



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร  
สกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา

Study of chemical composition and biological activities of  
crude extract and bioactive compounds from mushroom  
*Mycoamaranthus cambodgensis*

ดร. นีรามัย ฝางกระโทก  
และคณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 365587  
สัญญาเลขที่ 129/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร  
สกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา

Study of chemical composition and biological activities of  
crude extract and bioactive compounds from mushroom

*Mycoamaranthus cambodgensis*

ดร. นีรามัย ฝางกระโทก

และคณะ

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

มีนาคม 2561

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 129/2560

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้เล็งเห็นความสำคัญของโครงการวิจัยนี้และให้การสนับสนุนงบประมาณวิจัย ขอขอบคุณ ศ. ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร และคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ตลอดจนคณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ ดร. จินตนา จุลทัศน์ คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี และ ดร. อรพรรณ ใจสมุทร คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ที่ได้ให้ความร่วมมือในการดำเนินการวิจัยให้แล้วเสร็จไปได้ด้วยดี

ดร. นิรามัย ฝางกระโทก  
หัวหน้าโครงการวิจัย  
มีนาคม 2561

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 129/2560).

I would like to thank the National Research Council of Thailand and Burapha University for research fund supporting. I am grateful to Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai and the Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University for instrumental supports and suggestion. I would like to thank Faculty of Agricultural Technology and Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University Sakaeo Campus, and Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University for research facilitation. In addition, I also thank Dr. Jintana Junlatat from Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University and Dr. Orapun Jaisamut Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University Sakaeo Campus for their research supporting. Thank you Faculty of Agricultural Technology, Burapha University and Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University for facilitating supports.

Dr. Niramai Fangkrathok  
Research Leader  
March 20, 2018

## บทคัดย่อ

เห็ดขล้าหมา (*Mycoamaranthus cambodgensis* (Pat.) Trappe) เป็นเห็ดป่าที่พบตามธรรมชาติที่มีการนำมาใช้เป็นยาตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน โดยวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สารสกัดเห็ดขล้าหมา ที่สกัดด้วย 50% เอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ( $EC_{50}$  เท่ากับ  $55.51 \pm 3.62 \mu\text{g/ml}$ ) และ FRAP ( $166.64 \pm 11.43 \mu\text{g/mg extract}$ ) และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลสูง ( $113.80 \pm 3.13 \text{ mg TAE/g extract}$ ) แต่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เล็กน้อย ( $2.61 \pm 0.12 \text{ mg QCE/g extract}$ ) และสามารถแยกสารสำคัญได้สาร 2 ชนิด คือ D-mannitol (compound 1) และ ethyl- $\beta$ -D-glucopyronoside (compound 2) ทั้งสารสกัดและสารสำคัญไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 และ MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 สารสกัดและสารสำคัญมีฤทธิ์ในการลดการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำด้วย lipopolysaccharides ได้เล็กน้อย จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่า สารสกัดและ D-mannitol มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดี โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $223.09 \pm 8.85 \mu\text{g/ml}$  และ  $22.77 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) ยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $224.97 \pm 21.43 \mu\text{g/ml}$  และ  $>20 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) ยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $152.61 \pm 22.03 \mu\text{g/ml}$  และ  $33.21 \pm 4.85 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $101.72 \pm 7.76 \mu\text{g/ml}$  และ  $14.95 \pm 0.61 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) และสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $115.74 \pm 4.48 \mu\text{g/ml}$  และ  $13.38 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) สำหรับการศึกษาฤทธิ์เอสโตรเจน พบว่า สารสำคัญที่ทดสอบมีฤทธิ์ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF7 ที่ถูกจำกัดเอสโตรเจนได้ดีคล้ายกับฤทธิ์ของเอสโตรเจน โดยเฉพาะ D-mannitol ส่วนสารสกัดมีฤทธิ์เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ในสถานะที่มีเอสโตรเจนร่วมด้วย พบว่า ทั้งสารสกัดและสารสำคัญสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบที่เกิดจากการชักนำให้เจริญด้วยเอสโตรเจนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะสารสกัดและ D-mannitol แม้ว่าทั้งสารสกัดและ D-mannitol ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถพบการเสริมของเอสโตรเจนได้ จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและมีศักยภาพในการนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพซึ่งมีพื้นฐานองค์ความรู้จากภูมิปัญญาไทย ตลอดจนการอนุรักษ์เห็ดป่าต่อไป

**คำสำคัญ:** เห็ดขล้าหมา สารสำคัญ D-mannitol ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์เอสโตรเจน ฤทธิ์ต้านเอสโตรเจน

## ABSTRACT

Hed Kha-Lam Ma (*Mycoamaranthus cambodgensis* (Pat.) Trappe) is a wild mushroom which has been used as a traditional medicine from folk wisdom. The objective in this study were to investigate chemical composition and biological activities of crude extract and bioactive compounds from *M. cambodgensis*. The results from this study revealed that crude extract from 50% ethanol extraction contained high anti-oxidant activity by using DPPH (EC<sub>50</sub> of 55.51 ± 3.62 µg/ml) and FRAP (166.64 ± 11.43 µg/mg extract) methods. In addition, the extract contained high total phenolic content (113.80 ± 3.13 mg TAE/g extract) but small amount of flavonoids (2.61 ± 0.12 mg QCE/g extract). Two compounds, D-mannitol (compound 1) and ethyl-β-D-glucopyronoside (compound 2), were isolated and elucidated their structures. Both crude extract and compounds showed no inhibitory effect on the growth of breast cancer cells (MCF7 and MDA-MB-231) and colon cancer cell (Caco-2). Both crude extract and compounds showed slightly inhibitory effect on nitric oxide production from lipopolysaccharides-induced RAW264.7 macrophages. The extract and D-mannitol exhibited strong anti-inflammatory activity by decreasing gene expressions of COX-2 (IC<sub>50</sub> of 223.09±8.85 µg/ml and 22.77±0.79 µg/ml, respectively), IL-1β (IC<sub>50</sub> of 224.97±21.43 µg/ml and >20 µg/ml, respectively), IL-6 (IC<sub>50</sub> of 152.61±22.03 µg/ml and 33.21±4.85 µg/ml, respectively), iNOS (IC<sub>50</sub> of 101.72±7.76 µg/ml and 14.95±0.61 µg/ml, respectively) and TNF-α (IC<sub>50</sub> of 115.74±4.48 µg/ml and 13.38±0.12 µg/ml, respectively). For estrogenic activity, the compounds especially D-mannitol as well as estradiol could significantly induce the proliferation of estrogenic starved MCF7. While the extract showed lower stimulatory effect than its compounds. For anti-estrogenic activity, the extract and compounds especially D-mannitol in the supplement of estradiol showed significantly inhibitory effect on proliferation of estrogenic starved MCF7. However, the extract and D-mannitol at low concentration showed synergistic effect with estradiol to induce the proliferation of those cells. From all results in this study indicate that crude extract and its bioactive compounds have interesting bioactivities and efficacy for further study and development of natural products based on Thai folk wisdom and may lead to wild mushroom conservation.

**Keywords:** *Mycoamaranthus cambodgensis* (Pat.), bioactive compound, D-mannitol, anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity, estrogenic activity, anti-estrogenic activity

## สารบัญเรื่อง

|   | หน้า |
|---|------|
| กิตติกรรมประกาศ                           | i    |
| Acknowledgements                          | ii   |
| บทคัดย่อ                                  | iii  |
| Abstract                                  | v    |
| สารบัญเรื่อง                              | vii  |
| สารบัญตาราง                               | viii |
| สารบัญภาพ                                 | ix   |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | xii  |
| บทที่ 1 บทนำ                              | 1    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม                     | 5    |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย                | 13   |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย                        | 22   |
| บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย       | 40   |
| บทที่ 6 สรุปและเสนอแนะ                    | 44   |
| ผลผลิต                                    | 45   |
| รายงานการเงิน                             | 58   |
| บรรณานุกรม                                | 59   |
| ภาคผนวก                                   | 66   |
| ประวัตินักวิจัยและคณะ                     | 74   |

## สารบัญตาราง

|   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 2.1 สรุปการเปลี่ยนแปลงและชนิดที่สำคัญของสารสื่อกลางที่เป็นสาเหตุ<br>ตลอดจนแหล่งสร้างสารสื่อกลางที่สำคัญ                  | 9    |
| ตารางที่ 3.1 ระบบการวิเคราะห์ HPLC เป็น Gradient elution  | 17   |
| ตารางที่ 3.2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR   | 20   |
| ตารางที่ 3.3 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA   | 21   |
| ตารางที่ 4.1. แสดงข้อมูล $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , DEPT, และ HMBC NMR (400 และ 100 MHz,<br>DMSO- $d_6$ ) ของสาร compound 1 | 23   |
| ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูล $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ NMR, DEPT และ HMBC (400 และ 100 MHz,<br>DMSO- $d_6$ ) ของสาร compound 2    | 24   |
| ตารางที่ 4.3 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, total phenolic content และ total<br>flavonoid ของสารสกัดเห็ดขล้าหมา                        | 27   |
| ตารางที่ 4.4 ผลความเป็นพิษของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 ที่มีต่อการเจริญของ<br>เซลล์มะเร็งที่ทดสอบ                            | 33   |



## สารบัญภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| ภาพที่ 2.1 เห็นผลล้าหมาที่เก็บได้จากปารอบมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว   | 5    |
| ภาพที่ 2.2 ลักษณะบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดสปอร์ของเห็ดขล้าหมาที่เก็บได้จากปารอบมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว   | 6    |
| ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงบทบาทของอนุมูลอิสระและการอักเสบที่มีต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง   | 8    |
| ภาพที่ 3.1 ลักษณะเห็ดขล้าหมาที่พบในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว  | 15   |
| ภาพที่ 3.2 ลักษณะเห็ดที่นำมาใช้ในการศึกษา   | 15   |
| ภาพที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเห็ดขล้าหมา   | 22   |
| ภาพที่ 4.2 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของ compound 1  | 23   |
| ภาพที่ 4.3 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร compound 2   | 24   |
| ภาพที่ 4.4 TLC fingerprint ของสารสกัดจากเห็ดขล้าหมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน   | 25   |
| ภาพที่ 4.5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเห็ดขล้าหมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC   | 26   |
| ภาพที่ 4.6 การสร้างไนตริกออกไซด์และ cell viability ของเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบด้วย L-NAME และสารสกัดเห็ดขล้าหมาในสภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS                                | 28   |
| ภาพที่ 4.7 การสร้างไนตริกออกไซด์และ cell viability ของเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบด้วย compound 1 และ 2 ในสภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS   | 29   |
| ภาพที่ 4.8 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7  | 30   |
| ภาพที่ 4.9 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MDA-MB-231   | 31   |
| ภาพที่ 4.10 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ Caco-2  | 32   |
| ภาพที่ 4.11 ผลของ Tamoxifen ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7 และ MDA-MB-231   | 33   |
| ภาพที่ 4.12 ผล estrogenic activity ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7  | 34   |
| ภาพที่ 4.13 ผล anti-estrogenic activity ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7   | 34   |
| ภาพที่ 4.14 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ $\beta$ -actin  | 35   |
| ภาพที่ 4.15 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$ โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ $\beta$ -actin   | 36   |
| ภาพที่ 4.16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ $\beta$ -actin   | 37   |
| ภาพที่ 4.17 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ $\beta$ -actin   | 38   |
| ภาพที่ 4.18 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$ โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ $\beta$ -actin  | 39   |
| ภาพที่ 4.19 ฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS และ TNF- $\alpha$ ในเซลล์ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบ (Crude) และ compound 1 (Pure) ของเห็ดขล้าหมา | 39   |
| ภาพที่ 5.1 แสดงการทำนายการเกิดสาร compound 2 หรือ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) จาก compound 1 หรือ mannitol   | 43   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| ภาพผนวกที่ 1 แสดง $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1    | 67   |
| ภาพผนวกที่ 2 แสดง $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1 | 67   |
| ภาพผนวกที่ 3 แสดง DEPT 135° (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1                     | 68   |
| ภาพผนวกที่ 4 แสดง DEPT 90° (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1                      | 68   |
| ภาพผนวกที่ 5 แสดง 2D COSY (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1                       | 69   |
| ภาพผนวกที่ 6 แสดง 2D HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1                       | 69   |
| ภาพผนวกที่ 7 แสดง 2D HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1                       | 70   |
| ภาพผนวกที่ 8 แสดง $^1\text{H}$ NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2    | 70   |
| ภาพผนวกที่ 9 แสดง $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz) (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2 | 71   |
| ภาพผนวกที่ 10 แสดง DEPT 135° (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2                    | 71   |
| ภาพผนวกที่ 11 แสดง DEPT 90° (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2                     | 72   |
| ภาพผนวกที่ 12 แสดง 2D COSY (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2                      | 72   |
| ภาพผนวกที่ 13 แสดง 2D HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2                      | 73   |
| ภาพผนวกที่ 14 แสดง 2D HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2                      | 73   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                  |   |
|------------------|---|
| DPPH             | (2, 2 – diphenyl – picryl hydrazine)            |
| IC <sub>50</sub> | 50% inhibitory concentration                    |
| GAE              | gallic acid equivalent                          |
| DMSO             | Dimethyl sulfoxide                              |
| FBS              | Fetal bovine serum                              |
| LPS              | Lipopolysaccharides                             |
| NED              | N-(1-naphthyl) ethylenediamine                  |
| L-NAME           | L-NG-Nitroarginine methyl ester                 |
| NO               | Nitric oxide                                    |
| ER               | Estrogen receptor                               |
| MEM              | Minimum Essential Media                         |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle Medium                |
| DCC              | Dextran-coated charcoal                         |
| E2               | Estradiol                                       |
| RT-PCR           | Reverse transcription-polymerase chain reaction |
| TLC              | Thin layer chromatography                       |
| HPLC             | High performance liquid chromatography          |
| CO <sub>2</sub>  | Carbon dioxide                                  |
| MeOH             | Methanol  |
| EtOH             | Ethanol   |
| UV               | Ultraviolet                                     |
| IR               | Infrared  |
| NMR              | Nuclear magnetic resonance                      |
| MS               | Mass spectroscopy                               |
| TLC              | Thin Layer Chromatography                       |
| HPLC             | High Performance Liquid Chromatography          |
| EtoAC            | Ethyl acetate                                   |
| CV               | Coefficient of variation                        |
| NO               | Nitric oxide                                    |
| IL               | Interleukin                                     |
| COX              | Cyclooxygenase                                  |
| TNF              | Tumor necrosis factor                           |
| iNOS             | Inducible nitric oxide synthase                 |
| PCR              | Polymerase chain reaction                       |
| RT-PCR           | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| FRAP             | Ferric reducing antioxidant power               |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มนุษย์ในปัจจุบันต้องเผชิญกับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการทำลายระบบอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นที่เป็นสาเหตุของโรคภัยต่างๆ เช่น โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน โรคเบาหวาน โรคเรื้อรังที่เกิดจากการอักเสบและโรคมะเร็ง ซึ่งโรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2554 ได้ระบุว่ามะเร็งที่พบมาก 3 อันดับแรกในชายไทย คือ มะเร็งลำไส้ (16.2%), มะเร็งปอดและหลอดลม (15.5%) และมะเร็งตับและถุงน้ำดี (15.3%) ในขณะที่มะเร็งที่พบมากในหญิงไทย คือ มะเร็งเต้านม (37.5%), มะเร็งปากมดลูก (14.4%) และมะเร็งลำไส้ (9.6%) (Attasara and Buasom, 2011) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แม้ว่ามะเร็งหลายชนิดจะสามารถรักษาได้หาตรวจพบตั้งแต่ระยะเริ่มต้นด้วยการผ่าตัด ร่วมกับการให้เคมีบำบัดและฉายรังสี แต่ผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยเคมีบำบัดจะส่งผลกระทบต่อสภาพร่างกายและจิตใจของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ผู้ป่วยจำนวนมากทุกข์ทรมานจากผลข้างเคียงดังกล่าว นำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลว ปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษา เพื่อลดผลข้างเคียงและเพื่อเสริมการรักษาร่วมกับยาแผนปัจจุบัน

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งที่สำคัญในการนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารและเพื่อการรักษาโรค ทั้งในรูปแบบยาพื้นบ้าน ยาแผนโบราณ ตลอดจนนำมาซึ่งการค้นพบยารักษาโรคแผนปัจจุบันชนิดใหม่ๆ ทั้งในประเทศไทยเองและประเทศต่างๆ ทั่วโลก ดังนั้นการค้นหาค้นหาองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยศึกษาทั้งในส่วนขององค์ประกอบทางเคมี สารสำคัญและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทางเภสัชวิทยา จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆ ในอนาคต (Balunas and Kinghorn, 2005; Pan et al., 2013) ปัจจุบันพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกนำไปเป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานในปริมาณมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบ เพื่อแยกและหาค้นหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้นอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์ และนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้อง จึงจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด ซึ่งอาจนำไปสู่การนำพืชสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้เป็นยาทั้งแผนไทยและยาแผนปัจจุบันในอนาคตต่อไป นอกจากพืชสมุนไพรแล้ว เห็ด จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความสำคัญอย่างมากเช่นกัน โดยเห็ดเป็นทั้งอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนและสารอาหารที่จำเป็นและเห็ดยังมีสรรพคุณทางยาที่เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย อาทิ ด้านมะเร็ง ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านเบาหวาน ด้านไวรัส ด้านแบคทีเรีย ส่งเสริมภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Sullivan et al., 2006; Zhong and Xiao, 2009) และปัจจุบันมีการสกัดสารสำคัญจากเห็ดชนิดต่างๆ มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในรูปแบบต่างๆ มากมาย ทำให้เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสร้างรายได้มากมายอีกด้วย

ในพื้นที่ป่าของมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้วมีเห็ดหลายชนิด ทั้งที่กินได้และกินไม่ได้ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ทางคณะผู้วิจัยได้สำรวจเบื้องต้นแล้วพบว่าเห็ดหลายชนิดที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และเห็ดที่มีความโดดเด่นหนึ่งในนั้นคือ เห็ดขล้าหมา หรือ เห็ดห้าพาน หรือเห็ดห้าพระ ซึ่งเป็นเห็ดที่มีรูปทรงกลมและมีสีเหลืองสด และเมื่อค้นคว้าข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ พบว่าไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีหรือฤทธิ์ทางชีวภาพใดๆ แต่มีข้อมูลการนำมาใช้ตามภูมิปัญญาของหมอพื้นบ้านว่า เห็ดขล้าหมา มีสรรพคุณทางยาโดยสามารถนำมาใช้ในการบำรุงรักษาสุขภาพ โดยเฉพาะในสตรีที่มีปัญหาคลอดลูกหย่อนคล้อยและเต้านมหย่อนยานให้กลับมากะชับได้ดี ช่วยขับประจำเดือนให้มาเป็นปกติ

และช่วยทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบลงได้ด้วย (มติชนสุดสัปดาห์ 2558) นอกจากนี้ ยังมีการกล่าวอ้างถึงสรรพคุณในการถอนคุณไสยซึ่งเป็นความรู้ที่สืบทอดต่อกันมาตามตำรายาโบราณสายเขมร โดยนำเห็ดขล้าหมามาตากแห้งแล้วบดป่นเป็นยาลูกกลอนหรือเป็นผงขงตี้มเพื่อรักษาคุณไสยอันเกิดจากของสกปรกได้ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อศึกษาสรรพคุณในทางวิทยาศาสตร์คณะผู้วิจัยจึงนำเห็ดขล้าหมามาสกัดด้วย 50% เอทานอลแล้วนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น พบว่า เห็ดขล้าหมามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่นๆ หรือเมื่อเปรียบเทียบกับพืชหลายชนิด ดังนั้น เห็ดขล้าหมาจึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่น เช่น total phenolic contents, cytotoxicity, estrogenicity, antiestrogenicity, anti-inflammatoty activities เป็นต้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการสังเคราะห์ เภสัชเคมีและการแพทย์ต่อไป และอาจจะนำไปสู่การเพิ่มมูลค่า การอนุรักษ์และ/หรือการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไปอีกด้วย

