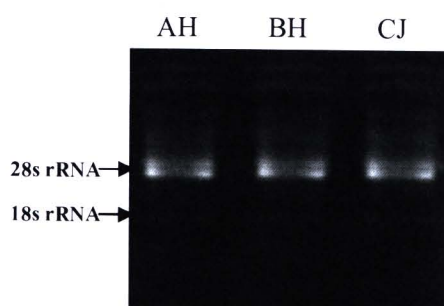
ภาพ 4.22 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวอ่อน (CJ) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่งกราฟ แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.3.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนเพื่อยืนยันว่าการตอบสนองของเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดจากกวางเครือขาวและน้ำมันมะพร้าวอ่อนตามวิธีการข้อ 3.2.3 มีการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถีเอสโตรเจนหรือไม่ แสดงผลเป็นขั้นตอนดังนี้

ก.ผลการสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ RNA

หลังจากที่เซลล์ MCF-7 ได้รับสารตัวอย่าง ตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดจากกวางเครือขาวและน้ำมันมะพร้าวอ่อนตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ผลการทดสอบทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.2 ปรากฏผลดังภาพ 4.23



ภาพ 4.23 ผลการสกัด RNA จากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสมุนไพรบำรุงกำลัง (AH), สารสกัดกวางเครือขาว (BH) และน้ำมันพริก้าอ่อน (CJ) ตามลำดับ

ข. ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA

RNA ที่สกัดได้จากข้อ ก จะถูกเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ M-MuLV[®] Revertid reverse transcriptase (ตามวิธีการหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ค) จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ cDNA ที่เกิดขึ้นโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณตามสูตร ในหัวข้อ 3.1.3 ข้อ ง ได้ผลดังแสดงในตาราง 4.3 จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm อยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่ามีความบริสุทธิ์สูง

ตาราง 4.3 การวัดค่าดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA

ชื่อสารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ของตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสง		ค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ความเข้มข้น DNA (ng/ml)
		260 nm	280 nm		
สมุนไพรบำรุงกำลัง (AH)	10 ⁻⁴ µl/ml	0.067	0.035	1.91	1,340
สารสกัดกวางเครือขาว (BH)	10 ⁻⁴ µg/ml	0.055	0.030	1.83	1,100
น้ำมันพริก้าอ่อน (CJ)	10 µl/ml	0.055	0.030	1.83	1,100

ค. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

นำค่าปริมาณ cDNA ทั้งหมดที่คำนวณได้จากผลการทดลอง ข้อ ข มาใช้ในการปรับความเข้มข้นของปริมาณ cDNA เริ่มต้นให้เป็น 100 ng/ml จากนั้นนำมาตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) จากนั้นจึงตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วนำไปตรวจวัดค่าความสว่างของแถบ PCR product (band intensity) โดยใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (ดูข้อ 3.1.3 ข้อ ฉ) นำค่าที่

ได้มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนของการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี normalization (ภาคผนวก ข) โดยเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน β -actin ยีนในชุดควบคุม จากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ (ข้อ 3.1.3 ข้อ ข) ปรากฏว่าสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน รายละเอียดผลการทดลอง ดังนี้

(1) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง

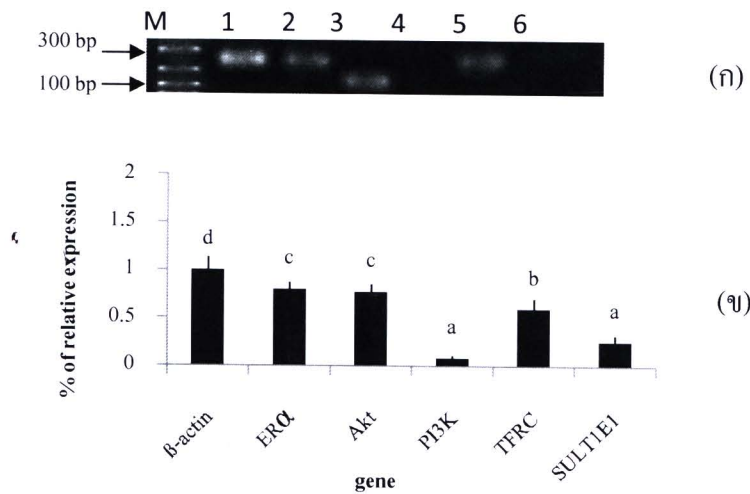
ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 0.79, 0.76, 0.08, 0.59, 0.25 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน $ER\alpha$ สูงสุด รองลงมาคือ Akt , $TFRC$, $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.24)

