ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247910

การทดสอบทางชีวภาพด้านพิษต่อเซลล์เพื่อการคัดกรองสารสกัดจากพืชสมุนไพรและสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ในแหล่งน้ำธรรมชาติและตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้อุปโลกน์ใกล้

ธงชาย จันทรชาติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2554

b00252516

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247910

การทดสอบทางชีวภาพด้วยเซลล์เพื่อการติดตามตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภค

ละมาย จันทะขาว

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2554

การทดสอบทางชีวภาพด้วยเซลล์เพื่อการติดตามตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภค

ละมาย จันทะขาว

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวงศ์คำ

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชล ผลารักษ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระ วงศ์คำ

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชิตชล ผลารักษ์

21 ตุลาคม 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการด้านสารเคมี (ETM) ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนอุดหนุนด้านสารเคมี และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการค้นคว้าข้อมูล ขั้นตอนในการทดลองและการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดจนช่วยตรวจสอบข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้ให้สำเร็จและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร สำหรับการตอบรับ เพื่อทำการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ชิตชล ผลารักษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงการให้คำแนะนำ การตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. กนกพร แสนเพชร ที่ให้ความอนุเคราะห์ สารสกัดกวาวเครือขาว ในการศึกษาครั้งนี้

ขอบคุณ พี่ ๆ และ น้อง ๆ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเซลล์มนุษย์และสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเลี้ยงดู อบรม สั่งสอนและที่ทำให้มีชีวิตที่ดีตราบจนทุกวันนี้ ขอบคุณน้องชาย และนายเชาวลิต พุ่มไม้ ที่ให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

ละมาย จันทะขาว

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทดสอบทางชีวภาพด้วยเซลล์เพื่อการติดตามตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภค

ผู้เขียน นางสาว ละมาย จันทะขาว

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระ วงศ์คำ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชล ผลารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

247910

เอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำและผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคบางชนิด เป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่งผลต่อเซลล์เป้าหมายในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงต่อตัวรับเอสโตรเจน (ER) และส่งสื่อสัญญาณที่จำเพาะให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ ประสิทธิภาพของการตรวจสอบและวิเคราะห์สารประกอบเหล่านี้ ขึ้นอยู่กับเทคนิคประเมินการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่มีตัวรับเอสโตรเจน ER เป็นโมเดลในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสภาวะมาตรฐานโดยไม่มีฮอร์โมน แล้วจึงนำตัวอย่างสารมาตรฐาน ได้แก่ 17β-estradiol, aldrin และ endrin ตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์ ได้แก่ ฟาร์มสุกร ฟาร์มวัว ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคบางชนิด ได้แก่ สมุนไพรบำรุงกำลัง สารสกัดกวาวเครือขาว น้ำใบบัวบก น้ำมะพร้าวอ่อน มาเจือจางลำดับส่วน ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม fetal bovine serum 10% ที่มีการดูดซับฮอร์โมนด้วย dextran-charcoal strip แล้วนำมาทดสอบกับเซลล์ MCF-7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ประเมินการยับยั้งหรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยใช้เทคนิค Sulforhodamine B Assay ใน multiwell-plate พบว่าตัวอย่างทุกชนิด ยกเว้นน้ำใบบัวบก สามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนโดยมีการออกฤทธิ์เป็นสองด้านในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

247910

แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ร้อยละการแบ่งเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ได้แก่ *ERα Akt PI3K TFRC* และ *SULT1E1* ที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนเป็นการประเมินกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล พบว่าการแสดงออกของยีนในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสารตัวอย่าง ยกเว้นน้ำใบบัวบก มีการออกฤทธิ์โดยผ่าน *ERα* ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน ส่วนตัวอย่างน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล มีการออกฤทธิ์ผ่านวิถี *TFRC* ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน ในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นกระบวนการที่มีศักยภาพสูงที่สามารถใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนได้

คำสำคัญ: cytobioassay, estrogen, MCF-7, aldrin, endrin, *SULT1E1*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC*, *ERα*, biphasic activity