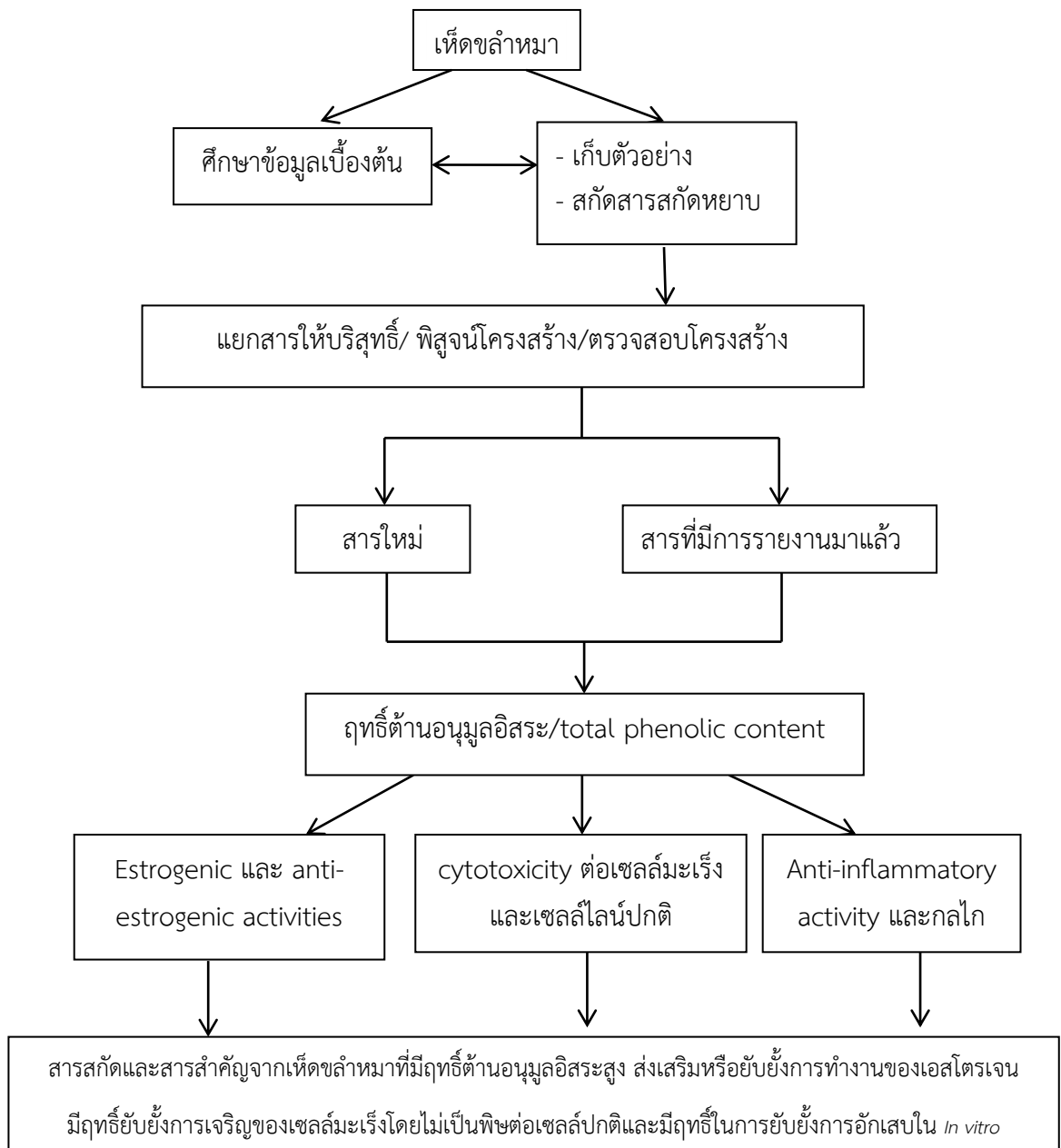
### วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดเห็ดขล้าหมา
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดขล้าหมา
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญของเห็ดขล้าหมา
4. เพื่อผลิตผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

### ขอบเขตการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเห็ดขล้าหมาจากพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว
2. สกัดสารด้วยสารละลาย 50% เอทานอล
3. แยกสารจากส่วนสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ Quick column chromatography, Column chromatography, Thin Layer Chromatography และการตกผลึก
4. พิสูจน์โครงสร้างสารด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ เช่น Ultraviolet (UV), Infrared (IR), Nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectroscopy (MS) เป็นต้น
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้แก่ antioxidants, total phenolic contents, cytotoxicity, estrogenicity, antiestrogenicity, anti-inflammatory activity

วิธีดำเนินการวิจัย ทฤษฎีและแนวทางการคิด



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสารสำคัญและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนายาจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ
3. ตีพิมพ์ผลงานเผยแพร่ในวารสารวิชาการหรือประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ
4. สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการส่งเสริมให้สมุนไพรไทยได้รับความน่าเชื่อถือจากผู้บริโภคและเผยแพร่สู่สากล
5. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ สนับสนุนและพัฒนานักศึกษาระดับปริญญาตรีให้เป็นนักวิจัย
6. ส่งเสริมการอนุรักษ์และขยายพันธุ์เห็ดตามธรรมชาติในท้องถิ่น เช่น สร้างสวนป่าสมุนไพรในมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

## บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

### เห็ดขล้าหมา

เห็ดขล้าหมา หรือ เห็ดห้าฟาน หรือ เห็ดห้าพระ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mycoamaranthus cambodgensis* (Pat.) S. Lumyong, R. Sanmee, P. Lumyong, Zhu L. Yang and M. Trappe อยู่ใน Order Boletales และ Family Hymenogasteraceae (Lumyong et al., 2003; อนงค์ และคณะ 2551)

ดอก มีความกว้าง 1-3.5 ซม. สูง 1-4 ซม. มีรูปร่างเกือบกลมหรือรูปอื่น มีเปลือกบางสีเหลืองสดถึงเหลืองอมน้ำตาล มีขนอ่อน เรียบหรือมีเกล็ดเล็กๆ (ภาพที่ 2.1)

บริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดสปอร์ มีสีขาว ยืดหยุ่นคล้ายยาง บางที่มีแขนงด้านข้างของแกนกลางเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนแล้วเป็นสีน้ำตาลดำ มีหรือไม่มีฐานคล้ายก้านสีเหลือง (ภาพที่ 2.2)

สปอร์ มีขนาด 11-14 x 7-10  $\mu\text{m}$  รูปร่างรีเหมือนลูกแพร์ ผิวมีหนามฝังอยู่ในวุ้น บางที่มีก้านสั้นสีน้ำตาล

ที่อยู่อาศัย บนพื้นดินในป่าผลัดใบและป่าสน

กินได้ เมื่อดอกอ่อน (อนงค์ และคณะ 2551)



ภาพที่ 2.1 เห็ดขล้าหมาที่เก็บได้จากป่ารอบมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

### คุณค่าทางโภชนาการ

เห็ดขล้าหมา มีโปรตีน  $2.08 \pm 0.14\%$  ( $18.97 \pm 1.29\%$  น้ำหนักแห้ง) คาร์โบไฮเดรต  $2.56\%$  ( $23.38\%$  น้ำหนักแห้ง) ไขมัน  $1.23 \pm 0.02\%$  ( $11.22 \pm 0.18\%$  น้ำหนักแห้ง) เกล้า  $1.53 \pm 0.22\%$  ( $13.96 \pm 2.01\%$  น้ำหนักแห้ง) ความชื้น  $89.04 \pm 0.67\%$  ไฟเบอร์  $3.56 \pm 1.25\%$  ( $32.47 \pm 11.49\%$  น้ำหนักแห้ง) (Srikram and Supapvanich, 2016)





ภาพที่ 2.2 ลักษณะบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดสปอร์ของเห็ดขล้าหมาที่เก็บได้จากป่ารอบมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

### ฤทธิ์ทางชีวภาพ

เห็ดขล้าหมา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ  $0.04 \pm 0.02$  mmol TE/100g น้ำหนักสด ( $0.44 \pm 0.22$  mmol TE/100g นนน้ำหนักแห้ง) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด  $9.60 \pm 0.83$  mg GAE/100g น้ำหนักสด ( $105.22 \pm 9.10$  mg GAE/100 g น้ำหนักแห้ง) และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด  $3.08 \pm 2.50$  mg CE/100g น้ำหนักสด ( $33.76 \pm 16.44$  mg CE/100g น้ำหนักแห้ง) (Srikram and Supapvanich, 2016)

### สรรพคุณทางยา

เห็ดขล้าหมาสามารถนำมาใช้ในการบำรุงรักษาสุขภาพ โดยเฉพาะในสตรีที่มีปัญหาหมดลูกหย่อนคล้อย และเต้านมหย่อนยานให้กลับมากะชับได้ดี ช่วยขับประจำเดือนให้มาเป็นปกติ และช่วยทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบลงได้ (มติชนสุดสัปดาห์ 2558)

### มะเร็ง

มะเร็งเป็นสาเหตุต้นๆ ของการเสียชีวิตของประชากรจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในประเทศไทยและทุกประเทศทั่วโลก มะเร็งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติได้ ซึ่งมีเกิดจากการกลายพันธุ์ใน DNA โดยมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น เกิดกระบวนการ carcinogenesis การได้รับสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (carcinogens, mutagens) การติดเชื้อไวรัสบางชนิด และการได้รับรังสีบางชนิด เป็นต้น หากการกลายพันธุ์ที่เกิดใน DNA นั้น มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ proto-oncogenes ไปเป็น oncogenes และการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติกลายเป็น malignant neoplastic cell และเมื่อเซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งเซลล์จะเกิดการสูญเสียคุณสมบัติ contact inhibition เกิดการต้านทานต่อการเกิด apoptosis และไม่ตอบสนองต่อ cell growth arrest signals จากนั้นจึงเกิดการสร้างเส้นเลือดเข้าไปหล่อเลี้ยง (angiogenesis) และเกิดการบุกรุกไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่น (metastasis)

### ความสัมพันธ์ของกระบวนการเกิดมะเร็งและออกซิเดชันและการอักเสบ

ในสภาวะสมดุลย์ตามธรรมชาติของเซลล์นั้น เซลล์จะมีการสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่ตายไปด้วยอัตราเร็วตามธรรมชาติอย่างสมดุลย์ แต่เมื่อมีการรบกวนสมดุลย์นั้นอาจทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ

ไปและอาจไม่สามารถควบคุมได้ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดเป็นก้อนเนื้อ หรือ tumor ซึ่งอาจพัฒนาการไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งการเป็นพัฒนาการไปเป็นเซลล์มะเร็งนั้น ประกอบด้วย 6 ลักษณะ คือ 1) เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวน 2) เซลล์นั้นต้านทานต่อการตาย (cell death) 3) เซลล์นั้นสามารถหลบหลีกการยับยั้งการเจริญ (growth suppressors) 4) กลายเป็นเซลล์ที่เป็นอมตะ (immortality) 5) กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง (angiogenesis) และ 6) เกิดการบุกรุก (invasion) และเคลื่อนย้ายไปที่อื่น (metastasis) (Hanahan and Weinberg, 2000)

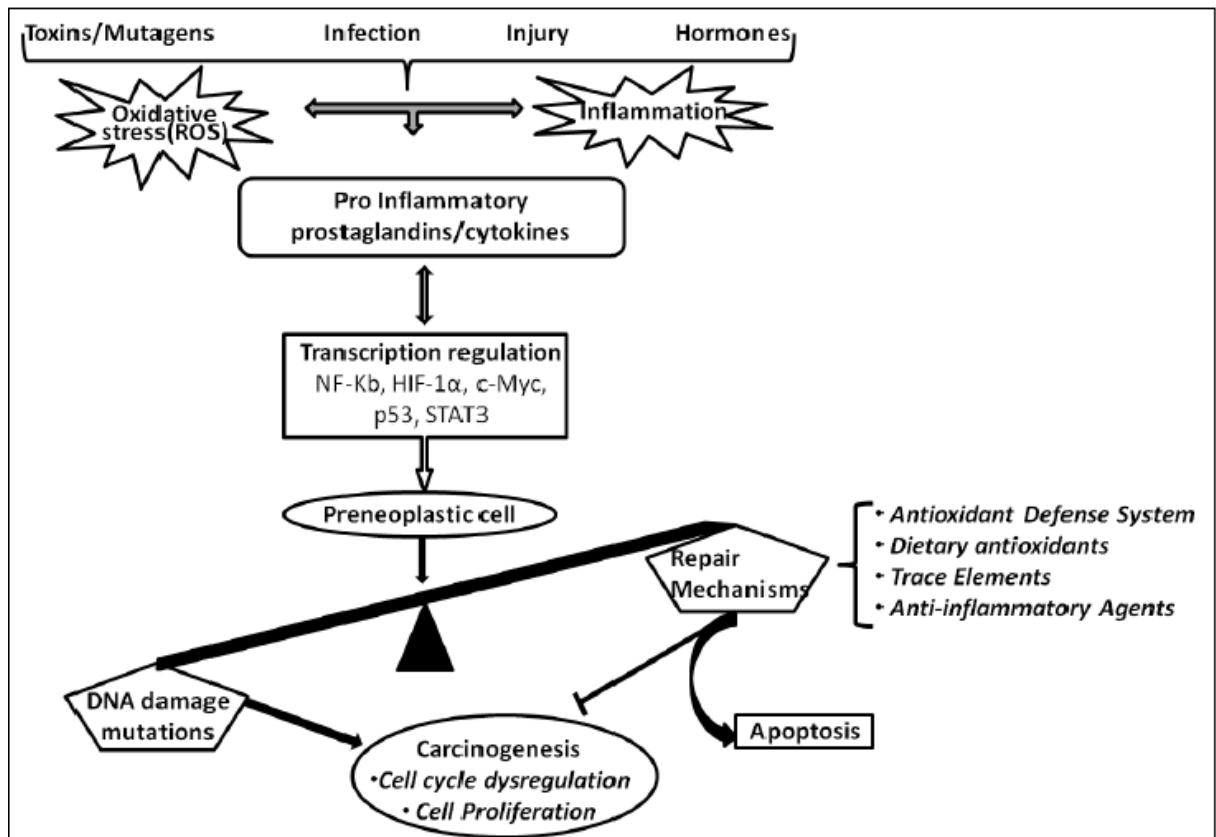
อนุมูลอิสระ (free radicals หรือ oxidants) เป็น oxidizing agent ซึ่งประกอบด้วย reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), reactive chloride species (RCS) และ sulfur แต่ ROS เป็น oxidant ที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิด oxidative damage ต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ ROS เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ โดยปกติร่างกายจะมีกระบวนการกำจัด ควบคุมอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เพื่อคงไว้ซึ่งสมดุลย์ของร่างกาย ได้แก่ catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavonoids, albumin, glutathione, polyphenols เป็นต้น (Nourazarian et al., 2014) สำหรับสาร antioxidant ที่มาจากพืช (phytochemical antioxidants) เช่น vitamin C, vitamin E, vitamin K, pigments ต่างๆ เช่น carotenoids ( $\beta$ -carotene), xanthophylls, lycopene, anthocyanins และสาร phenolic และ polyphenols ต่างๆ สามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งส่งผลให้ช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังได้ (Gupta et al., 2014)

Oxidative stress เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดย ROS ชักนำให้เกิดกระบวนการทางเมแทบอลิซึมมากขึ้น เกิดการเสียการควบคุมการทำงานของ mitochondria เกิดการชักนำให้เอนไซม์ทำงานมากขึ้น เช่น NADPH oxidase (NOX), cyclooxygenase (COX) หรือ lipoxygenase (LOX) และเกิดการหลั่งของ growth factors แบบควบคุมไม่ได้ (Storz, 2005; Babior, 1999; Chiarugi and Fiaschi, 2007). นอกจากนี้ ROS ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมทางพันธุกรรมของ cell invasion, epigenetic control ในการพัฒนาการของโรค และกระตุ้นความต้านทานทางต่อ chemotherapy (Feinberg et al., 2006, Fruehauf and Trapp, 2008) นอกจากนี้ ROS ยังเกี่ยวข้องกับการ tumor microenvironment และ metabolic re-programming ทำให้เซลล์เกิดการ metastasis และ invasion (Fiaschi and Chiarugi, 2012, Hanahan and Weinberg, 2011) อีกด้วย

ROS ควบคุมโปรตีน 2 ชนิด คือ mitogen activated protein kinase (MAPK) และ redox sensitive kinase (Waris and Ahsan, 2006) ซึ่ง MAPK เป็น serine/threonine kinases ที่ควบคุม gene expression, proliferation, metabolism และ cell death ดังนั้น MAPK activation จะนำไปสู่การเพิ่มจำนวนเซลล์โดยกระตุ้นการแบ่งเซลล์

ในระหว่างกระบวนการอักเสบ (inflammation) นั้น การ respiratory burst ที่เกิดจากการเข้ามาของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน เช่น mast cells และ leukocytes ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของ ROS และ RNS ซึ่งเป็นตัวชักนำการอักเสบไปสู่การก่อให้เกิดมะเร็ง (Hussain et al., 2003, Coussens and Werb, 2002) การเกิด activation ของ oncogenes และกลายพันธุ์หรือการ inactivation ของ tumor suppressor genes เช่น *ras* และ *p53* genes สามารถนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น การอักเสบนำไปสู่ transcription

factor activation cascade เช่น hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ), nuclear factor kappa B (NF-kB), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3) นอกจากนี้ ROS ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบโดยชักนำให้เกิดการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน inflammatory cytokines เช่น TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  และการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNAs ดังนั้น บทบาทของ ROS จึงมีผลให้เกิด oxidative stress (Kaushal and Kudva, 2013) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงบทบาทของอนุมูลอิสระและการอักเสบที่มีต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง (Kaushal and Kudva, 2013)

### การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อ ต่อสิ่งที่ก่อให้เกิดอันตราย (injurious agent) และต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง ปฏิกิริยาที่สำคัญในการอักเสบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ หรือการเปลี่ยนแปลงในหลายระบบของร่างกาย ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นในระบบหลอดเลือดฝอยภายในเนื้อเยื่อ (microcirculation) เป็นปฏิกิริยาที่ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อ และกำจัดสิ่งที่ก่อให้เกิดอันตราย รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลงด้วย นอกจากนี้การอักเสบยังมีบทบาทในการเริ่มต้นการซ่อมแซม ซึ่งในบางครั้งแม้จะเป็นการกำจัดอันตรายที่จะเกิดกับร่างกาย แต่ก็อาจก่อให้เกิดผลเสียที่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ ดังนั้นการอักเสบจึงเป็นเหมือนดาบสองคม เพราะทั้งช่วยให้ร่างกายกำจัดสิ่งแปลกปลอมอันตรายทั้งหลาย

และเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการรักษา แต่หากการอักเสบนั้นรุนแรงและไม่สามารถควบคุมได้ จะนำไปสู่การเกิดอันตรายต่อร่างกาย เกิดการอักเสบเรื้อรัง โรคเรื้อรัง และรวมถึงเกิดเนื้องอกได้ (Mantovani *et al.*, 2008)

สารสื่อกลาง (mediator) ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจากพลาสมาโดยอยู่ในรูปแบบของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด สารสื่อกลางเหล่านี้จะไปจับกับตัวรับ (receptor) ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่างๆ ที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดของสารสื่อกลาง และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) สรุปดังตารางที่ 2.1 สารสื่อกลางส่วนใหญ่มีอายุสั้น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ไม่นาน สารสื่อกลางบางชนิดกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ต่อไปอีกเป็นการขยายผลปฏิกิริยาการอักเสบ

**ตารางที่ 2.1** สรุปการเปลี่ยนแปลงและชนิดที่สำคัญของสารสื่อกลางที่เป็นสาเหตุ ตลอดจนแหล่งสร้างสารสื่อกลางที่สำคัญ

| การเปลี่ยนแปลง                      | ชนิดของสารสื่อกลาง  | แหล่งที่มาของสารสื่อกลาง  |
|-------------------------------------|---|---|
| การขยายตัวของหลอดเลือด              | - prostaglandin<br>- NO   | - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium<br>- Macrophage, Endothelium   |
| การเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด  | - Vasoactive amine<br>- C3a, C5a<br>- Bradykinin<br>- Leukotriene C4, D4, E4<br>- PAF | - Mast cell, platelet<br>- Plasma<br>- Plasma<br>- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium<br>- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium |
| Chemotaxis และ leukocyte activation | - C5a<br>- Leukotriene B4<br>- Bacterial products<br>- Cytokine (IL-8)                | - Plasma<br>- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium<br>- แบคทีเรีย<br>- Macrophage, Endothelium                                |
| อาการไข้                            | - IL-1, TNF, IL-6<br>- Prostaglandin  | - Macrophage, Activated lymphocyte<br>- เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium  |
| อาการเจ็บปวด                        | - Prostaglandin<br>- Bradykinin   | - เม็ดเลือดขาวทุกชนิด, Endothelium<br>- Plasma  |
| การทำลายเนื้อเยื่อ                  | - Lysosomal enzymes<br>- Oxygen metabolites<br>- NO                                   | - Neutrophil, Macrophage<br>- Neutrophil, Macrophage<br>- Macrophage, Endothelium   |