(2) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับตัวอย่างสารสกัดกวางเครือขาว

ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 1.18, 0.94, 0.09, 0.65 และ 0.27 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน $ER\alpha$ สูงที่สุด รองลงมาคือ Akt , $TFRC$, $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.25)

(3) ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีน เมื่อได้รับตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว

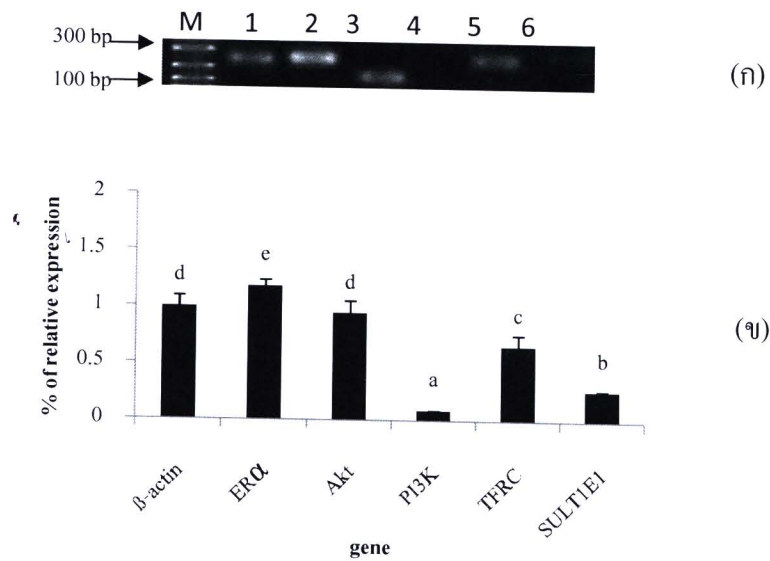
ด้วยวิธีการ normalization (ดูหัวข้อ 3.1.3 ข้อ จ) พบว่ายีน $ER\alpha$, Akt , $PI3K$, $TFRC$ และ $SULT1E1$ มีค่าเท่ากับ 1.41, 1.00, 0.87, 1.13 และ 0.20 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน $ER\alpha$ สูงสุด รองลงมาคือ $TFRC$, Akt , $SULT1E1$ และ $PI3K$ ตามลำดับ (ดังภาพ 4.26)



ภาพ 4.24 ผลจากการได้รับสมุนไพรบำรุงกำลังของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β -actin (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1= β -actin, 2= *ER α* , 3= *Akt*, 4= *PI3K*, 5= *TFRC*, 6= *SULT1E1*)

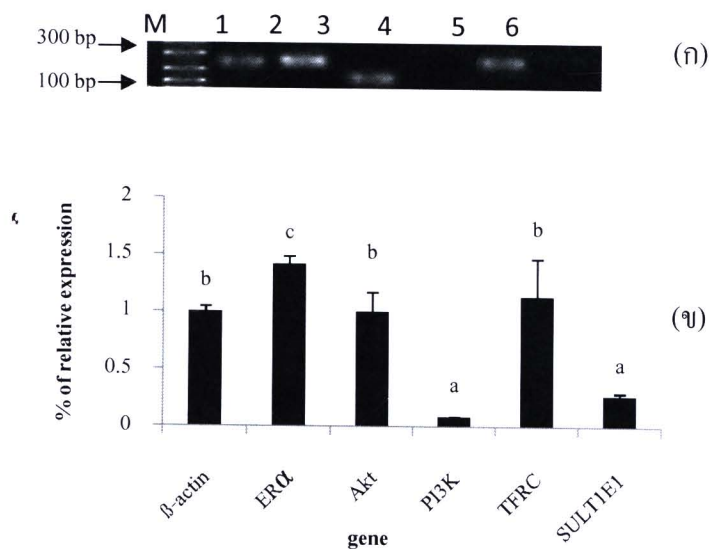
(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ER α* , *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน β -actin (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