Thesis Title Cytobioassay for Estrogenic Activity Monitoring in Natural Water Resources and Consumable Product Samples

Author Miss Lamay Junthakhao

Degree Master of Science (Environmental Science)

Thesis Advisory Committee Assistant Professor Dr. Weerah Wongkham Advisor

Assistant Professor Dr. Chitchol Phalaraksh Co-advisor

ABSTRACT

247910

Estrogen and estrogenic substances contaminating water resources and some consumable products are bioactive compounds effecting target cells in human and wild life. They directly trigger the estrogen receptors (ER) and transmit specific signals resulting in cell proliferation. Detection and analytic efficiency of these compounds depend on the techniques used to evaluate the actual bio-activities of the cells. The aim of this research was to develop the process using some cancer cells to detect the activities of estrogen and estrogenic substances. The breast cancer cell line, MCF-7 having ER was chosen as detector model for polluted estrogenic substances. The cells were cultured in the medium with standard culture conditions but without hormone. Samples of standard substances including 17β-estradiol aldrin and endrin; effluents from pig , cow and frog farms; effluents from some hospital water treatment plants in Chiang Mai; some consumable products including analeptic herb, body shape improvement herb (white kwao krua), tiger herbal and young coconut juice were tested. They were serially diluted with culture medium containing 10% FBS (dextran-chacoal strip treated) was added. These samples were then tested with MCF-7 for 72 hours. The cells were assessed for inhibition or proliferation using standard Sulforhodamine B Assay in multiwell plate. It was found that most of the samples, excepted tiger herbal, exhibited some estrogenic-like effect with biphasic activity at suitable concentrations. Cytotoxicity was apparently presented when the concentration increased. Consequently, the

247910

percentage of cell proliferation decreased when compared to the control. Determination of the related gene expression including *ERa, Akt, P13K, TFCR* and *SULTIEI* in the estrogen pathway were evaluated for the molecular mechanism of action. MCF-7 cells exposed to the samples from farms and consumable products was activated through *ERa* resulting in cell proliferation except the tiger herbal. The samples from hospitals drived the cells through *TFRC* resulting also in cell proliferation. This research showed high potential of the process which could be used in the laboratory to assess the activities of estrogen and estrogenic substances.

Keywords: cytobioassay, estrogen, MCF-7, aldrin, endrin, *SULT1E1*, *Akt*, *PI3K*, *TFRC*, *ERα*, biphasic activity

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบาญ	ซ
สารบาญตาราง	ฐ
สารบาญภาพ	ฑ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ด
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
2.1 เอสโตรเจน	4
2.1.1 การเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของเอสโตรเจน	4
ก. น้ำทิ้งจากบ้านเรือนและชุมชน	4
ข. ของเสียจากสัตว์	6
ค. น้ำผิวดิน	7
ง. น้ำใต้ดิน	7
2.1.2 ปัจจัยที่มีต่อปฏิกิริยาการสลายตัวของเอสโตรเจน	8
2.2 สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน	9
2.2.1 สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนจากการสังเคราะห์	9
2.2.2 สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในธรรมชาติ	11
2.3 ผลกระทบของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน	11
2.3.1 การเข้าสู่สิ่งแวดล้อมของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน	11
2.3.2 ผลกระทบต่อสัตว์น้ำ	11
2.3.3 ผลกระทบต่อมนุษย์	12
2.4 กลไกออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน	13
2.5 กลไกของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน	15

2.6 ผลของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการแบ่งตัวของเซลล์ 16
2.7 เทคนิค sulforhodamine B (SRB) 18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย 19
3.1 การพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 19
3.1.1 การคัดเลือกเซลล์เชื้อสายเป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 19
ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ 20
ข. การเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อสาย 20
ค. การเตรียมเซลล์ 21
ง. การเตรียม 17β-estradiol 21
จ. การศึกษาฤทธิ์ 17β-estradiol ต่อเซลล์ HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 21
3.1.2 การทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐาน 23
1. การเตรียมตัวอย่าง 23
2. การศึกษาความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 23
3.1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 24
ก. การทดสอบตัวอย่างต่อเซลล์เพื่อสกัด RNA 24
ข. การสกัดและตรวจสอบคุณภาพ total RNA 24
ค. การสังเคราะห์ cDNA 25
ง. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ cDNA 26
จ. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสาย 27
ฉ. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน 29
ช. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 29
3.2 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 30
3.2.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ 30