ในกระบวนการอักเสบ ขั้นตอนของการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะผลิตและหลั่งไซโตไคน์ ซึ่งมีมากมายหลายชนิดและมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย เซลล์แมโครฟาจ (macrophage) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ในภาวะที่มีการอักเสบพบว่ามีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่สำคัญหลายชนิด เช่น cyclooxygenase (COX-2), inducible nitric oxide synthetase (iNOS), interleukine ชนิดต่างๆ ได้แก่ IL-1 $\beta$ , IL-6 และ tumor necrosis factor เช่น TNF- $\alpha$  เป็นต้น (Walsh *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) อินเตอร์ลิวคิน-1 (IL-1) เป็นกลุ่มของไซโตไคน์

ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิดหนึ่ง โดยที่อินเตอร์ลิวคิน-1 จะกระตุ้นการสร้างและทำงานของออสติโอคลาสต์ ทำให้มีการทำลายกระดูกมากขึ้นกระตุ้นให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์อักเสบมายังบริเวณที่มีการอักเสบ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 จากเซลล์อื่นๆ นอกเหนือจากโมโนไซต์ และแมคโครฟาจ ทำให้บริเวณที่มีการอักเสบมีปริมาณของอินเตอร์ลิวคิน-1 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลทางอ้อมในการกระตุ้นเซลล์เป้าหมายให้มีการหลั่งโปรสตาแกลนดินอีสอง และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Tsuzaki *et al.*, 2003) ซึ่งสารทั้งสองอย่างนี้เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการย่อยสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง cyclooxygenase (COX) ได้อีกด้วย (Artur *et al.*, 2001) IL-1 $\beta$  เป็นไซโตไคน์ชนิดแรกที่มีรายงานว่า เป็น mediator ของการอักเสบในสัตว์ทดลอง แม้จะมีปริมาณของ IL-1 $\beta$  เพียงเล็กน้อย ก็สามารถก่อให้เกิดการอักเสบรุนแรงได้

นอกจากการหลั่งไซโตไคน์แล้ว เมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้น Membrane Phospholipids จะถูกสลายด้วย เอนไซม์ Phospholipase A2 ปลดปล่อยกรดเอราคิไดนิค ออกมา โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็น โพรสตาแกลนดิน จากการการทำงานของเอนไซม์ COX ซึ่ง โพรสตาแกลนดินนั้น มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือดรับความรู้สึกเจ็บปวด และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยไปกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และปลดปล่อยสารออกจากหลอดเลือด ทำให้เกิดการบวมแดงของเนื้อเยื่อ กระตุ้นการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส กระตุ้นการละลายของกระดูก และถ้ามีปริมาณสูงจะกดการสร้างแอนติบอดี ดังนั้นถ้าสามารถลดปริมาณการสร้างเอนไซม์ COX ได้จะช่วยลดปริมาณ โพรสตาแกลนดิน ลดความเจ็บปวด และการอักเสบได้ COX-2 จะถูกกระตุ้นให้ทำงานเมื่อมีการอักเสบ โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียทำให้มีการผลิต PGE<sub>2</sub> มากขึ้น โดยเพิ่มการแสดงออกของ COX-2 และยังเพิ่มการผลิต Ep4 receptors ในออสติโอคลาสต์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของออสติโอคลาสต์ในการทำลายกระดูก (Shoji *et al.*, 2006) โดย COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เสริมปฏิกิริยาการอักเสบ ซึ่งการให้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างเฉพาะต่อ COX-2 เพื่อระงับการอักเสบนั้นจะให้ผลการรักษาที่ดีและเกิดผลข้างเคียงต่ำกว่ากลุ่มที่ยับยั้ง COX ไม่เฉพาะเจาะจง (Burian and Geisslinger, 2005) นอกจากนี้ Otsuka *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาการเกิดอักเสบในผู้ป่วย Down syndrome ด้วยการวัดปริมาณ mRNA ของ COX-1 และ COX-2 พบว่าในผู้ป่วยมีปริมาณ COX-2 mRNA มากกว่าในคนปกติ ซึ่ง COX-2 สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโพรสตาแกลนดินอีสอง (PGE<sub>2</sub>) ซึ่งหมายถึงเกิดการการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และการทำลายกระดูกเพิ่มสูงขึ้น (Miyachi *et al.*, 2004)

TNF- $\alpha$  เป็น pro-inflammatory cytokine อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการควบคุมการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ภูมิคุ้มกันโรค ความสมดุลของเซลล์ และการเกิดเนื้องอก (Balkwill, 2009) นอกจากนี้ TNF- $\alpha$ , IL-1 และ IL-6 มีบทบาทสำคัญเหมือนเป็น endogenous pyrogens โดยการกระตุ้นการปลดปล่อย prostaglandins ที่ถูกกระตุ้นจาก COX (Kagiwada *et al.*, 2004) ในกรณีที่มีการอักเสบเกิดเนื่องจากการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม จะมีอนุมูลอิสระหลายชนิดเกิดขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วย เช่น nitric oxide (NO) ซึ่งถูกผลิตจาก inducible nitric oxide synthase (iNOS) หรือ superoxide ต่างๆ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เมื่อสะสมเป็นจำนวนมากจะชักนำให้เกิดโรคเรื้อรังร้ายแรงได้ (Aggarwal, 2004)

## เอสโตรเจน

เอสโตรเจน เป็น steroid hormone ที่มีความสำคัญในการเจริญ การพัฒนาการและการทำงานของ reproductive organs ในเพศหญิง และยังมีบทบาทสำคัญในการรักษา bone density, cognitive functions และควบคุมปริมาณคอเลสเตอรอล แต่ในขณะเดียวกันเอสโตรเจนยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ

เซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกด้วย โดยเอสโตรเจนจะทำงานผ่านการจับกับ estrogen receptors (ERs) ชนิด  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) และ  $\beta$  (ER $\beta$ ) ซึ่งเป็น transcriptional factors ที่ควบคุม estrogenic-responsive gene expressions ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การยับยั้งการเกิด apoptosis และการแบ่งตัวของเซลล์อย่างควบคุมไม่ได้ในกระบวนการเกิดมะเร็ง (Osborne, 1998) ER $\alpha$  และ ER $\beta$  มีการแสดงออกในหลายๆ เซลล์และเนื้อเยื่อ เพื่อควบคุมการทำงานของหลายระบบอวัยวะ เช่น ระบบสืบพันธุ์ กระดูก หลอดเลือดหัวใจ และระบบประสาทส่วนกลาง โดย ER $\alpha$  มีการแสดงออกหลักๆ ที่ mammary gland มดลูก รังไข่ กระดูก ระบบสืบพันธุ์เพศชาย ตับและเนื้อเยื่อไขมัน ในทางตรงกันข้าม ER $\beta$  มีการแสดงออกที่ต่อมลูกหมาก กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ ลำไส้ เนื้อเยื่อไขมัน และระบบภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตามตัวรับทั้ง 2 ชนิดสามารถพบการแสดงออกได้ที่หลอดเลือดหัวใจและระบบประสาทส่วนกลาง การใช้เอสโตรเจนหรือการใช้ฮอร์โมนทดแทนสามารถจับกับ ER ได้ทั้ง 2 ชนิด แต่นำไปสู่ความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งเพิ่มขึ้น การใช้สาร selective estrogen receptor modulators (SERMs) อาจจะสามารถจับกับ ER ได้แบบ agonist หรือ antagonist ได้ (Maximov et al., 2013) ซึ่งอาจส่งผลต่อร่างกาย เช่น estrogen-like action ที่หลอดเลือดหัวใจ กระดูก ระบบประสาทส่วนกลาง (Jordan, 2001)

บทบาทของ ERs ในมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก การลดการสร้างเอสโตรเจนในร่างกายเป็นการรักษามะเร็งเต้านมได้ การจับกันของเอสโตรเจนและ ER $\alpha$  สามารถเพิ่มการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ในขณะที่การจับที่ ER $\beta$  จะมีผลให้ลดการเพิ่มจำนวนลง (Chang et al., 2006) และการใช้สารที่มีฤทธิ์ antiestrogens โดยบล็อก ER $\alpha$  พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งเต้านมได้ (Clarke, 2006; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005.) แต่แม้ว่าสารเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพที่ดีแต่มีผลข้างเคียงกับเซลล์ที่ไม่ใช่เป้าหมายซึ่งมี ER $\alpha$  อยู่ด้วย และหากใช้เป็นเวลานานจะพบการต้านทานต่อการรักษามะเร็งด้วย antiestrogen อีกด้วย (Normanno et al., 2005; Sahin et al., 2004)

### เอสโตรเจน ความแก่และผิวหนัง

เมื่ออายุที่มากขึ้นจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศในร่างกายซึ่งทำให้มีผลกระทบต่อระบบการทำงานของอวัยวะต่างๆ มากมายไม่ว่าจะเป็นระบบสืบพันธุ์ กระดูก สมอง กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน ลำไส้ ระบบหลอดเลือดและผิวหนัง (Thornton, 2013)

ในส่วนของผิวหนัง เมื่ออายุมากขึ้นเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจะมีผลให้ผิวหนังบางลง มีการลดลงของคอลลาเจนและความยืดหยุ่น มีริ้วรอยร่องลึกเพิ่มมากขึ้นและผิวหนังมีความแห้งมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังนี้สามารถทำให้สภาพดีขึ้นได้ด้วยการทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งช่วยให้เพิ่มน้ำที่ผิว เพิ่มความยืดหยุ่นและความหนาของผิว เพิ่มคอลลาเจนและยังช่วยลดริ้วรอยร่องลึก (Thornton MJ. 2002; 2005; Stevenson and Thornton, 2007) นอกจากนี้ เอสโตรเจนยังมีผลให้เกิดการรักษาแผล (wound healing) ซึ่งเกิดจากการปรับเปลี่ยน inflammatory response, เร่งการ re-epithelialisation, กระตุ้น granulation tissue formation และควบคุม proteolysis (Emmerson and Hardman, 2012)

ในส่วนของการอักเสบ มีการแสดงออกของ ERs ใน leucocytes, monocytes, macrophages และ magakaryocytes แสดงว่าเอสโตรเจนสามารถมีผลต่อการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบนี้ โดยมีการศึกษาพบว่า เอสโตรเจนสามารถลดการแสดงออกของ macropage migration inhibition factor (MIF)

ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokines ที่หลั่งจาก monocytes, T-lymphocytes, endothelial cells และ keratinocytes (Ashcroft et al., 2003) ส่วนการทริทผู้ป่วยด้วยการทาเอสโตรเจนที่บริเวณแผล พบว่า แผลดังกล่าวมีปริมาณ neutrophils ลดลงและมีการสมานแผล (Ashcroft et al., 1999) นอกจากนี้ เอสโตรเจนยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ neutrophil adhesion molecules และลดการแสดงออกของ L-selectin ซึ่งทำให้ลดความสามารถของ neutrophils ในการที่จะไปจับที่บริเวณที่มีการอักเสบ (Ashcroft et al., 1999) การที่แผลหายช้าเมื่ออายุมากขึ้นนั้นส่วนหนึ่งเกิดจากการมี neutrophils มาที่แผลมากมายและมีการสร้าง protease (Ashcroft et al., 2000) และลดระดับของ fibronectin แล้วเมื่อมีการทริทด้วยเอสโตรเจนพบว่า สามารถลดจำนวน neutrophils ลงจึงเป็นการเพิ่มระดับ fibronectin โดยอ้อม และยังพบว่า เอสโตรเจนช่วยลดการทำงานของเอนไซม์ elastase และลดการสลาย fibronectin ที่เนื้อเยื่อที่เป็นแผล (Ashcroft et al., 1999)

การศึกษาการลดลงของคอลลาเจนในผู้ที่ขาดฮอร์โมนที่มีอายุมาก เมื่อทำการทริทด้วยเอสโตรเจนพบว่า ปริมาณคอลลาเจนกลับมามีปริมาณพอๆ กันกับผู้ที่มีอายุน้อยกว่า (Ashcroft et al., 1997) เอสโตรเจนยังรักษาสมดุลย์ของการสร้างและการสลายคอลลาเจน (Ashcroft et al., 1999; 1997) และลดการสร้าง proteinase (Ashcroft et al., 1997) นอกจากนี้ ยังพบว่าเอสโตรเจนกระตุ้นการ migration ของเซลล์ human dermal fibroblasts เพาะเลี้ยงที่ได้จาก scalp (Stevenson et al., 2008a), breast (Stevenson et al., 2008b) และ abdominal skin (Stevenson et al., 2009) ซึ่งมีการเพิ่ม migration เพียงการตอบสนองต่อ  $17\beta$ -estradiol และ  $ER\alpha$  agonist แต่ไม่พบใน  $ER\beta$  agonist (Stevenson et al., 2009)

Phytoestrogen หรือ plant estrogen เป็นสารที่เลียนแบบการทำงานของเอสโตรเจน เช่น diadzein และ genistein ที่พบในถั่วเหลือง สาร phytoestrogen นี้สามารถที่จะจับกับทั้ง  $ER\alpha$  และ  $ER\beta$  ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้ง agonist และ antagonist (Hwang et al., 2006) ซึ่งถูกจัดเป็น selective estrogen receptor modulators (SERMs) ตามธรรมชาติได้ด้วย ซึ่งอาจจะสามารถนำมาทดแทนเอสโตรเจนในผู้หญิงวัยทองได้ phytoestrogen มีผลต่อผิวหนังของคนด้วย โดยมีการศึกษาพบว่าสารกลุ่มนี้สามารถลด UV-induced cell death ในเซลล์ keratinocytes ที่เพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของผิวหนัง ลดริ้วรอยร่องลึกและเพิ่มการสร้าง type 1 collagen (Jackson et al., 2011)

ดังนั้น ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอสโตรเจนจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา estrogenic activity และฤทธิ์ anti-estrogenic activity ของสารหรือผลิตภัณฑ์นั้นๆ เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ของการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นๆ ที่อาจจะมีผลต่อการยับยั้งหรือการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ และจากข้อมูลสรรพคุณของเห็ดขล้าหมาที่มีผู้รายงานว่า เห็ดขล้าหมา มีสรรพคุณทางยาโดยสามารถนำมาใช้ในการบำรุงรักษาสุขภาพ โดยเฉพาะในสตรีที่มีปัญหาหลอดลมอักเสบและไตอักเสบ ห่อนยานให้กลับมากะชับได้ดี ช่วยขับประจำเดือนให้มาเป็นปกติ และช่วยทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบลงได้นั้น (มติชนสุดสัปดาห์ 2558) คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานเบื้องต้นไว้ว่า เห็ดขล้าหมาอาจมีฤทธิ์เกี่ยวกับฮอร์โมนเพศหญิง ดังนั้น เห็ดขล้าหมาจึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ estrogenic และ anti-estrogenic activities ตลอดจนการศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบอีกด้วย

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. Tannic acid (Sigma-Aldrich, China)
2. Gallic acid (Sigma-Aldrich, China)
3. Folin-ciocalteu's phenol reagent (Carlo erba reagent, Italy)
4. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Acros organics, Belgium)
5. Ascorbic acid (Alfa Aesar, Great Britain)
6. Tocopherol (Sigma reagent, China)
7. Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
8. Syringe filter (Sartorius, Germany)
9. DMSO (V.S.CHEM HOUSE, Thailand)
10. 95% ethanol (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย)
11. Tryptic soy agar (HiMedia Laboratories, India)
12. DMEM (Gibco, USA)
13. FBS (Gibco, USA)
14. Penicillin-streptomycin (Gibco, USA)
15. Trypsin EDTA (Gibco, USA)
16. Molecular Biology Agarose (Bio-Rad, Spain)
17. 1kb DNA ladder (Promega, U.S.A.)
18. Blue/Orange 6X loading dye (Promega, U.S.A.)
19. Primer  $\beta$ -actin (Eurofins MWG Operon, Germany)
20. Primer IL-1 $\beta$  (Eurofins MWG Operon, Germany)
21. Primer COX-2 (Eurofins MWG Operon, Germany)
22. Primer TNF- $\alpha$  (Eurofins MWG Operon, Germany)
23. Primer IL-6 (Eurofins MWG Operon, Germany)
24. Primer iNOS (Eurofins MWG Operon, Germany)
25. Primer tyrosinase (Eurofins MWG Operon, Germany)
26. Primer TRP-1 (Eurofins MWG Operon, Germany)
27. Primer TRP-2 (Eurofins MWG Operon, Germany)
28. Tris base (Ajax, Australia)
29. Glacial acetic acid (Ajax, Australia)
30. EDTA (Ajax, Australia)
31. Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany)
32. TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany)
33. Novel Juice (GeneDirex)
34. RNA extraction kit (GE Healthcare, UK)



35. 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dyphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA)
36. DMEM (Invitrogen, UK), FBS (Invitrogen, UK)
37. *Escherichia coli* LPS (Sigma, USA)
38. RNase free DNase Set (QIAGEN)
39. Estradiol (Sigma, USA)
40. MEM no phenol red (Thermo Fisher Scientific, USA)
41. Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum (DCC FBS) (Gibco, USA)
42. Resazurin (Sigma, USA)
43. Sterile cell culture plasticwares
44. Quercetin (Sigma-Aldrich, China)

### เครื่องมือ

1. Sonicator (Ultrasonic Cleaner set, Model WUC-D22H, Daihan Scientific, Korea)
2. Rotary evaporator (R-210, Buchi, Switzerland)
3. Microplate reader (Dragon-tube, China)
4. pH meter (Mettlor Toledo MP 220, Germany)
5. Centrifuge (Kobota รุ่น 5922, Japan)
6. Incubator (Memmert Schutzart DIN 40050-IP 20, Germany)
7. Autoclave (STURDY รุ่น SA-300VL, TAIWAN)
8. Shaking water bath (Julabo รุ่น SW22, Germany)
9. Laminar air flow (ESCO รุ่น AC2-4AI, USA)
10. CO<sub>2</sub> incubator (SHEL LAB รุ่น 3517-2, USA)
11. Inverted microscope (Nikon ESLIPSE TS100 รุ่น C-SHG, JAPAN)
12. Microplate reader (BECKMAN COULTER DTX 880, Austria)
13. Microplate shaker (Heidolph TITRAMAX 1000, Germany)

### ตัวอย่างสมุนไพร

เห็ดขล้าหมา ถูกเก็บในพื้นที่ป่าเต็งรัง ภายในเขตมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว อำเภอดงนาคร จังหวัดสระแก้ว ในระหว่างเดือนกันยายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 และ 2559 (ภาพที่ 3.1)

### วิธีการเตรียมสารสกัด

นำเห็ดมาล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นบางๆ (ภาพที่ 3.2) แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นำเห็ดที่แห้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล 2 ครั้งๆ ละ 7 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบแห้งคิดเป็น 15.1% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง



ภาพที่ 3.1 ลักษณะเห็ดขล้าหมาที่พบในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว



ภาพที่ 3.2 ลักษณะเห็ดที่นำมาใช้ในการศึกษา

## การแยกสารบริสุทธิ์จากพืชล้าหมาและการพิสูจน์โครงสร้างเคมีของสาร

นำส่วนสกัดหยาบละลายกับ *n*-hexane และ MeOH ตามลำดับ นำส่วนที่ละลายกับ MeOH มาระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้ส่วนสกัดหยาบ MeOH (9.73 กรัม) จากนั้นนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  แล้วเพิ่มขั้วด้วย MeOH ตามลำดับ จะได้ 10 fractions คือ S1 ถึง S10

Fraction S3 (351.2 กรัม) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography และชะด้วย 40% EtOAc-hexane ได้ 7 subfractions (S3a-S3g) จากนั้น นำ subfraction S3d (182.0 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 15% MeOH-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ได้สาร **compound 2** (23.2 มิลลิกรัม)