ภาพ 4.25 ผลจากการได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1=*β-actin*, 2=*ERα*, 3=*Akt*, 4=*PI3K*, 5=*TFRC*, 6=*SULT1E1*)

(ข) ระดับการแสดงออกของยีน *ERα*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC* และ *SULT1E1* เทียบกับยีน *β-actin* (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)



ภาพ 4.26 ผลจากการได้รับน้ำมะพร้าวของเซลล์ MCF-7

(ก) ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน $ER\alpha$, Akt, PI3K, TFRC และ SULT1E1 เปรียบเทียบกับยีน β -actin (อักษรย่อ M=DNA ladder, 1= β -actin, 2= $ER\alpha$, 3= Akt, 4= PI3K, 5=TFRC, 6= SULT1E1)

(ข) ระดับการแสดงออกของยีน $ER\alpha$, Akt, PI3K, TFRC และ SULT1E1 เทียบกับยีน β -actin (อักษรกำกับบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม การทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)

4.4 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำจาก ฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่

ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำ (ดูหัวข้อ 3.2.1 ข้อ ข (ส่วนที่ 2)) เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำที่นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนโดยรวมดังภาพ 4.27 โดยในที่นี้จะขอกล่าวรายละเอียดดังนี้

4.2.1 อุณหภูมิของน้ำตัวอย่าง

อุณหภูมิของตัวอย่างน้ำทั้งฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 30.1, 28, 28.7 และ 28.4 °C ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำทั้งและน้ำเสียที่ทำการเก็บมีค่าอยู่ระหว่าง 28-32°C โดยประมาณ (ภาพ 4.27 (ก))

4.2.2 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของตัวอย่างน้ำจากฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 7.43, 7.11, 7.55 และ 8.27 ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของตัวอย่างทั้งจากฟาร์มอยู่ในช่วง 7.00-8.00 ในส่วนของน้ำเสียจากบ่อบำบัดมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) สูงกว่าตัวอย่างน้ำทั้งจากฟาร์มทั้ง 3 ฟาร์ม (ภาพ 4.27 (ข))

4.2.3 ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity)

ค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำทั้งจากฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 1609, 296, 1183 และ 517 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ตามลำดับ (ภาพ 4.27 (ค))

4.2.4 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)

ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำทั้งจากฟาร์มวัวและน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าเท่ากับ 1 และ 3 mg/l ตามลำดับ ในส่วนของฟาร์มสุกรและฟาร์มกบนั้นไม่สามารถวิเคราะห์ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (ภาพ 4.27 (ง))

4.2.5 ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (BOD)

ผลการตรวจวัดค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมีของตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบและน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 1020, 16, 152 และ 44 mg/l ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแต่ละตัวอย่างจะมีค่าความต้องการของออกซิเจนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(ภาพ 4.27 (จ))

4.2.6 ไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$)