ก. สำรวจจุดที่จะทำการเก็บตัวอย่าง 30
ข. วิธีเก็บตัวอย่าง 31
ค. การเตรียมตัวอย่าง 32
3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7 33
3.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 33
3.3 การตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด 33
3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง 33
ก. สมุนไพรบำรุงกำลัง 33
ข. สารสกัดกวาวเครือขาว 34
ค. น้ำใบบัวบก 34
ง. น้ำมะพร้าวอ่อน 35
3.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7 35
3.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 35
บทที่ 4 ผลการวิจัย 36
4.1 ผลการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 36
4.1.1 ผลการคัดเลือกเซลล์เชื้อสายเป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 36
4.1.2 ผลการทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐาน 38
4.1.3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 40
4.2 ผลการตรวจสอบการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 46
4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 46
4.2.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 49
4.3 ผลการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด 56
4.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด 56
4.3.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 59

4.4 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำจาก ฟาร์มหมู ฟาร์มวัว ฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล 65
4.2.1 อุณหภูมิของตัวอย่างน้ำ 65
4.2.2 ค่าความเป็นกรดด่าง 65
4.2.3 ค่าการนำไฟฟ้า 65
4.2.4 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 65
4.2.5 ค่าความออกซิเจนทางชีวเคมี 66
4.2.6 ไนเตรท-ไนโตรเจน 66
4.2.7 แอมโมเนีย-ไนโตรเจน 66
4.2.8 ออร์โธฟอสเฟต 66
บทที่ 5 อภิปรายผลงานวิจัย 69
5.1 ผลการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์บางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 69
5.1.1 ผลการคัดเลือกเซลล์มะเร็งบางชนิดเป็นโมเดลในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 69
5.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ MCF-7 73
5.1.3 ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 75
5.2 ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 85
5.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 85
5.2.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 86
5.3 ผลการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด 87
5.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภคในชีวิตบางชนิด 88
5.3.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน 89
5.4 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ 91

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 94
6.1 ผลการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 94
6.2 ผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ 94
6.3 ผลการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวัน 95
6.4 ข้อสรุปงานวิจัย 95
เอกสารอ้างอิง 96
ภาคผนวก 120
ภาคผนวก ก อุปกรณ์และสารเคมี 121
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 126
ภาคผนวก ค เทคนิคในการทดลองและการคำนวณ 131
ภาคผนวก ง ข้อมูลทางตัวเลขจากการทดลองและคำนวณทางสถิติ 138
ประวัติผู้เขียน 172

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเอสโตรเจน	5
2.2 ปริมาณการขับสารเอสโตรเจนออกจากร่างกายของมนุษย์	6
2.3 ความเข้มข้นของฮอร์โมนในน้ำผิวดิน	8
3.1 ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNA ใน PCR tube หลอดที่ 1	26
3.2 ส่วนผสมในการสังเคราะห์ cDNA ใน PCR tube หลอดที่ 1	26
3.3 ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR	27
3.4 ขั้นตอนและอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR	28
3.5 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ใน annealing	28
4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA เมื่อทดสอบด้วยสารมาตรฐาน	41
4.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA เมื่อทดสอบด้วยน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล	50
4.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA เมื่อทดสอบด้วยเครื่องใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด	60