Fraction S8 (612.1 กรัม) นำมาตกผลึกด้วย 100 % MeOH ได้ของแข็งสีขาวของสาร **compound 1** (252.3 มิลลิกรัม)

จากนั้น ทำการพิสูจน์โครงสร้างสารด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ Ultraviolet (UV), Infrared (IR), Nuclear magnetic resonance (NMR) และ mass spectroscopy (MS)

## การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

#### ระบบที่ใช้

Stationary phase คือ แผ่น TLC ขนาด 10 X 10 เซนติเมตร ชนิดสำเร็จรูป

Mobile phase คือ EtOAc : Hexane : Acetic acid = 60 : 3.93 : 0.07

#### วิธีการ

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะรูปแบบ TLC ในตัวอย่างสารสกัด โดยในแต่ละตัวอย่างซึ่ง 20 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล แล้ว Sonicate นาน 20 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 แล้วนำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ spot ลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูปปริมาณสารตัวอย่างละ 10  $\mu\text{l}$

หลังจากให้ Mobile phase เคลื่อนที่ผ่าน stationary phase เพื่อแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในพืชตัวอย่างแล้วนำแผ่น TLC มาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และตรวจสอบภายหลังจากปฏิกิริยาเคมีโดยใช้น้ำยาสเปรย์ 3 ชนิด 1) Anisaldehyde-  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2) 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Ethanol, 3) DPPH จากนั้นถ่ายรูป

### การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### เครื่องมือ

- Agilent-1200 HPLC
- C18, Agilent hypersil ODS column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6X250 mm)
- pH Mettler Toledo 320 pH meter

#### การเตรียม Mobile phase

- Solution A: Acetonitrile:H<sub>2</sub>O:phosphoric acid = 79.7:20:0.3 โดย เติม 85% phosphoric acid ปริมาณ 3.529 ml ลงไปใน acetonitrile 797 ml แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml
- Solution B: 0.3% phosphoric acid (pH=1.70)

โดย ตวง 85% phosphoric acid ปริมาณ 3.529 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 ml

#### การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate นาน 30 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่าน 0.45  $\mu$ m nylon filter membrane

#### ระบบการวิเคราะห์ HPLC

ระบบการวิเคราะห์เป็น Gradient elution (ตารางที่ 3.1) ความยาวคลื่น 280 nm

ตารางที่ 3.1 ระบบการวิเคราะห์ HPLC เป็น Gradient elution

| Time | Flow (ml/min) | Solution A (%) | Solution B (%) |
|------|---------------|----------------|----------------|
| 0    | 1             | 5              | 95             |
| 5    | 1             | 10             | 90             |
| 10   | 1             | 20             | 80             |
| 25   | 1             | 30             | 70             |
| 35   | 1             | 40             | 60             |
| 45   | 1             | 50             | 50             |

#### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์

##### ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay (Oh et al., 2008)

เตรียมสารละลาย DPPH (2, 2 - diphenyl - picryl hydrazine) ความเข้มข้น 1 mM แล้วเติมลงในสารละลายสารสกัดสมุนไพร บ่มนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นคำนวณค่า %inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) เปรียบเทียบกับค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานวิตามินซีด้วยวิธีทดสอบเดียวกัน

##### ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Lado et al., 2004)

ใช้  $FeSO_4$  เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยเจือจางด้วย 40 mM HCl ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยละลายสารสกัดด้วย 50% EtOH แล้วเจือจางให้ได้ 3 ความเข้มข้น จากนั้น pipette ตัวอย่าง 6  $\mu$ l ผสมกับน้ำกลั่น 18  $\mu$ l แล้วเติมด้วย FRAP reagent (50 ml acetate buffer pH 3.6, 5 ml TPTZ solution, 5 ml  $FeCl_3$  solution) 180  $\mu$ l แล้วตั้งทิ้งไว้ 4 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 600 nm คำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานให้ได้เป็นค่า relative antioxidation activity (FRAP value)

ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999; Sripanidkulchai and Fangkrathok, 2014)

ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ให้สารทดสอบผสมกับกับ Folin reagent แล้วเติม 20 % sodium carbonate บ่มนาน 40 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 nm จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงของสมุนไพรเทียบกับกราฟมาตรฐาน แสดงค่า total phenolics เป็น gallic acid equivalent (GAE) เป็นหน่วย mg/g ของสารสกัด ทำ 3 ซ้ำ สำหรับทุกความเข้มข้น

##### ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี

การทำ standard curve โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ด้วยการชั่ง 0.02 - 0.1 mg ละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 0.5 ml แล้วเติม 2% aluminium chloride 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ 1 ชม.

ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm แล้วพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาค่า % Coefficient of variation (CV)

การวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ โดยละลายตัวอย่างด้วยเอทานอล แล้ว sonicate 30 นาที แล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ความเข้มข้น โดยใช้สารละลายตัวอย่าง ปริมาตรตั้งแต่ 50-200  $\mu$ l มาเติมด้วย 99% EtOH ให้มีปริมาตรรวม 0.5 ml แล้วเติม 2% aluminium chloride 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm จากนั้น คำนวณหาค่าเฉลี่ย O.D./ml จากนั้น ทำการคำนวณหาค่า total flavonoid โดยเปรียบเทียบกับ standard curve แล้วรายงานในหน่วย QAE mg/g ของสารสกัด ทำซ้ำ 3 ครั้ง

### การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) (ดัดแปลงจาก Fangkrathok et al., 2013)

1. นำเซลล์แมคโครเฟจ RAW264.7 cell เลี้ยงในอาหาร phenol red free MEM + 10% FBS +1% antibiotic+antimycotic ลงใน 96 well plate ให้มีเซลล์จำนวน 10,000-20,000 cells/well แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ซังสารสกัดแต่ละสารสกัดมาแล้วละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ 100 mg/ml แล้วเจือจางสารสกัด หรือสารมาตรฐาน L-NAME ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารที่มี 10  $\mu$ g/ml LPS แล้ว ปิเปต 100  $\mu$ l ลงในเซลล์ในข้อ 1 แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3. ปิเปตน้ำเลี้ยงเซลล์มาหลุมละ 50  $\mu$ l ลงใน 96 well plate อีกอัน แล้วเติม 50  $\mu$ l ของสารละลาย Griess reagent (solution A: 1% Sulfanilamide in 5% phosphoric acid, solution B: 0.1% NED in water ผสม A และ B สัดส่วน 1:1) ลงในน้ำเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 nm แล้วคำนวณ % NO production แล้วคำนวณหา IC<sub>50</sub> จากสมการเส้นตรง

$$\% \text{ NO production} = (A_{540\text{สารสกัดที่มี LPS}} / A_{540\text{control ที่มี LPS}}) \times 100$$

4. นำเซลล์ที่เหลือมาวิเคราะห์ cell viability เพื่อดูความเป็นพิษของสารสกัด โดยใช้วิธี resazurin reduction assay (ดัดแปลงจาก Borra et al., 2009) แล้ววัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent intensity) ที่ Ex=530 nm, Em=590 nm แล้วทำการคำนวณ % viability เพื่อยืนยันว่าการลดลงของ NO ไม่ได้เกิดจากการตายของเซลล์

$$\% \text{ viability} = (\text{Fluorescent intensity}_{\text{สารสกัด}} / \text{Fluorescent intensity}_{\text{control}}) \times 100$$

### การทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7 และ MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin แล้วบ่มที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เตรียมสารสกัดและ/หรือสารบริสุทธิ์เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเติมลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 100  $\mu$ l เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน tamoxifen ซึ่งเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกัน แล้วบ่มที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เจริญโดยใช้วิธี resazurin reduction assay แล้ววัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ Ex=530 nm, Em=590 nm แล้วคำนวณหา % inhibition หรือ % cytotoxicity และแสดงผลเป็นค่า 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)

### การศึกษาฤทธิ์ estrogenic activity

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิดเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มี ER receptor MCF-7 ลงใน 96 well plate ใน culture plate ในอาหาร FBS free MEM + 1% antibiotic+antimycotic ที่ไม่มี phenol red ที่ไม่เติม FBS เพื่อให้เกิดภาวะที่ปราศจากเอสโตรเจน แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 3 วัน
2. ทำการย้ายเซลล์มาเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละประมาณ 10,000 cells/well ปริมาตร 100 µl ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด FBS free MEM +1% antibiotic+antimycotic ที่ไม่มี phenol red + 5% DCC-FBS
3. เจือจางสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่ต้องการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบ 2X แล้วปิเปตลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 100 µl แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 4 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง
4. เจือจาง estradiol (E2) ให้ได้ความเข้มข้น 2 – 200 pM แบบ 2X แล้วปิเปตลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 100 µl แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 4 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง
5. ทำการวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี resazurin reduction assay แล้ววัดการเรืองแสงฟลูออโรเรสเซนซ์ที่ Ex=530 nm, Em=590 nm แล้วทำการคำนวณเป็นจำนวนเซลล์และเปรียบเทียบกับผลของ E2

### การศึกษาฤทธิ์ anti-estrogenic activity

1. เจือจางสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่ต้องการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบ 4X แล้วปิเปตลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 1 (การศึกษาฤทธิ์ estrogenic activity) ปริมาตร 50 µl และเติม 50 µl ของ 400 pM E2 แล้วบ่มไว้ที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 4 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง
2. ทำการวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี resazurin reduction assay แล้ววัดการเรืองแสงฟลูออโรเรสเซนซ์ที่ Ex=530 nm, Em=590 nm แล้วทำการคำนวณเป็นจำนวนเซลล์และเปรียบเทียบกับผลของ E2

### การศึกษาฤทธิ์ anti-inflammatory activity

1. การเลี้ยงเซลล์  
เลี้ยงเซลล์ murine macrophage (RAW264.7 cells) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5%, 37°C
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด โดยใช้วิธี resazurin reduction assay  
ทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ 10,000 cells/well ใน 96 well plate แล้ว incubate ใน CO<sub>2</sub> incubator, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ แล้ว incubate ใน CO<sub>2</sub> incubator, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เจริญโดยใช้วิธี resazurin reduction assay แล้ววัดการเรืองแสงฟลูออโรเรสเซนซ์ที่ Ex=530 nm, Em=590 nm แล้วคำนวณหา % inhibition ทำซ้ำ 3 ครั้ง
3. การทดสอบผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS ของเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย *E.coli* LPS
  - 3.1 Split cell ความเข้มข้น 10<sup>6</sup> cells/ml ปริมาตร 1 ml ลงใน 12 well plate จากนั้น incubated เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
  - 3.2 เติมสารทดสอบ ความเข้มข้นที่กำหนด incubated เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
  - 3.3 กระตุ้นด้วย *E.coli* LPS แล้ว incubated ต่ออีก 2 ชั่วโมง

3.4 เก็บ และสกัด RNA โดยใช้ RNA extraction kit (GE Healthcare, UK) และใช้วิธีการสกัดตามที่ระบุมาในชุดสกัด ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก และตามด้วยการทำให้ชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกนั้นมีขนาดลดลง และเมื่อใช้ Column ที่สามารถจับกับ RNA ได้ total RNA จะจับอยู่บริเวณ Column นี้ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ และกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase enzyme สุดท้ายล้าง RNA ที่ได้ออกจาก Column โดยใช้น้ำที่ไม่มี RNase วัดปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วย UV spectrophotometer ที่ 260 และ 280 nm แล้วคำนวณหาปริมาณ total RNA ที่ได้ โดยใช้สูตร

$$\text{Concentration of RNA sample} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ใช้ Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) เปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งใช้ปริมาณ RNA เริ่มต้น 40 ng แล้วตรวจหาปริมาณของ  $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA เริ่มต้น 3 ul โดยใช้ primer สำหรับ  $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง thermal cycler PCR (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2400) แต่ละยีนใช้ 27 รอบในการเพิ่มปริมาณซึ่งระบบที่ใช้ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

| Gene                          | Primer  | Sequence : (5'-3')          | Product size (bp) |
|-------------------------------|---------|-----------------------------|-------------------|
| $\beta$ -actin <sup>(1)</sup> | Forward | TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT  | 285               |
|                               | Reverse | CCTAGAAGCATTTCGCGGTGCACGATG |                   |
| IL-1 $\beta$ <sup>(2)</sup>   | Forward | CAGGATGAGGACATGAGCACC       | 447               |
|                               | Reverse | CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC      |                   |
| COX-2 <sup>(1)</sup>          | Forward | GGAGAGACTATCAAGATAGT        | 861               |
|                               | Reverse | ATGGTCAGTAGACTTTTACA        |                   |
| TNF- $\alpha$ <sup>(1)</sup>  | Forward | ATGAGCACAGAAAGCATGATC       | 276               |
|                               | Reverse | TACAGGCTTGTCACCTCGAATT      |                   |
| IL-6 <sup>(2)</sup>           | Forward | CATCCAGTTGCCTTCTTGGGA       | 463               |
|                               | Reverse | GCATTGGAAATTGGGGTAGGAAG     |                   |
| iNOS <sup>(1)</sup>           | Forward | AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT | 454               |
|                               | Reverse | GCTGTGTGTCACAGAAGTCTCGAACTC |                   |

(1) = Won et al., 2006; (2) = Sugawara et al., 2003

ตารางที่ 3.3 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA

| Genes          | Denaturation<br>/ RT<br>Inactivation | For Cycles       |                  |                   | Final<br>Extension | Hold |
|----------------|--------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|------|
|                |                                      | Denaturation     | Annealing        | Extension         |                    |      |
| $\beta$ -actin | 95 °C, 2 min                         | 94 °C, 1 min     | 60 °C, 1 min     | 72 °C, 1 min      |                    |      |
| IL-1 $\beta$   | 94 °C, 2 min                         | 94 °C, 45<br>Sec | 60 °C, 45<br>Sec | 72 °C, 1 min      | 72 °C, 10<br>min   | 4 °C |
| COX-2          | 95 °C, 2 min                         | 94 °C, 1 min     | 60 °C, 1 min     | 72 °C, 1 min      |                    |      |
| TNF- $\alpha$  | 94 °C, 2 min                         | 94 °C, 15<br>Sec | 60 °C, 1 min     | 72 °C, 1 min      |                    |      |
| IL-6           | 94 °C, 2 min                         | 94 °C, 15<br>Sec | 60 °C, 1 min     | 72 °C, 1 min      |                    |      |
| iNOS           | 95 °C, 2 min                         | 95 °C, 1 min     | 60 °C, 1 min     | 72 °C, 1.5<br>min |                    |      |
|                |                                      |                  |                  |                   |                    |      |

ตรวจสอบ RT-PCR products ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1.5% เจลอะกาโรส ใช้ TAE buffer 1X เป็นตัวทำละลาย วัดความเข้มของแถบ products โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ Novel Juice (GeneDirex) กับ DNA และสามารถเรืองแสงได้เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system) เพื่อแสดงถึงระดับการแสดงออกของ IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS จากนั้นคำนวณเป็นสัดส่วนที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุม ทำการศึกษซ้ำ 3 ครั้ง

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในการทดสอบใช้สถิติ one way ANOVA และใช้การเปรียบเทียบของ Post HOC Multiple Comparisons เป็น LSD (Least Significant Difference)



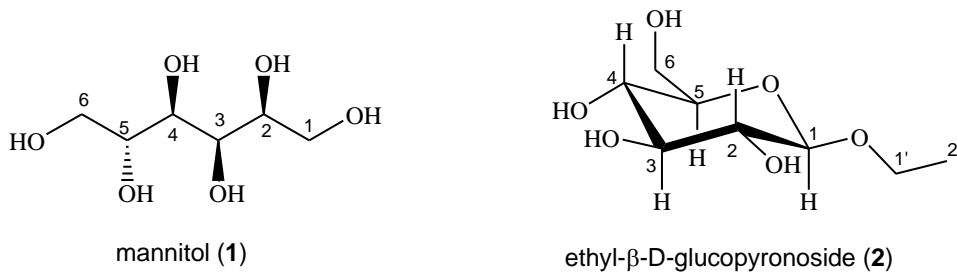
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์และการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมี

จากการทำการสกัดสารจากเห็ดขล้าหมาแล้วนำแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมี พบว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มี 2 ชนิด ซึ่งมีรายละเอียดของโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

Compound 1: ของแข็งสีขาว; mp 166-168 °C;  $[\alpha]_D^{25} +28.8$  (c 0.25, DMSO); IR (neat)  $\nu_{\max}$  3385 (O-H), 2938 (C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) และ  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz), จากตารางที่ 4.1 เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว คือ D-mannitol (1) (ภาพที่ 4.1)

Compound 2: ของแข็งสีขาว; mp 152-154 °C;  $[\alpha]_D^{25} -33.2^\circ$  (c 0.54, DMSO); IR (neat)  $\nu_{\max}$  3430 (O-H), 2937 (C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) และ  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz), จากตารางที่ 4.2 เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว คือ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (2) (ภาพที่ 4.1)

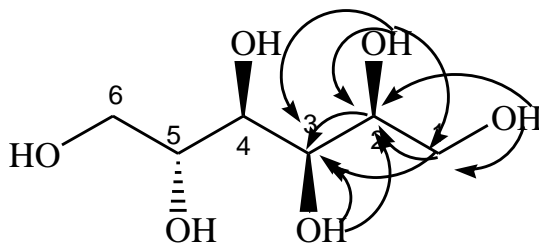


### ภาพที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเห็ดขล้าหมา

สาร compound 1; mannitol

เป็นของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุล  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ , mp. 166-168 °C ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล ( $3385 \text{ cm}^{-1}$ ) จากข้อมูล  $^{13}\text{C}$  NMR และ DEPT (ตารางที่ 4.1) ปรากฏสัญญาณของ 2 ชุดสัญญาณของ oxymethylene คาร์บอนที่  $\delta$  64.3 และ สัญญาณของ oxymethines คาร์บอนที่  $\delta$  70.1 และ 71.8 และข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR ปรากฏสัญญาณของ AB system โปรตอนที่  $\delta$  3.37 (2H, m,  $\text{H}_A\text{-1/ H}_A\text{-6}$ ) และ 3.61 (2H, m,  $\text{H}_B\text{-1/ H}_B\text{-6}$ ), สัญญาณของ oxymethine โปรตอนที่  $\delta$  3.46 (2H, m, H-2/H-5) และ 3.54 (2H, t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , H-3/H-4) และสัญญาณของ hydroxyl โปรตอน 3 ชุดสัญญาณที่  $\delta$  4.14 (2H, d,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , OH-3/OH-4), 4.33 (2H, t,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , OH-1/OH-6) และ 4.41 (2H, d,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , OH-2/OH-5). นอกจากนี้ ข้อมูล HMBC (ภาพที่ 4.2) สามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้ สัญญาณของ oxymethine โปรตอน H-2 และ H-5 ที่  $\delta$  3.46 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่  $\delta$  64.3 (C-1/C-6) และ 70.1 (C-3/C-4) และ 71.8 สัญญาณของ oxymethine โปรตอน H-3 และ H-4 ที่  $\delta$  3.54 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่  $\delta$  64.3 (C-1/C-6) และ 71.8 (C-2/C-5) นอกจากนั้นแล้ว oxymethylene โปรตอน 2H-1 และ 2H-6 ที่  $\delta$  3.37 และ 3.61 แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่  $\delta$  70.1 (C-3/C-4) และ 71.8 (C-2/C-5) ซึ่งบ่งชี้ตำแหน่งของหมู่ OH ที่ C-1/C-6, C-2/C-5 และ C-3/C-4 เมื่อได้เปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับข้อมูลของสาร

compound **1** กับ mannitol (Sripanidkulchai et al., 2009, Potekhina et al., 2003, Kim et al., 2008 และ Munkhgerel et al., 2011) พบว่าสาร compound **1** เป็น mannitol



ภาพที่ 4.2 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของ compound **1**

ตารางที่ 4.1. แสดงข้อมูล  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, และ HMBC NMR (400 และ 100 MHz, DMSO- $d_6$ ) ของสาร compound **1** ( $\delta$  in ppm, multiplicities,  $J$  in Hz)