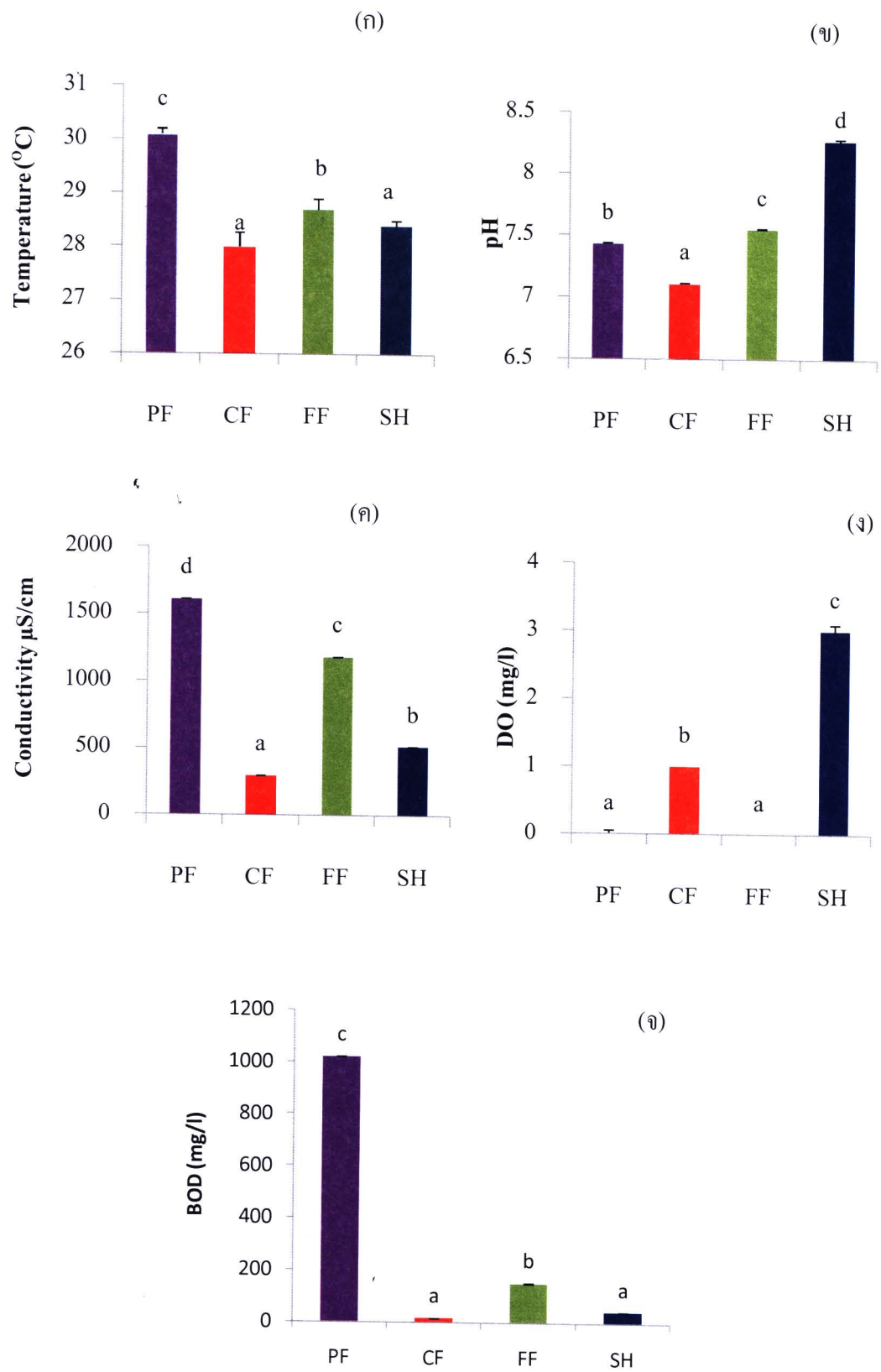
ผลการตรวจวัดค่า ไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) จากตัวอย่างน้ำฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบและน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าเท่ากับ 80, 24.8, 1.6 และ 2.5 mg/l ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า ไนเตรทไนโตรเจนของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน(ภาพ 4.27 (ฉ))