สารบาญภาพ

ภาพ หน้า

2.1 กลไกการออกฤทธิ์ที่นิวเคลียสของสเตอรอยด์ฮอร์โมนในระดับยีนของเซลล์เป้าหมาย 14
2.2 กลไกการออกฤทธิ์บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของเปปไทด์ฮอร์โมนและคาเตคอลามีน 14
3.1 แสดงบริเวณจุดเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ 31
4.1 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่ เซลล์ HeLa ได้รับ 17β-estradiol 37
4.2 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ 17β-estradiol 38
4.3 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่ เซลล์ MDA-MB-231ได้รับ 17β-estradiol 38
4.4 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ aldrin 39
4.5 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับ endrin 40
4.6 ผลการสกัด RNA จากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ aldrin, endrin และ 17β- estradiol 40
4.7 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β-*actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ aldrin 43
4.8 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β-*actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ endrin 44
4.9 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน β-*actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ 17β-estradiol 45
4.10 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกร 47

4.11 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มวัว 48
4.12 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มกบ 48
4.13 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำเสียบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล 49
4.14 ผลการสกัด RNA จากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับ น้ำทิ้งฟาร์มสุกร, น้ำทิ้งฟาร์มวัว น้ำทิ้งฟาร์มกบ และ น้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล 50
4.15 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์เชื้อ MCF-7 เมื่อ ได้รับน้ำทิ้งฟาร์มสุกร 52
4.16 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับน้ำทิ้งฟาร์มวัว 53
4.17 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับน้ำทิ้งฟาร์มกบ 54
4.18 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับน้ำเสียบ่อบำบัด 55
4.19 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง 57
4.20 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างสารสกัดกวาวเครือขาว 58
4.21 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้น เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำใบบัวบก 58
4.22 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับระดับความเข้มข้นที่เซลล์ MCF-7 ได้รับตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อน 59

4.23 ผลการสกัด RNA จากเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดกวาวเครือขาว และ น้ำมะพร้าวอ่อน 60

4.24 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสมุนไพรบำรุงกำลัง 62

4.25 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว 63

4.26 ผลการตรวจสอบ PCR product การแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับตัวอย่างน้ำมะพร้าว 64

4.27 คุณภาพน้ำตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ 68

5.1 แสดงการออกฤทธิ์ของสารโดยผ่านวิถีที่เป็นที่ทราบกันดีแล้วแต่เดิม (classical pathway; CP) วิถีที่ไม่รู้จักกันดีแต่เดิม (nonclassical pathway; NCP) และกลุ่มที่อาจมีการแสดงออกได้โดยไม่ผ่าน ER (non-estrogen receptor; N-ER) 93

อักษรย่อและสัญลักษณ์

AD	aldrin
AH	Analeptic herbs
ANOVA	Analysis of variance
BH	Body shape improvement herb
bp	basepair
BSA	Bovine serum albumin
CF	Cow farm
CJ	Coconut juice
CO_2	Carbondize oxide
CRD	Completely Randomized Design
cDNA	Complementary DNA
DEPC water	Diethylpyrocarbonate water
DI water	Distilled water
DMEM	Dulbecco' Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
E1	estrone
E2	17β-estradiol
E3	estriol
ED	endrin
FF	Frog farm
F-1044	Normal lung fibroblast
FBS	Fetal Bovine Serum
FSC	Forward scatter
g	Gram

HeLa	Human epithelial cervical cancer cell lines
INT	Intensity
L	Liter
LD	Lethal Dose
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line
MDA-MB-231	Human breast cancer cell lines
ml	Milli liter
mRNA	Messenger RNA
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
TAE buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
Cells/ml	Number of cell per milliliter
HCl	Hydrochloric acid
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium dydroxide
NCBI	National center for biotechnology information
ng/µl	Nanogram per microliter
nM	Nano-molar
µl/well	Microlite per well
µl/ml	Microlite per milliliter
SE	Standard error
SH	Hospital treatment plant
Sig.	Significant
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TCA	Trichloroacetic acid
TH	Tiger herbal

mm^2	Square millimeter
mol	Molar
nm	Nanometer
^{o}C	Degree celsius
OD	Optical density
P	Level of significant
PBS	Phosphate buffer saline
PF	Pig farm
RH	Relative Humidity
RNA	Ribonucleic acid
RNAse A	Ribonuclease A
rpm	Round per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRB assay	Sulforhodamine B assay
TCA	Trichloroacetic acid
v/v	Volume by volume
µg	Micro gram
µl	Micro liter