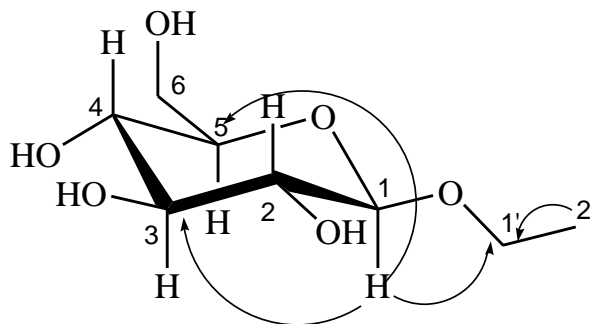
| ตำแหน่ง | $\delta$ $^1\text{H}$ | $\delta$ $^{13}\text{C}$ | DEPT            | HMBC          |
|---------|-----------------------|--------------------------|-----------------|---------------|
| 1       | 3.37 m, 3.61 m        | 64.3                     | CH <sub>2</sub> | 2,3           |
| 2       | 3.46 m                | 71.8                     | CH              | 1,3           |
| 3       | 3.54 t (7.2)          | 70.1                     | CH              | 1,2           |
| 4       | 3.54 t (7.2)          | 70.1                     | CH              | 5,6           |
| 5       | 3.46 m                | 71.8                     | CH              | 4,6           |
| 6       | 3.37 m, 3.61 m        | 64.3                     | CH <sub>2</sub> | 4,5           |
| 1,6-OH  | 4.33 t (5.2)          | -                        | -               | 1,2 (5,6)     |
| 2,5-OH  | 4.41 d (5.2)          | -                        | -               | 1,2,3 (4,5,6) |
| 3,4-OH  | 4.14 d (7.2)          | -                        | -               | 2,3 (4,5)     |

สาร compound **2**; ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

เป็นของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุล C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3430 cm<sup>-1</sup>) ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR (ตารางที่ 4.2) ปรากฏสัญญาณของ OEt 1 หมู่ ที่  $\delta_{\text{H}}$  1.13 (t, 7.2, 2H-2'), 3.50 (m, H-1') และ 3.81 (m, H-1')

นอกจากนี้ยังปรากฏลักษณะเฉพาะโครงสร้างของ glucopyranoside สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.92 (td,  $J$  = 8.0, 4.8 Hz, H-2), 3.03 (td,  $J$  = 8.0, 4.4 Hz, H-3), 3.05 (td,  $J$  = 8.0, 4.0 Hz, H-4), 3.14 (m, H-5), 3.43 (m, H-6), 3.65 (m, H-6) และ 4.10 (d,  $J$  = 8.0 Hz, H-1) และสัญญาณที่  $\delta_{\text{C}}$  61.6 (C-6), 70.5 (C-4), 73.9 (C-2), 77.2 (C-5), 77.3 (C-3) และ 103.1 (C-1) จากข้อมูลของ COSY spectrum แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อของพันธะระหว่าง H-1 กับ H-2 ของพันธะระหว่าง H-2 กับ H-1 และ H-3 ของพันธะระหว่าง H-3 กับ H-2 และ H-4, ของพันธะระหว่าง H-4 กับ H-3 และ H-5, และ ของพันธะระหว่าง H-5 กับ H-4 และ H-6 จากข้อมูลดังกล่าวระบุได้ว่ามีน้ำตาลชนิด glucopyranoside จำนวน 1 หมู่ ซึ่ง anomeric โปรตอนมี  $\delta_{\text{H}}$  4.10

(d,  $J = 8.0$  Hz, H-1) ยังแสดง HMBC correlation กับคาร์บอนที่  $\delta_c$  77.2 (C-5), 77.3 (C-3) และ 64.3 (C-1') ข้อมูลนี้ระบุตำแหน่งการเชื่อมต่อของหมู่ OEt กับ glucopyranoside ที่ C-1 และ C-1' (ภาพที่ 4.3) เมื่อได้เปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับข้อมูลของสาร compound 2 กับ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (Achenbach และ Benirschke., 1997 และ Bose-Basu et al., 2007) พบว่าสาร compound 2 เป็น ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside



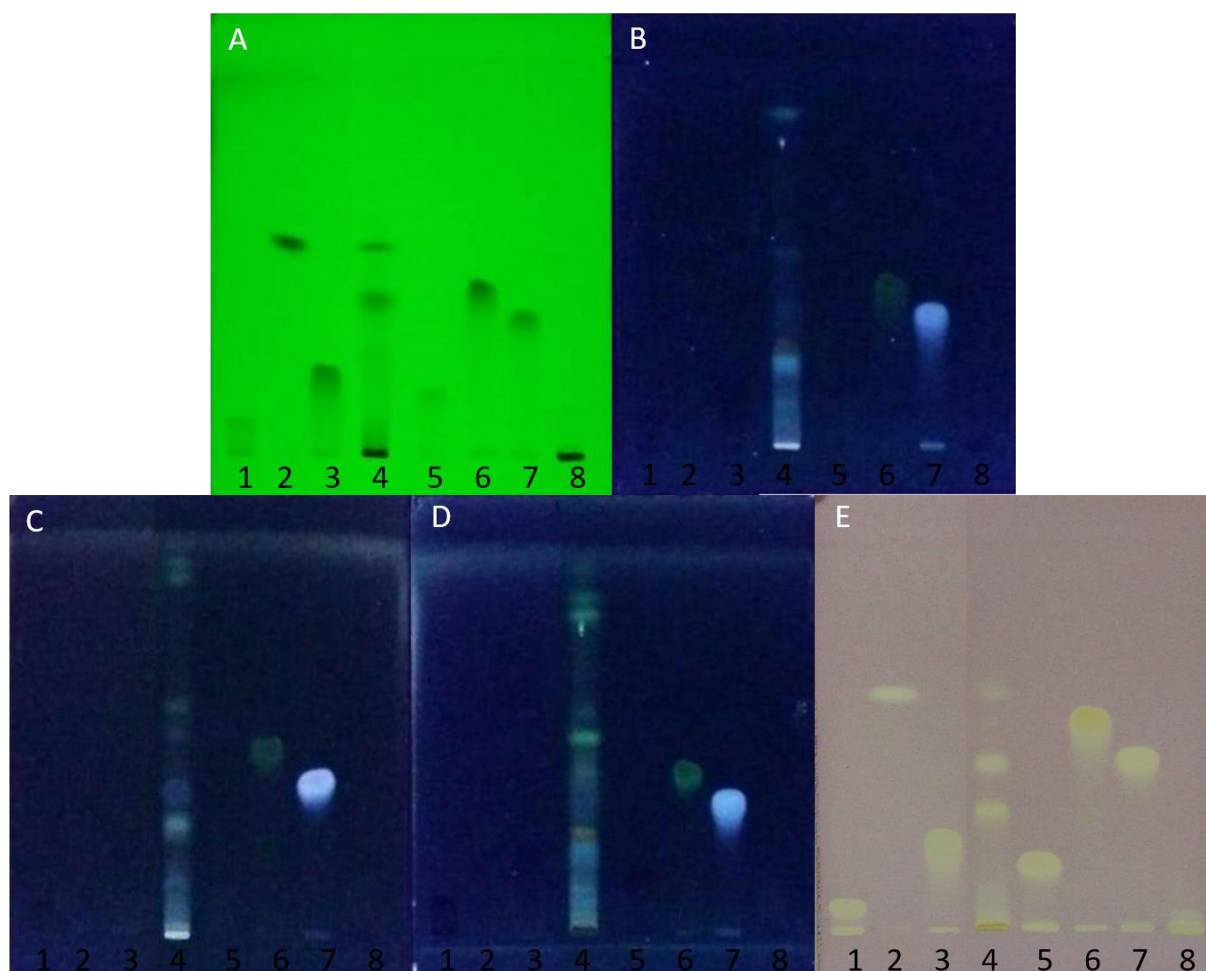
ภาพที่ 4.3 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร compound 2

ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูล  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT และ HMBC (400 และ 100 MHz, DMSO- $d_6$ ) ของสาร compound 2 ( $\delta$  in ppm, multiplicities,  $J$  in Hz)

| ตำแหน่ง | $\delta_H$         | $\delta_C$ | DEPT            | HMBC     |
|---------|--------------------|------------|-----------------|----------|
| 1       | 4.78 d (8.0)       | 103.1      | CH              | 2,3,5,1' |
| 2       | 2.92 td (8.0, 4.8) | 73.9       | CH              | 1,3,4    |
| 3       | 3.03 td (8.0, 4.4) | 77.3       | CH              | 1,5      |
| 4       | 3.05 td (8.0, 4.0) | 70.5       | CH              | 2,5,6    |
| 5       | 3.12 m             | 77.2       | CH              | 1,3,6    |
| 6       | 3.43 m             | 61.6       | CH <sub>2</sub> | 4,5      |
|         | 3.65 m             |            |                 |          |
| 1'      | 3.50 m             | 64.3       | CH <sub>2</sub> | 1, 2'    |
|         | 3.81 m             |            |                 |          |
| 2'      | 1.13 t (7.2)       | 15.6       | CH <sub>3</sub> | 1'       |
| 2-OH    | 4.98 d (4.8)       | -          | OH              | 1,2,3    |
| 3-OH    | 4.89 d (4.4)       | -          | OH              | 2,3,4    |
| 4-OH    | 4.93 d (4.0)       | -          | OH              | 3,4,5    |
| 6-OH    | 4.49 t (6.0)       | -          | OH              | 5,6      |

### การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี TLC และ HPLC

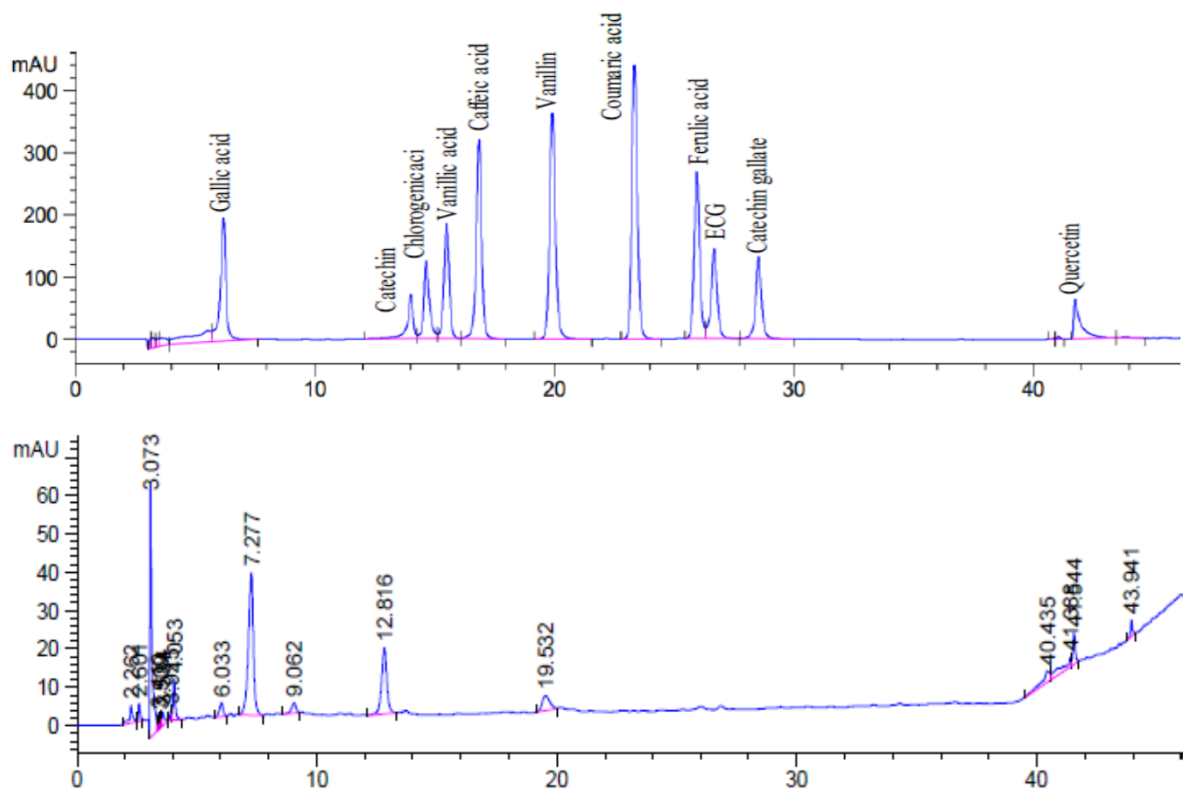
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีอย่างง่ายโดยใช้วิธี TLC พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการปรากฏของแถบสารมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด คือ Epigallocatechin, Vanillic acid, Gallic acid, Catechin, Quercetin, Caffeic acid และ Tannic acid พบว่า ไม่มีแถบใดในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดขล้าหมาที่ตรงกับแถบของสารมาตรฐาน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดนี้อาจไม่มีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบหรืออาจมีน้อยมากจนไม่สามารถเห็นได้จากการศึกษาครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตาม จากการสเปรย์ด้วย DPPH แสดงให้เห็นว่า สารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกันกับสารมาตรฐานและมีสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวอย่างน้อย 3 ชนิด (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 TLC fingerprint ของสารสกัดจากเห็ดขล้าหมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดย A คือ การส่องใต้ UV 254 nm, B คือ การส่องใต้ UV 366 nm, C คือ สเปรย์ด้วย Anisaldehyde-Sulfuric acid, D คือ การสเปรย์ด้วย 30% Sulfuric acid และ E คือ การสเปรย์ด้วย DPPH และเลน 1 คือ Epigallocatechin (EGC), เลน 2 คือ Vanillic acid, เลน 3 คือ Gallic acid, เลน 4 คือ สารสกัดเห็ดขล้าหมา, เลน 5 คือ Catechin, เลน 6 คือ Quercetin, เลน 7 คือ Caffeic acid และเลน 8 คือ Tannic acid

เช่นกันกับการศึกษาด้วยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานในระบบดังกล่าว พบว่า ไม่มี peak ใดในสารสกัดเห็ดขล้าหมาที่ตรงกับ peak ของสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ซึ่ง ได้แก่ gallic acid, catechin, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, vanillin, coumaric acid, ferulic acid, EGC, catechin gallate และ quercetin (ภาพที่ 4.5) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากเห็ด

ขล่ำหามาที่ทดสอบไม่มีสารที่เป็นองค์ประกอบดังกล่าว ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือสารออกฤทธิ์ในการทดสอบต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นสารประกอบชนิดอื่นๆ ที่ยังไม่สามารถระบุได้



ภาพที่ 4.5 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเห็ดขล่ำหามาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยวิธี HPLC โดยด้านบนคือโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน ด้านล่างคือโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเห็ดขล่ำหามา

#### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, total phenolic content และ total flavonoid

นำสารสกัดเห็ดขล่ำหามาวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay (DPPH assay) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) วิเคราะห์ total phenolic content ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method และวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoid ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method พบว่า สารสกัดเห็ดขล่ำหามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดย Ascorbic acid หรือวิตามินซี มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดเห็ดขล่ำหามาเพียง 14.5 เท่า ส่วน Tocopherol หรือวิตามินอี มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดเห็ดขล่ำหามาเพียง 7.2 เท่า และมีปริมาณสารกลุ่ม phenolic ค่อนข้างมาก คือ  $113.80 \pm 3.13$  mg TAE/g extract แต่มีสารกลุ่ม flavonoids ค่อนข้างน้อย คือ  $2.61 \pm 0.12$  mg QCE/g extract ดังตารางที่ 4.3

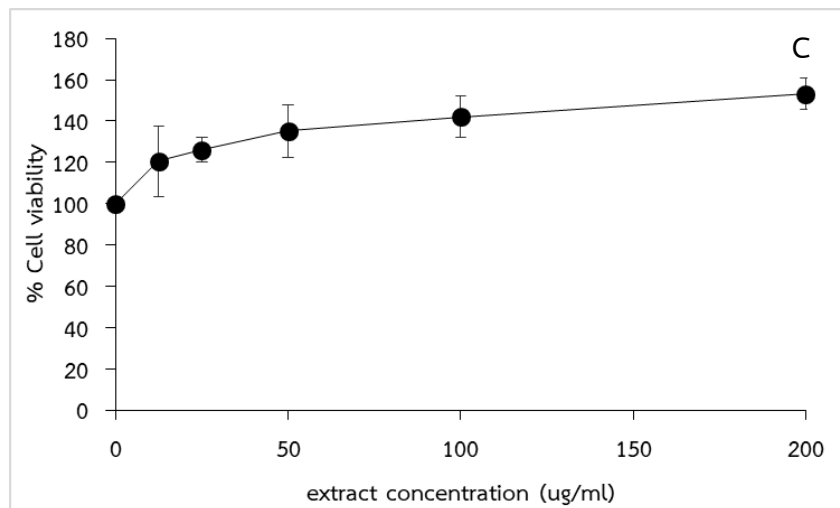
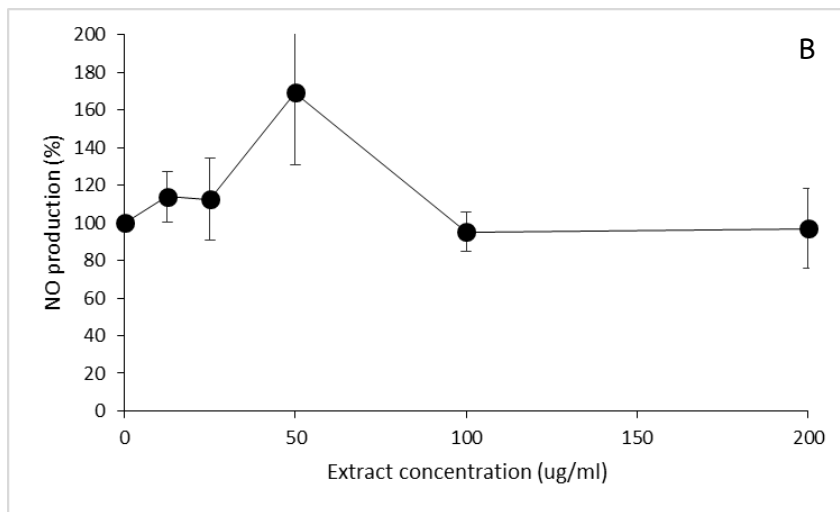
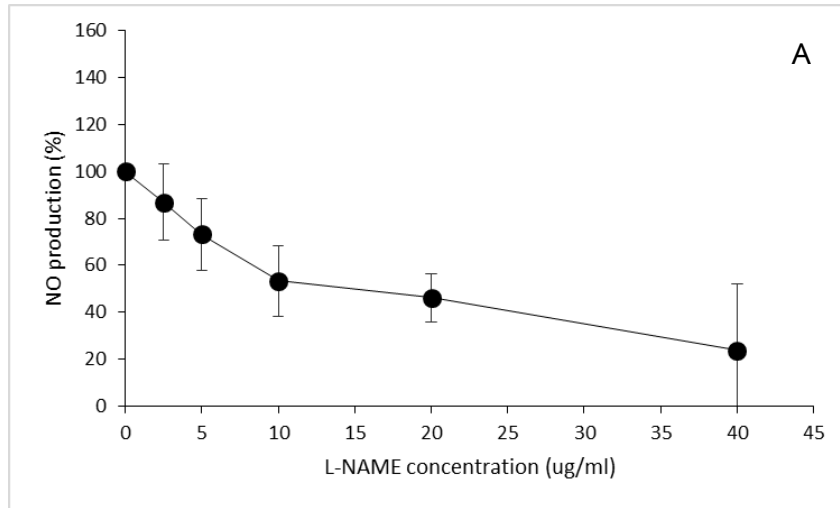
**ตารางที่ 4.3** แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, total phenolic content และ total flavonoid ของสารสกัดเห็ดขี้เหล็ก

| สารสกัด/<br>สารมาตรฐาน | Antioxidant activity               |                            | Total phenolic<br>content<br>(mg TAE/g<br>extract) | Total flavonoid<br>content<br>(mg QCE/g<br>extract) |
|------------------------|------------------------------------|----------------------------|--|---|
|                        | DPPH<br>(EC <sub>50</sub> , µg/ml) | FRAP<br>(µg/mg<br>extract) |  |   |
| สารสกัดเห็ดขี้เหล็ก    | 55.51 ± 3.62                       | 166.64 ± 11.43             | 113.80 ± 3.13                                      | 2.61 ± 0.12   |
| Ascorbic acid          | 3.84 ± 0.09                        | -                          | -  | -   |
| Tocopherol             | 7.75 ± 0.03                        | -                          | -  | -   |