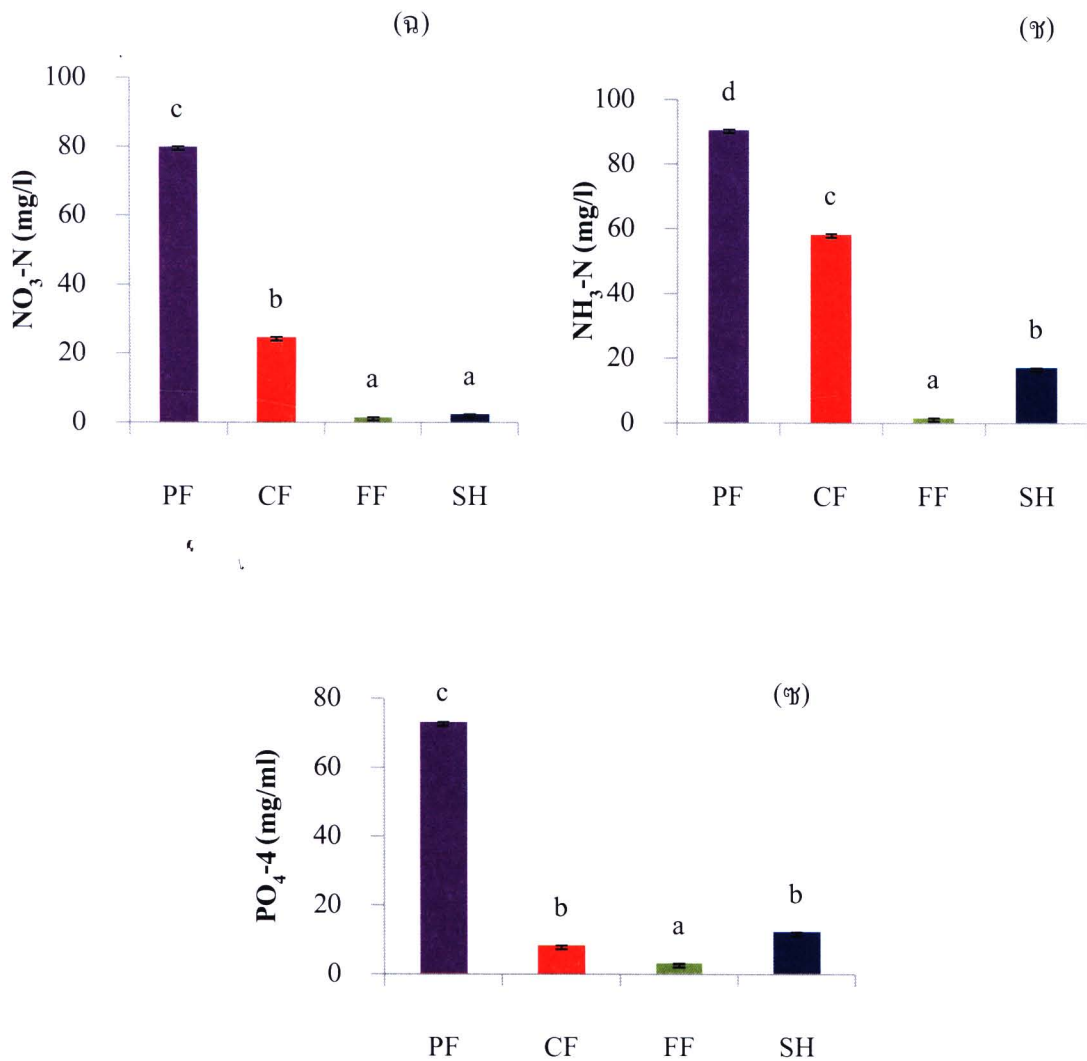
4.2.7 แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$)

ผลการตรวจวัดค่า แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) จากตัวอย่างน้ำฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบและน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ 90.6, 58.4, 1.69 และ 17.16 mg/l ตามลำดับ(ภาพ 4.27 (ซ))

4.2.8 ออร์โธฟอสเฟต ($\text{PO}_4\text{-P}$)

ผลการตรวจวัดค่า ฟอสฟอรัส ($\text{PO}_4\text{-P}$) ตัวอย่างน้ำฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว, ฟาร์มกบ และน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่มีค่าเท่ากับ 73.2, 8.4, 3.13 และ 12.32 mg/l ตามลำดับ (ภาพ 4.27 (ช))





ภาพ 4.27 คุณภาพน้ำตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัด เชียงใหม่ (ก) อุณหภูมิ (ข) pH (ค) การนำไฟฟ้า (ง) ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (จ) BOD (ฉ) ไนเตรทไนโตรเจน (ช) แอมโมเนียมไนโตรเจน (ซ) ออร์โธฟอสเฟต (อักษรย่อกำกับแท่งกราฟ CF= น้ำทิ้งฟาร์มวัว, PF=น้ำทิ้งฟาร์มสุกร, FF= น้ำทิ้ง ฟาร์มกบ, SH=น้ำเสียบำบัดโรงพยาบาล) แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ตัวอักษรบนแท่ง กราฟแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$)