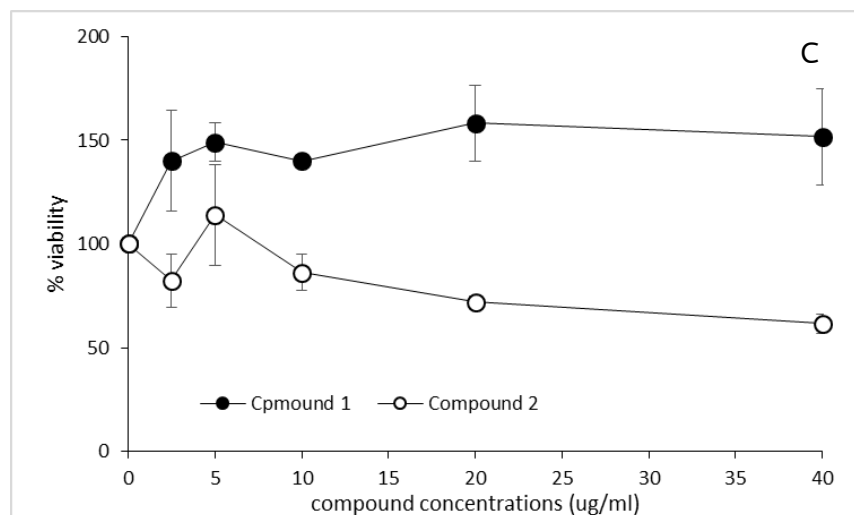
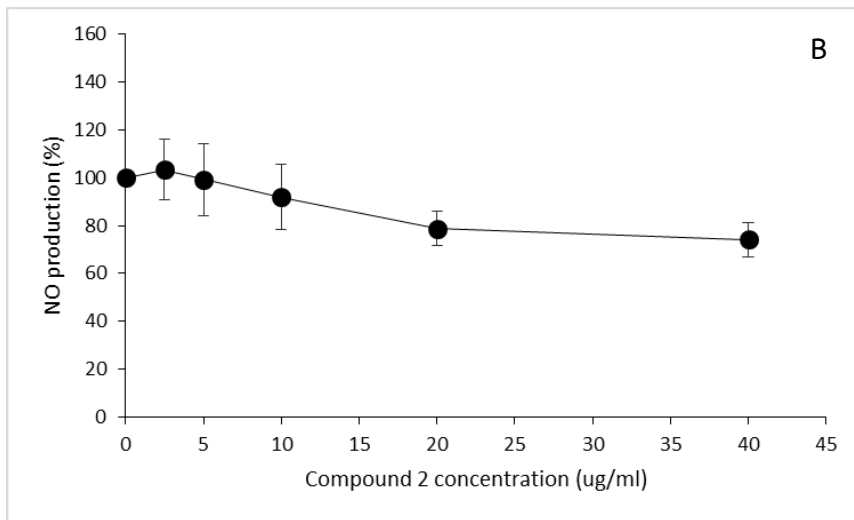
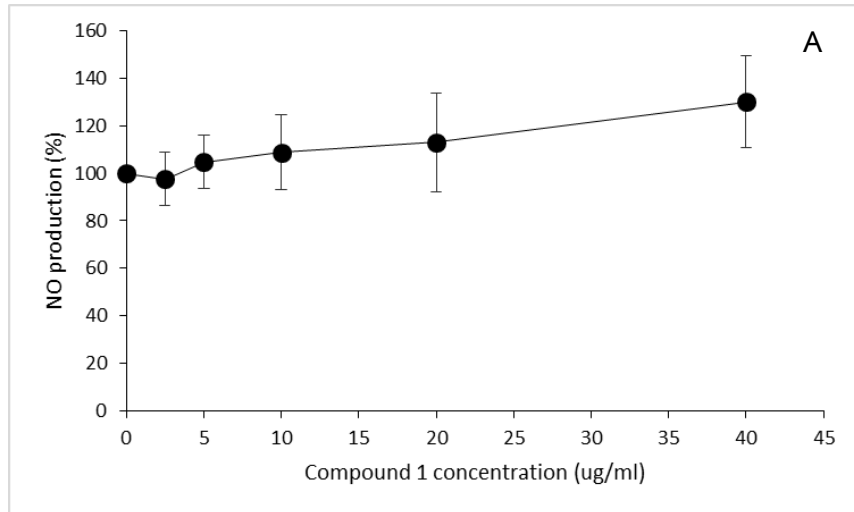
#### การทดสอบฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide

จากการศึกษาการสร้าง nitric oxide ของเซลล์ RAW264.7 macrophages ที่ถูกชักนำด้วย LPS พบว่า สารมาตรฐาน L-NAME สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ดี (ภาพที่ 4.6A) โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 23.83 ± 9.53 µg/ml ส่วนสารสกัดจากเห็ดขี้เหล็ก พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นไม่เกิน 200 µg/ml ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการสร้าง nitric oxide และพบว่าสารสกัดในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว สามารถชักนำให้เซลล์ RAW264.7 ที่ใช้ในการทดสอบมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้โดยมี cell viability เพิ่มขึ้นถึง 140 % (ภาพที่ 4.6B และ 4.6C)

จากการศึกษาในสารบริสุทธิ์ compound 1 และ 2 พบว่า compound 1 ในช่วงความเข้มข้นไม่เกิน 40 µg/ml มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดเพิ่มขึ้นของการสร้าง nitric oxide ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณา cell viability พบว่า compound 1 สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทดสอบได้ถึง 150 % ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว ดังนั้น เป็นไปได้ว่า ปริมาณการสร้าง nitric oxide ที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มากขึ้นจากการถูกชักนำโดย compound 1 (ภาพที่ 4.7A และ 4.7C) ส่วน compound 2 พบว่า สาร compound 2 สามารถลดการสร้าง nitric oxide ลงประมาณ 25 % แต่เมื่อพิจารณา cell viability พบว่า compound 2 ลด cell viability ลงประมาณ 25-30 % เช่นกัน ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการลดลงของการสร้าง nitric oxide นี้เป็นผลโดยตรงจากการลด cell viability ลง (ภาพที่ 4.7B และ 4.7C)



ภาพที่ 4.6 การสร้างไนตริกออกไซด์และ cell viability ของเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบด้วย L-NAME และ สารสกัดเห็ดหลินจือในสภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS โดย A คือ การสร้าง nitric oxide จากเซลล์ที่ถูกทรีท ด้วย L-NAME, B คือ การสร้าง nitric oxide จากเซลล์ที่ถูกทรีทด้วยสารสกัด และ C คือ cell viability ของ เซลล์ที่ทรีทด้วยสารสกัด

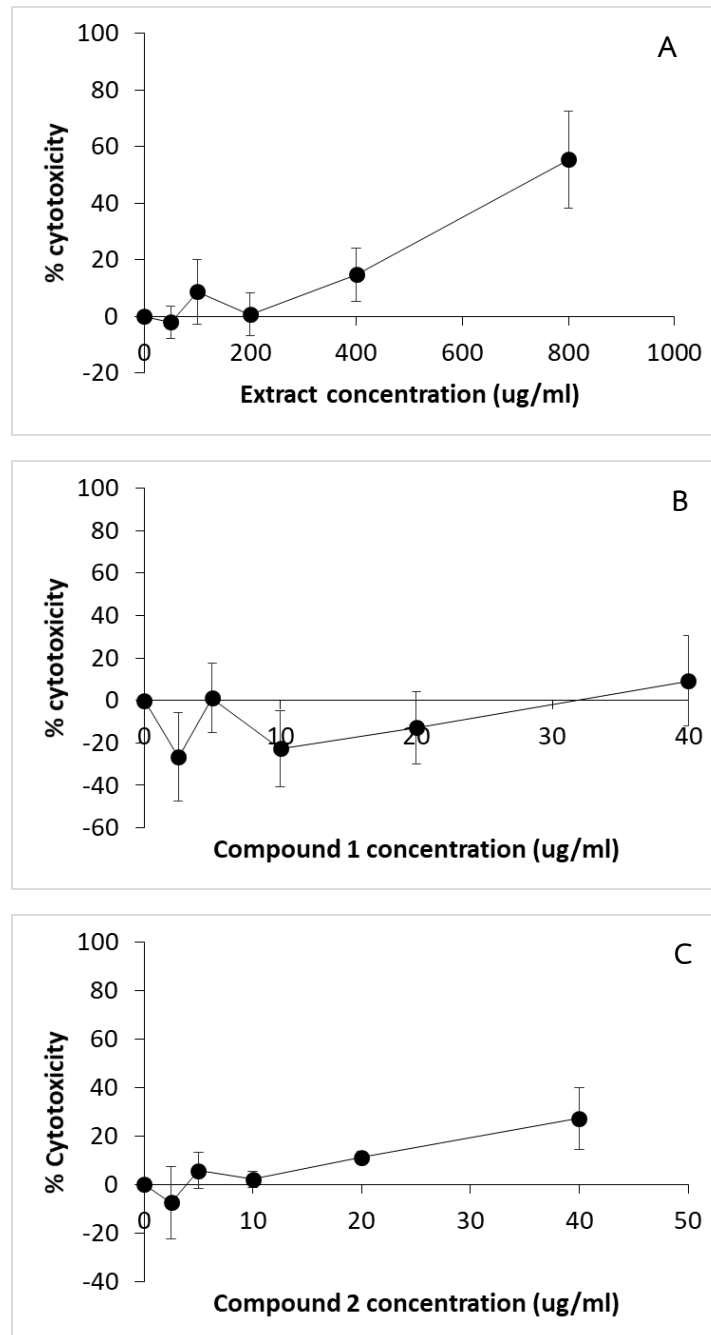


ภาพที่ 4.7 การสร้างไนตริกออกไซด์และ cell viability ของเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบด้วย compound 1 และ 2 ในสถานะที่มีการชักนำด้วย LPS โดย A คือ การสร้าง nitric oxide จากเซลล์ที่ถูกทรีทด้วย compound 1, B คือ การสร้าง nitric oxide จากเซลล์ที่ถูกทรีทด้วย compound 2 และ C คือ cell viability ของเซลล์ที่ทรีทด้วย compound 1 และ 2

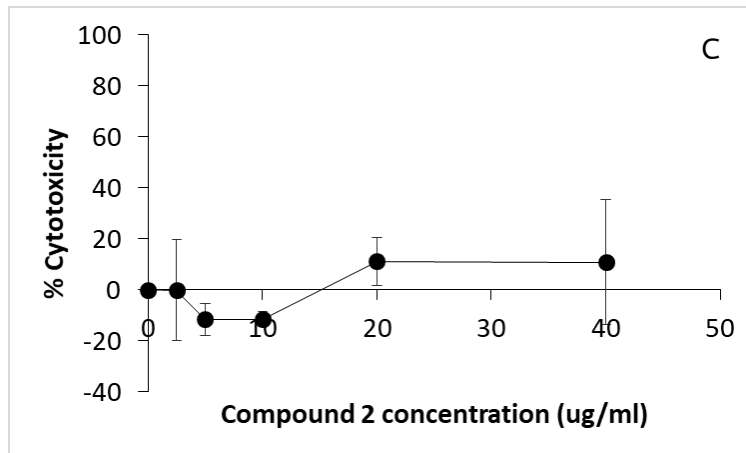
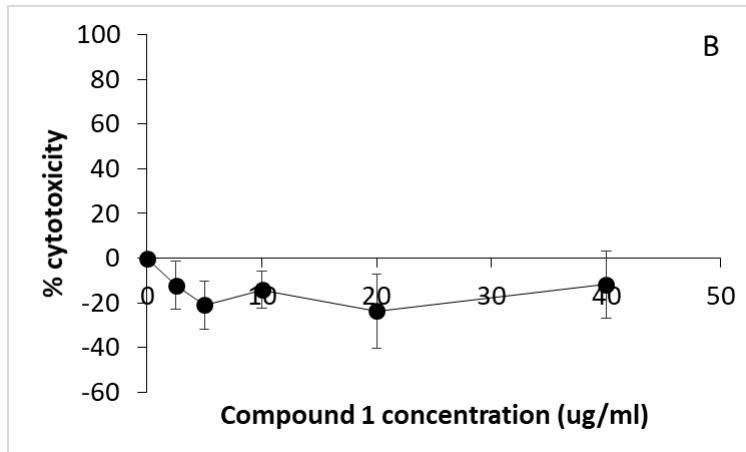
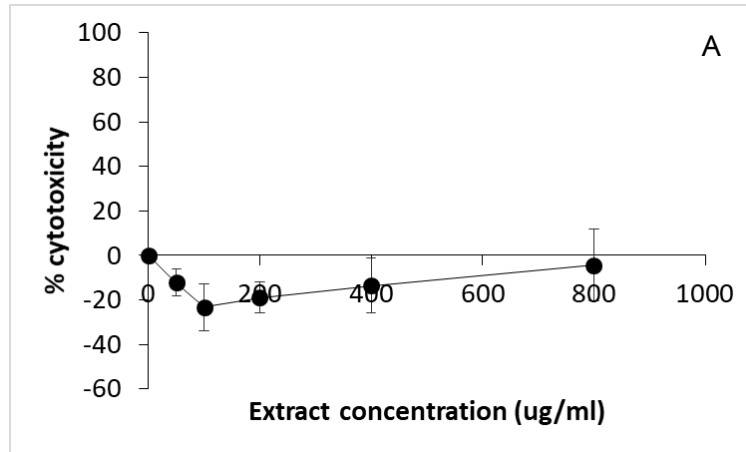


### การทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity

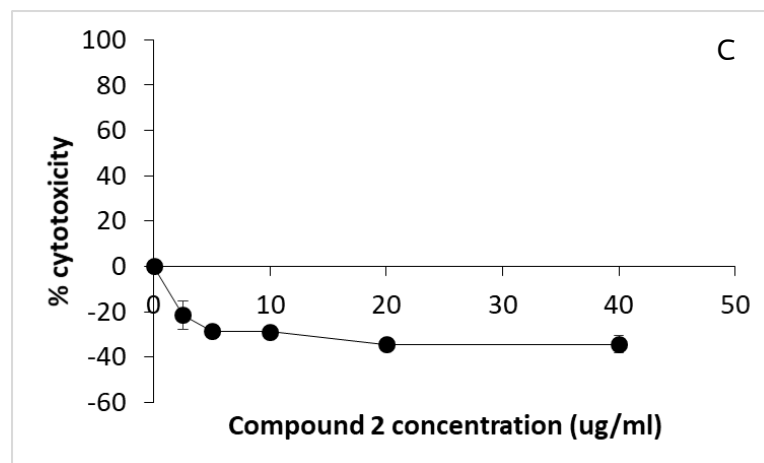
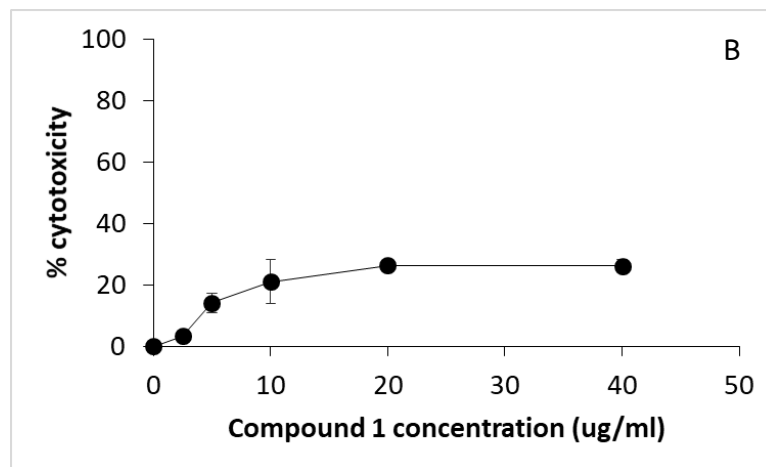
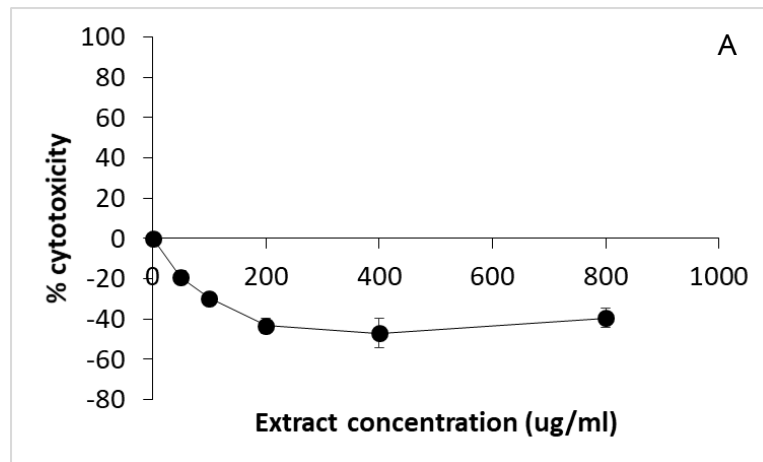
จากการศึกษาผลของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมาที่มีต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งพบว่า สารสำคัญทั้ง 2 ชนิดในช่วงความเข้มข้นน้อยกว่า 40  $\mu\text{g/ml}$  ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทุกชนิดที่ทดสอบ ส่วนสารสกัดจากเห็ด พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 อย่างอ่อนๆ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $888.78 \pm 252.06 \mu\text{g/ml}$  แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MDA-MB-231 และ Caco-2 ดังแสดงในภาพที่ 4.8, 4.9, 4.10 และตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Tamoxifen (ภาพที่ 4.11)



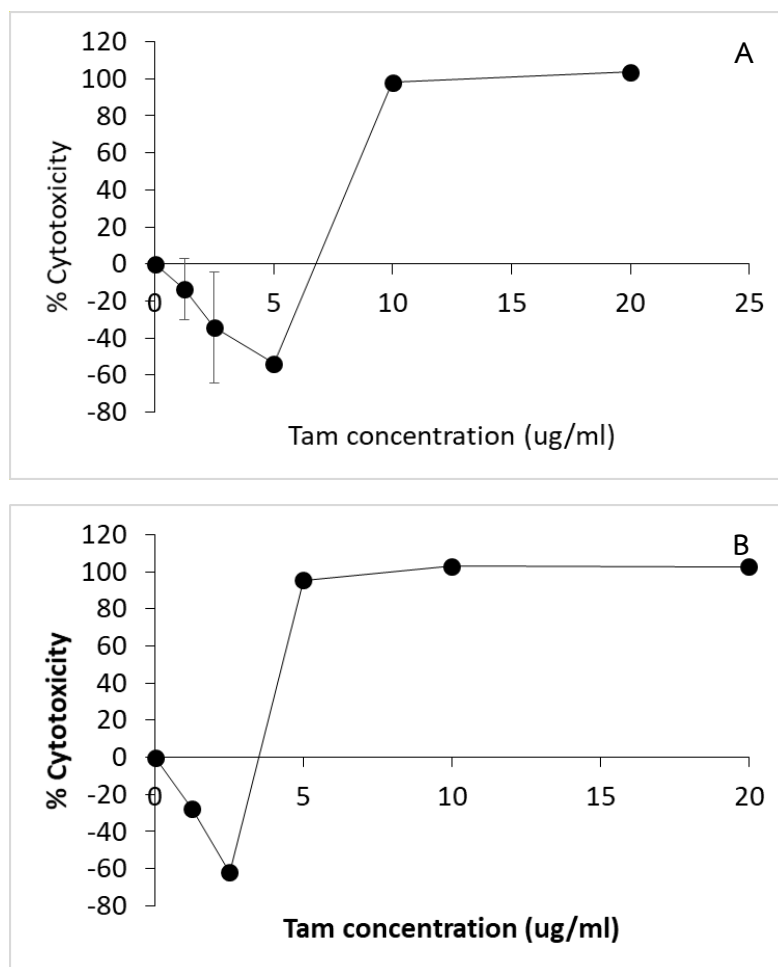
ภาพที่ 4.8 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7 โดย A คือ สารสกัด, B คือ compound 1 และ C คือ compound 2



ภาพที่ 4.9 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MDA-MB-231 โดย A คือ สารสกัด, B คือ compound 1 และ C คือ compound 2



ภาพที่ 4.10 ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ Caco-2 โดย A คือ สารสกัด, B คือ compound 1 และ C คือ compound 2



ภาพที่ 4.11 ผลของ Tamoxifen ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7 และ MDA-MB-231 โดย A คือ MCF-7 และ B คือ MDA-MB-231

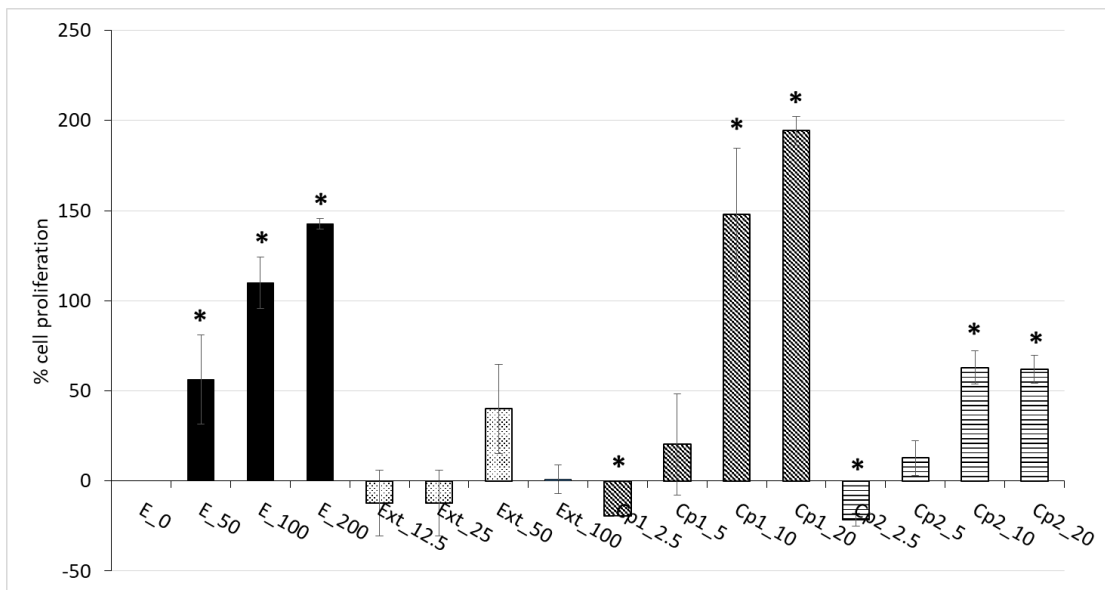
ตารางที่ 4.4 ผลความเป็นพิษของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 ที่มีต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ

| สารสกัด/สารบริสุทธิ์ | % cytotoxicity (IC <sub>50</sub> ; µg/ml) |            |        |
|----------------------|---|------------|--------|
|                      | MCF-7                                     | MDA-MB-231 | Caco-2 |
| สารสกัดเห็ดขล้าหมา   | 888.78 ± 252.06                           | >800       | >800   |
| Compound 1           | >40                                       | >40        | >40    |
| Compound 2           | >40                                       | >40        | >40    |
| Tamoxifen            | 4.18±0.14                                 | 8.42±0.05  | ND     |

ND คือ not determine

#### การศึกษาฤทธิ์ estrogenic activity

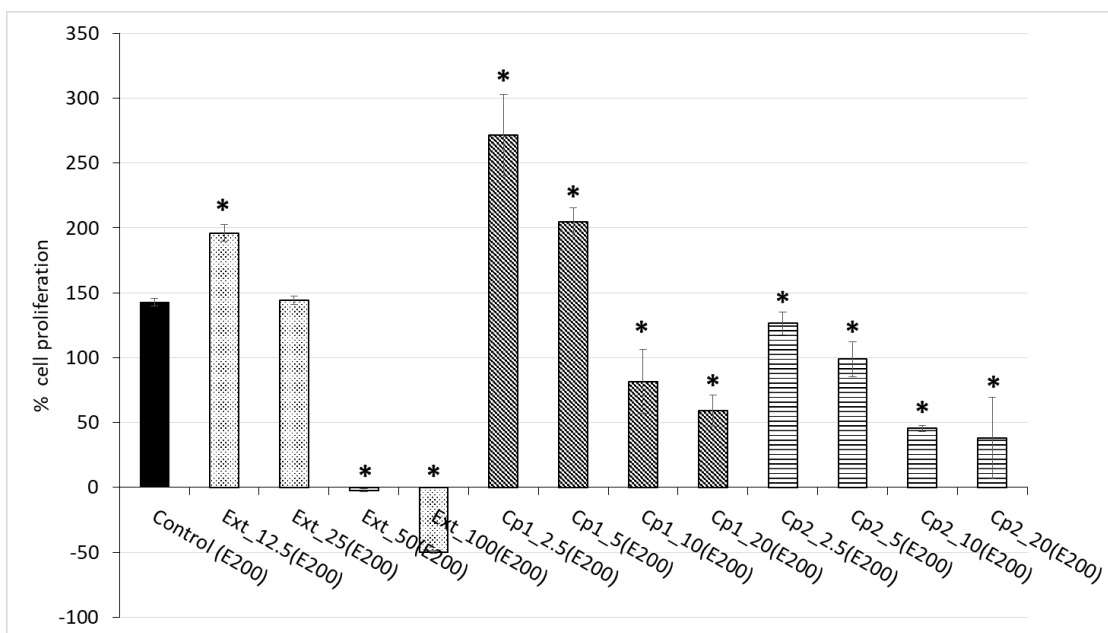
compound 1 และ 2 มีฤทธิ์เอสโตรเจน สามารถชักนำให้เซลล์ MCF-7 เพิ่มจำนวนขึ้นได้คล้ายกับการทำงานของเอสโตรเจน (50-200 pM) (ภาพที่ 4.12) โดยเฉพาะ compound 1 ที่สามารถชักนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้มากถึง 200 % ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ส่วนสารสกัดจากเห็ดสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 4.12 ผล estrogenic activity ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7 ( $p$ -value < 0.05)

#### การศึกษาฤทธิ์ anti-estrogenic activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอสโตรเจน พบว่า ทั้งสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่ำจะเสริมฤทธิ์ของเอสโตรเจน ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถลดฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะสารสกัดที่สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ให้ลงมาเท่ากับหรือน้อยกว่าสถานะที่ไม่มีเอสโตรเจนชักนำ แม้ว่าที่ความเข้มข้นต่ำทั้งสารสกัดและ compound 1 สามารถชักนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น เสริมฤทธิ์เอสโตรเจนได้ (ภาพที่ 4.13)

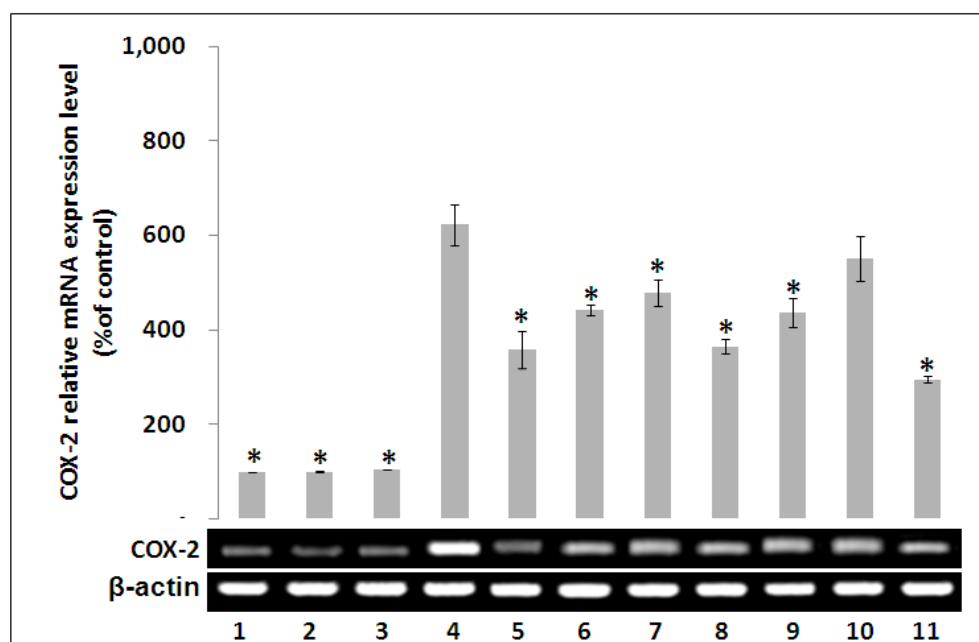


ภาพที่ 4.13 ผล anti-estrogenic activity ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ MCF-7 ( $p$ -value < 0.05)

## การศึกษาฤทธิ์ anti-inflammatory activity

### ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน COX-2

หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS พบว่า เซลล์นี้มีการแสดงออกของยีน COX-2 สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสารสกัดหยาบ (Crude) ที่ความเข้มข้น 50-200  $\mu\text{g/ml}$  และ compound 1 (Cpd 1) ความเข้มข้น 5-20  $\mu\text{g/ml}$  มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (dose dependent manner) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control (กระตุ้น RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS) โดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ของเห็ดขล้าหมา มีความสามารถในการยับยั้งยีน COX-2 ด้วยค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $223.09 \pm 8.85 \mu\text{g/ml}$  และ  $22.77 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14 และภาพที่ 4.19)

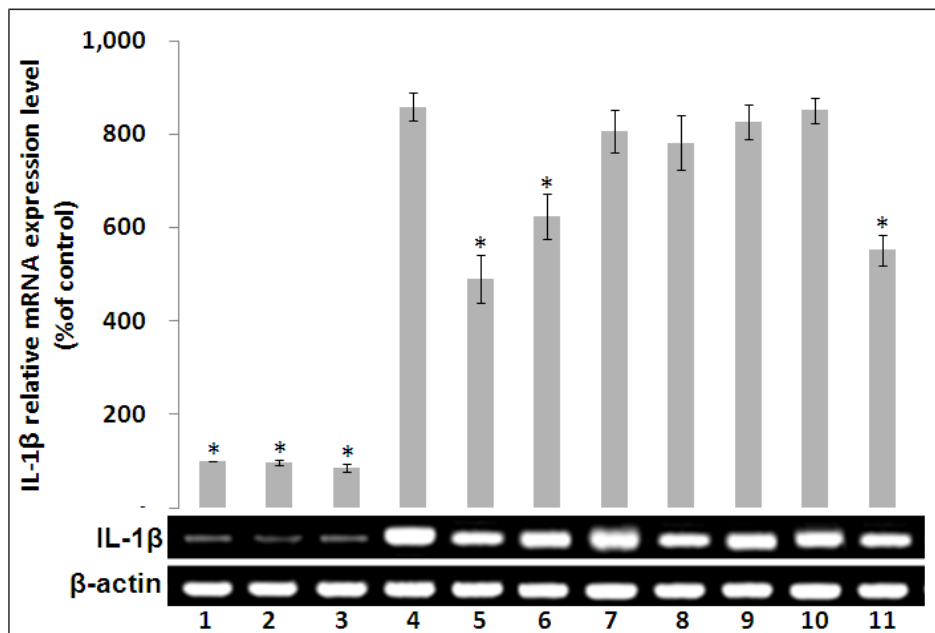


ภาพที่ 4.14 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ  $\beta$ -actin โดยเลน 1 = Unstimulated Cells, เลน 2 = Cells+crude (200  $\mu\text{g/ml}$ ), เลน 3 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ), เลน 4 = Cells+*E.coli* LPS, เลน 5 = Cells+crude (200  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 6 = Cells+crude (100  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 7 = Cells+crude (50  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 8 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 9 = Cells+Cpd 1 (10  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 10 = Cells+Cpd 1 (5  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS, เลน 11 = Cells+Indometacin (50  $\mu\text{g/ml}$ )+*E.coli* LPS และ \* แสดงแตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ *E.coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

### ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$

จากผลการทดลอง หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS พบว่าเซลล์นี้มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสารสกัดหยาบ (Crude) ของเห็ดขล้าหมาที่ความเข้มข้น 50-200  $\mu\text{g/ml}$  และ compound 1 (Cpd 1) ความเข้มข้น 5-20  $\mu\text{g/ml}$  มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (dose dependent manner) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control (กระตุ้น RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS) สาร

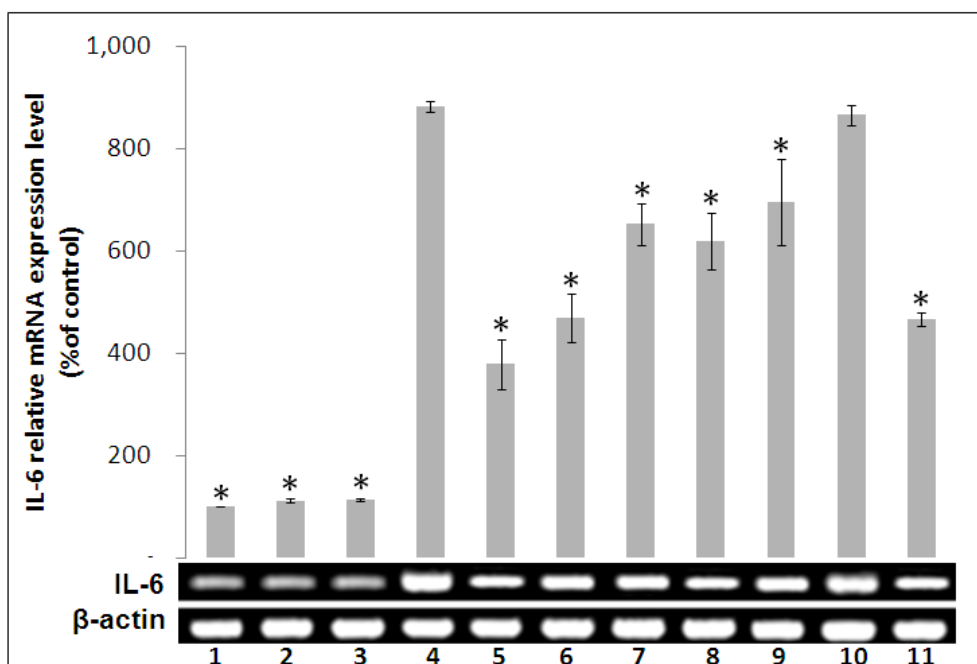
สกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ของเห็ดขล้าหมาสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 224.97 $\pm$ 21.43  $\mu$ g/ml และ >20  $\mu$ g/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดหยาบยังมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ได้ใกล้เคียงกับยามาตรฐาน Indometacin อีกด้วย (ภาพที่ 4.15 และภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.15 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ  $\beta$ -actin โดยเลน 1 = Unstimulated Cells, เลน 2 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml), เลน 3 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml), เลน 4 = Cells+E.coli LPS, เลน 5 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 6 = Cells+crude (100  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 7 = Cells+crude (50  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 8 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 9 = Cells+Cpd 1 (10  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 10 = Cells+Cpd 1 (5  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS, เลน 11 = Cells+Indometacin (50  $\mu$ g/ml)+E.coli LPS และ \* แสดงแตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ E.coli LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

#### ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน IL-6

หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วย E.coli LPS พบว่า เซลล์นี้มีการแสดงออกของยีน IL-6 สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสารสกัดหยาบ (Crude) ของเห็ดขล้าหมาที่ความเข้มข้น 50-200  $\mu$ g/ml และ compound 1 (Cpd 1) ความเข้มข้น 5-20  $\mu$ g/ml มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (dose dependent manner) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control (กระตุ้น RAW 264.7 ด้วย E.coli LPS) โดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ของเห็ดขล้าหมา สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 152.61 $\pm$ 22.03  $\mu$ g/ml และ 33.21 $\pm$ 4.85  $\mu$ g/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดหยาบยังมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ใกล้เคียงกับยามาตรฐาน Indometacin อีกด้วย (ภาพที่ 4.16 และภาพที่ 4.19)

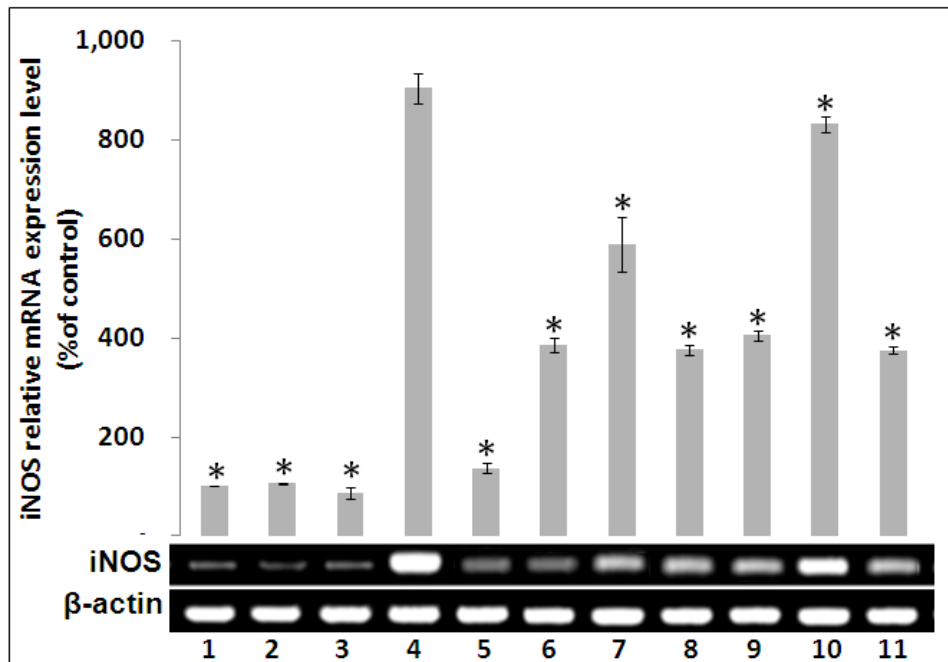


ภาพที่ 4.16 ปริมาณการแสดงออกของยีน IL-6 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ  $\beta$ -actin โดยเลน 1 = Unstimulated Cells, เลน 2 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml), เลน 3 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml), เลน 4 = Cells+*E.coli* LPS, เลน 5 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 6 = Cells+crude (100  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 7 = Cells+crude (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 8 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 9 = Cells+Cpd 1 (10  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 10 = Cells+Cpd 1 (5  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 11 = Cells+Indometacin (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS และ \* แสดงแตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ *E.coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน iNOS

หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS พบว่าเซลล์นี้มีการแสดงออกของยีน iNOS สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสารสกัดหยาบ (Crude) ของเห็ดขล้าหมาที่ความเข้มข้น 50-200  $\mu$ g/ml และ compound 1 (Cpd 1) ความเข้มข้น 5-20  $\mu$ g/ml มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (dose dependent manner) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control (กระตุ้น RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS) โดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ของเห็ดขล้าหมา สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $101.72 \pm 7.76$   $\mu$ g/ml และ  $14.95 \pm 0.61$   $\mu$ g/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดหยาบยังมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Aminoguanidine อีกด้วย (ภาพที่ 4.17 และภาพที่ 4.19)

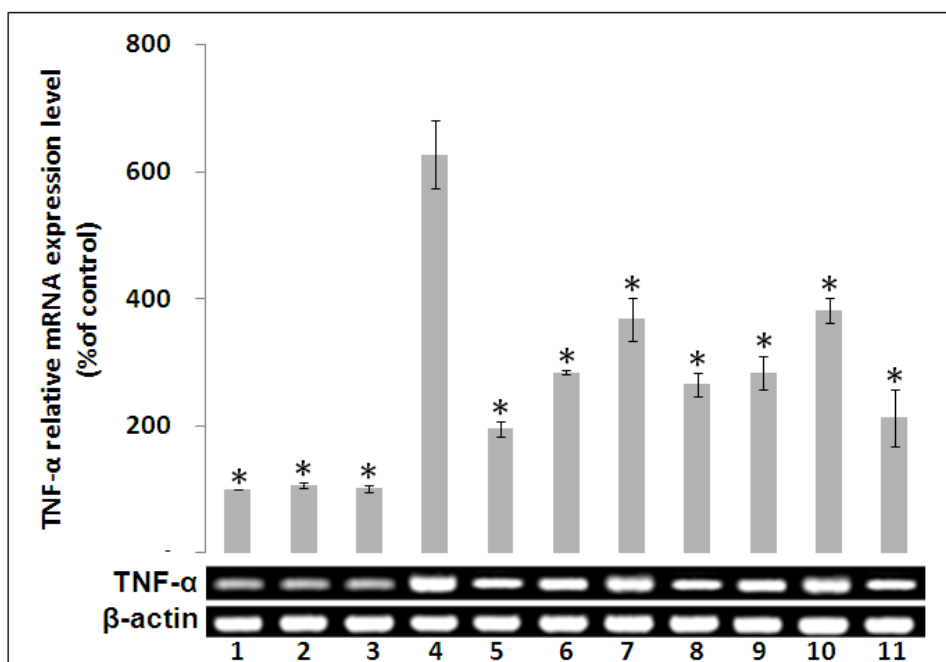




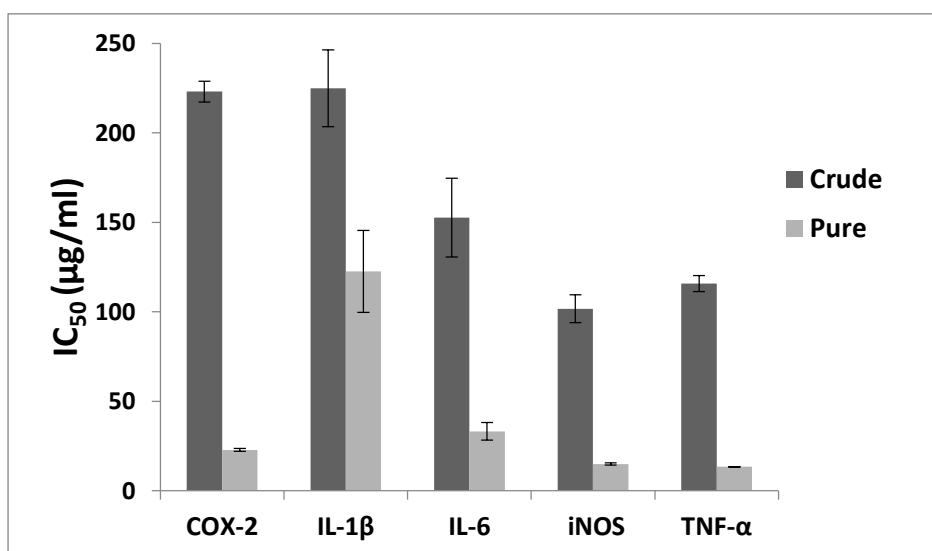
ภาพที่ 4.17 ปริมาณการแสดงออกของยีน iNOS โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ  $\beta$ -actin โดยเลน 1 = Unstimulated Cells, เลน 2 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml), เลน 3 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml), เลน 4 = Cells+*E.coli* LPS, เลน 5 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 6 = Cells+crude (100  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 7 = Cells+crude (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 8 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 9 = Cells+Cpd 1 (10  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 10 = Cells+Cpd 1 (5  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 11 = Cells+ Aminoguanidine (50  $\mu$ g/ml) (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS และ \* แสดงแตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ *E.coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$

หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS พบว่าเซลล์นี้มีการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  สูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และสารสกัดหยาบ (Crude) ของเห็ดขล้าหมาที่ความเข้มข้น 50-200  $\mu$ g/ml และ compound 1 (Cpd 1) ความเข้มข้น 5-20  $\mu$ g/ml มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (dose dependent manner) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control (กระตุ้น RAW 264.7 ด้วย *E.coli* LPS) โดยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ของเห็ดขล้าหมา สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $115.74 \pm 4.48$   $\mu$ g/ml และ  $13.38 \pm 0.12$   $\mu$ g/ml ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดหยาบยังมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Indometacin อีกด้วย (ภาพที่ 4.18 และภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.18 ปริมาณการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ  $\beta$ -actin โดยเลน 1 = Unstimulated Cells, เลน 2 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml), เลน 3 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml), เลน 4 = Cells+*E.coli* LPS, เลน 5 = Cells+crude (200  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 6 = Cells+crude (100  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 7 = Cells+crude (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 8 = Cells+Cpd 1 (20  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 9 = Cells+Cpd 1 (10  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 10 = Cells+Cpd 1 (5  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS, เลน 11 = Cells+Indometacin (50  $\mu$ g/ml)+*E.coli* LPS และ \* แสดงแตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ *E.coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 4.19ฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบ (Crude) และ compound 1 (Pure) ของเห็ดขล้าหมา

## บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

เห็ดเป็นแหล่งสารอาหารและยาตามธรรมชาติ มีสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์มากมายที่ถูกค้นพบในเห็ด เช่น polysaccharides, phenolics, polyphenolics, flavonoids, terpenoids, ergosterols, peptides เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ถูกรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น anti-tumor, anti-inflammation, anti-virus และ immunomodulation (Wasser, 2002; Elsayed et al., 2014) เห็ดเป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เช่น เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ซึ่งเป็นเห็ดที่เป็นยาที่รู้จักกันดีและมีการนำมาใช้ในการรักษาอย่างยาวนาน โดยเห็ดหลินจือมีสารสำคัญหลายชนิด แต่สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่สำคัญ ได้แก่ ganoderic acid (Akihisa et al., 2007) เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) มีสาร fucomannogalactan (Carbonero et al., 2008) เห็ด *Inonotus obliquus* มีสาร ergosterol (Ma et al., 2013) และเห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis*) มีสาร cordymin (Qian et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยก D-mannitol ได้จากเห็ดชนิดนี้เป็นครั้งแรก ซึ่งเคยมีการรายงานการพบ D-mannitol ได้จากเห็ดหลายชนิด เช่น *L. edodes* (Tan and Moore, 1994), *Agaricus bisporus* (Hammond and Nichols, 1976; Tan and Moore, 1994), *Clitocybe nebularis* (Kim et al., 2008), *Pleurotus cornucopiae* (Hagiwara et al., 2005) และ *Agaricus silvaticus* (Munkhgerel et al., 2011) เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดเห็ดขล้าหามาามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงแต่ไม่พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีตรงกับสารมาตรฐานซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่เป็นสารหลัก (major compound) ได้ 2 ชนิด คือ D-mannitol และ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ซึ่งในส่วนของ D-mannitol เป็นสารที่สามารถพบได้ในพืชชั้นสูงกว่า 100 สปีชีส์และยังพบในสาหร่าย เห็ดราและไลเคน (Lewis and Smith, 1967) โดย D-mannitol มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกและจากความแห้งแล้ง โดย mannitol ทำหน้าที่เป็น reactive oxygen species quencher ซึ่งมีความจำเพาะต่อ hydroxyl radicals (Patel and Williamson, 2016) นอกจากนี้ D-mannitol มีความสำคัญต่อระบบ NADPH regeneration system ในเห็ด และสารนี้พบได้ในระยะที่เป็นเส้นใยเห็ด (mycelium stage) ในความเข้มข้นต่ำแล้วจะเพิ่มมากขึ้นมากในระยะที่เป็น sporophores ในช่วงของการสร้างสปอร์ (sporulation) (Hammond and Nichols, 1976) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะของดอกเห็ดขล้าหมาแล้ว เนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดจะพัฒนาไปเป็นสปอร์ทั้งหมดและเมื่อสปอร์แก่เต็มที่ดอกเห็ดจะแตกออก ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าในเนื้อเยื่อของเห็ดที่นำมาใช้ในการศึกษาจึงมี D-mannitol ในปริมาณมาก นอกจากนี้ในการสังเคราะห์ D-mannitol เกิดจากการ catalyze ของ D-mannitol dehydrogenase โดยใช้ fructose และมี NADPH เป็น cofactor ในกระบวนการ metabolism ดังกล่าว (Edmundowicz and Wriston, 1963) การสังเคราะห์นี้จะสัมพันธ์กับการเริ่มต้นและการพัฒนาการของดอกเห็ด (fruiting bodies) (Hammond, 1981) ดังนั้น D-mannitol จึงมีความสำคัญในการพัฒนาการของดอกเห็ดนั่นเอง ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเกิดจากการมีสาร D-mannitol เป็น major compound จึงทำให้ไม่พบการตรงกันกับสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สิ่งที่น่าสนใจคือ D-mannitol เป็นที่รู้จักกันอีกชื่อหนึ่งคือ cordycepic acid (Sprecher and Sprinson, 1963) ซึ่งเป็นสารที่พบในเห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis*) (Liu et al., 2015; Xuanwei Zhou et al. 2009) ที่สำคัญสารหนึ่งในเห็ดถั่งเช่า โดยเป็น active medicinal component หลักของเห็ดชนิดนี้ เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการช่วยลดการเกิด liver fibrosis โดยลดการอักเสบและลด TGF $\beta$ 1-induced fibrogenic response (Guo and Friedman, 2007;

Ouyang et al., 2013) ยิ่งไปกว่านี้ cordycepic acid ใน *C. sinensis* ยังมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ เพิ่ม plasma osmotic pressure และต้านอนุมูลอิสระ (Nomani et al., 2014; Sahmeddini et al., 2014) แต่ในส่วนของฤทธิ์ของเห็ดถั่งเช่าซึ่งมี D-mannitol ซึ่งเดิมเชื่อว่าเป็นสาร cordycepic acid เป็นส่วนหนึ่งของสารสำคัญมีมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ปกป้องตับ ไต หัวใจและอวัยวะอื่นๆ ด้านการอักเสบและฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง (Xuanwei Zhou et al. 2009) นอกจากนี้ เห็ดถั่งเช่ายังมีฤทธิ์กระตุ้นกำหนด (Devkota, 2006) ได้อีกด้วย

สารสกัด สาร D-mannitol และสาร ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside จากเห็ดขล้าหมา ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ในทางตรงกันข้าม ทั้งสารสกัดและ D-mannitol สามารถชักนำให้เซลล์ macrophages ที่ทดสอบมีการเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของเซลล์นี้อาจมีผลให้การวิเคราะห์ปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์นั้นออกมาไม่ชัดเจน โดยพบว่า สารสกัดและสารสำคัญไม่สามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นมาได้ แต่เมื่อพิจารณาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์แล้ว อาจเป็นไปได้ว่าสารที่ทดสอบสามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ได้แต่จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมาทำให้ดูเหมือนไม่มีผลในการลดการสร้างไนตริกออกไซด์ เนื่องจาก D-mannitol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีจึงเป็นไปได้มากที่สารนี้จะมีผลให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ลดลงได้ด้วย นอกจากนี้ จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในเซลล์ที่ทดสอบชนิดเดียวกัน พบว่า ทั้งสารสกัดและ D-mannitol สามารถยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory mediator gene expression ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง COX-2, iNOS และ TNF- $\alpha$  ได้ ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของเห็ดขล้าหมา โดยดูระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้แก่ COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS และ TNF- $\alpha$  ด้วยวิธี Semi-quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction ในเซลล์ macrophages พบว่า สารสกัดยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้เป็นอย่างดี โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS และ TNF- $\alpha$  เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก (Cells+*E.coli* LPS) แล้วทำให้ค่าการแสดงออกของยีนลดลงครึ่งหนึ่ง (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 223.09 $\pm$ 8.85, 224.97 $\pm$ 21.43, 152.61 $\pm$ 22.03, 101.72 $\pm$ 7.76 และ 115.74 $\pm$ 4.48  $\mu$ g/ml ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ TNF- $\alpha$  ได้ดีกว่ายีนอื่นๆ สำหรับค่าความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS และ TNF- $\alpha$  ของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเห็ดขล้าหมา (mannitol) มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 22.77 $\pm$ 0.79, 122.55 $\pm$ 22.89, 33.21 $\pm$ 4.85, 14.95 $\pm$ 0.61 และ 13.38 $\pm$ 0.12  $\mu$ g/ml ตามลำดับ โดยพบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากเห็ดขล้าหมาสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ TNF- $\alpha$  ได้ดีกว่ายีนอื่นๆ คล้ายคลึงกับสารสกัดเห็ดขล้าหมา ในการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกชักนำด้วย LPS จะเป็นผลจากการแสดงออกของยีน iNOS และในการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโมเลกุลนี้ต้องมีการปรับปริมาณของสารพันธุกรรมให้มีความเข้มข้นเท่ากันก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออก ดังนั้น การเพิ่มจำนวนของเซลล์จึงไม่มีผลกระทบเหมือนกับการวัดปริมาณการหลั่งไนตริกออกไซด์ออกมาในเซลล์ด้วยวิธีการ Griess reaction ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดและสารสำคัญสามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ผ่านการลดการสังเคราะห์ iNOS mRNA ได้

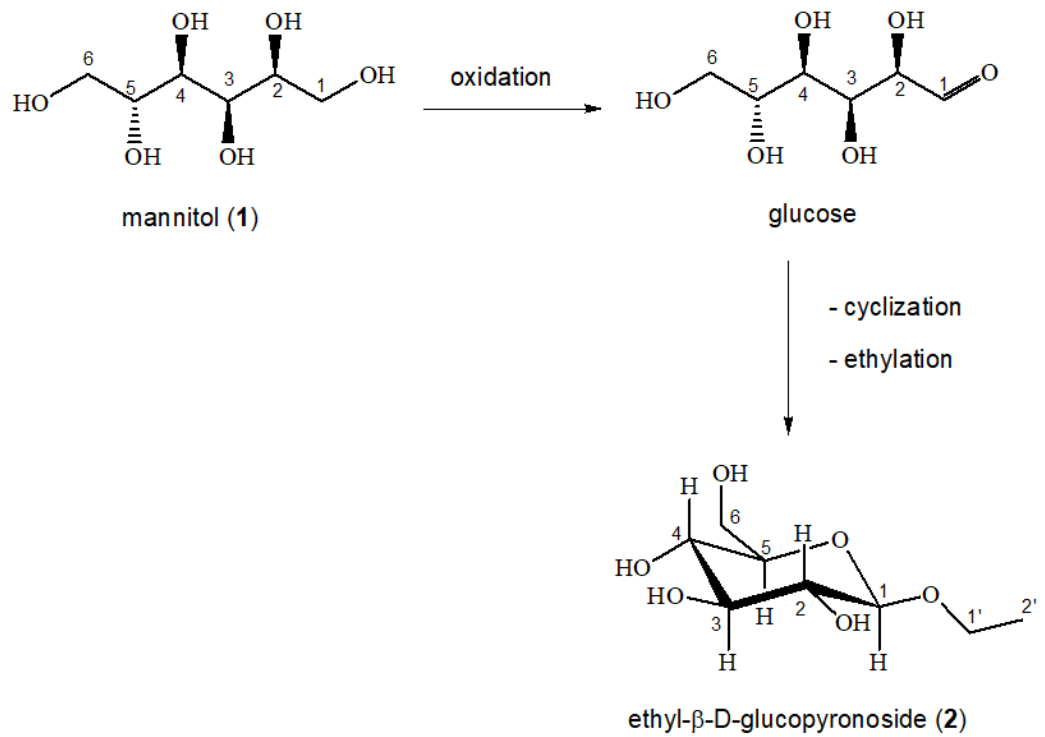
ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดเห็ดขล้าหมานี้อาจมาจากสาร D-mannitol (หรือ cordycepic acid) ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีการศึกษาในเห็ดถั่งเช่าที่มีสาร D-mannitol พบว่า สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่ามีฤทธิ์ในการลดการอักเสบได้ดี (Park et al., 2015; Jo et al., 2010; Yoon et al., 2015) นอกจากนี้ มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า D-mannitol สามารถลด inflammatory edema ของอุ้งเท้าหนูแรทได้และยังลดการ

อักเสบในหนูที่เป็น adjuvant-induced arthritis (Lewis et al., 2008; Cavone et al., 2012) อีกด้วย ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า D-mannitol อาจจะเป็นหนึ่งในสารสำคัญที่มีในเห็ดขล้าหมานี้

ในส่วนของฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัดและสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ ในทางตรงกันข้าม พบการเจริญเพิ่มมากขึ้นของเซลล์ที่ทดสอบได้ ซึ่งอาจจะ เป็นผลในการชักนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้เองของสารที่ทดสอบเช่นกันกับผลในการชักนำให้เซลล์ macrophages เพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาฤทธิ์เอสโตรเจน พบว่า สารสกัดเห็ดขล้าหมานี้มีฤทธิ์ในการ ชักนำให้เซลล์ MCF7 ที่ทดสอบเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่สารสำคัญทั้ง 2 ชนิด สามารถชักนำให้เซลล์ เพิ่มจำนวนขึ้นได้มาก โดยเฉพาะสาร D-mannitol (ความเข้มข้น 10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) ที่สามารถชักนำให้เซลล์เพิ่ม จำนวนขึ้นได้ดีกว่าการชักนำด้วย estradiol (50-200 pM) แสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด อาจมีฤทธิ์ เอสโตรเจนที่สามารถชักนำให้เซลล์ที่ทดสอบ คือ MCF7 ซึ่งมี estrogen receptor (ER) positive ทั้ง ER- $\alpha$  และ ER- $\beta$  (Al-Badar et al., 2011) เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในสถานะที่เซลล์ไม่มีเอสโตรเจน เมื่อ ได้รับสารสกัดซึ่งอาจมีสารบางชนิดที่มีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถจับกับ ER- $\alpha$  binding site ได้ ทำให้เกิด กระบวนการกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ส่วนโครงสร้างของ D-mannitol อาจจะสามารถเข้าไปจับกับ receptor นี้ได้ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ขึ้น แต่เมื่ออยู่ในสถานะที่มีเอสโตรเจนร่วมด้วยกลับ พบว่า การทรีทด้วยสารสกัดและ D-mannitol ที่ความเข้มข้นต่ำจะเสริมฤทธิ์เอสโตรเจนได้ซึ่งอาจเกิดจากการ แย่งกันจับกับ ER- $\alpha$  แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น สารที่ทดสอบซึ่งมีปริมาณมากอาจไปจับกับ ER- $\beta$  ทำให้เกิดการ ยับยั้งการเจริญของเซลล์ลงได้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรต้องมีการพิสูจน์ด้วยวิธีการอื่นๆ เพื่อที่จะยืนยันว่าสารสกัด และ D-mannitol นั้นจับกับ ER หรือไม่และ ER ชนิดใดต่อไป จากการศึกษาสาร 6-methylheptane- 1,2,3,4,5-pentaol ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous*) ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย D-mannitol พบว่า สารดังกล่าวไม่มีฤทธิ์เอสโตรเจนต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด T47D แต่ในสถานะที่มีเอสโตร เจนร่วมด้วยกลับพบว่า สารดังกล่าวสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ถูกชักนำให้เพิ่มจำนวนลงได้แม้ใช้ใน ปริมาณที่น้อยมาก แต่เมื่อทำการศึกษถึงกลไกในการจับกับ ER พบว่า สารดังกล่าวไม่สามารถจับกับทั้ง ER- $\alpha$  และ ER- $\beta$  ได้ ซึ่งอาจกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยกลไกอื่นหรือเป็นการกระตุ้นแบบไม่อาศัย ER (Fangkrathok et al., 2013)

สำหรับ compound 2 จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบสารชนิดนี้ ในเห็ดหรือเชื้อรา จึงเป็นไปได้ว่า สารชนิดนี้อาจเกิดเองตามธรรมชาติหรืออาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยา ระหว่าง D-mannitol กับเอทานอลซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐาน กระบวนการสร้างสาร ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ดังนี้

การเกิดสาร compound 2 หรือ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) น่าจะเกิดมาจาก compound 1 หรือmannitol โดยในขั้นตอนแรก mannitol น่าจะเกิดปฏิกิริยา oxidation ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 เกิดเป็น น้ำตาล glucose จากนั้นเกิดการปิดวง (cyclization) ตามด้วยปฏิกิริยาการแทนที่ไฮโดรเจนด้วยหมู่เอทิล (ethylation) ที่คาร์บอนตำแหน่ง anomeric เกิดเป็น ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside สาร compound 2 ดังภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 แสดงการทำนายการเกิดสาร compound 2 หรือ ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) จาก compound 1 หรือ mannitol

จากปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นทำให้สาร compound 2 มีฤทธิ์ในการทดสอบต่างๆ คล้ายกับ D-mannitol แต่บางการศึกษาสาร ethyl- $\beta$ -D-glucopyranoside มีฤทธิ์ที่น้อยกว่า D-mannitol

## บทที่ 6

### สรุปและเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดและสารสำคัญของเห็ดขล้าหมาตลอดจนศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับสรรพคุณที่มีการอ้างถึงในการนำเห็ดขล้าหมามาใช้ในการบรรเทาหรือรักษาอาการต่างๆ ตามภูมิปัญญาของหมอพื้นบ้านทั้งช่วยบำรุงร่างกาย บำรุงมดและเต้านมให้กระชับ อีกทั้งยังช่วยทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบลงได้ นอกจากนี้ ในตำรายาเขมรโบราณยังมีการใช้เห็ดขล้าหมาในการถอนคุณไสยได้ จากผลการศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากเห็ดขล้าหมามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากและมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ D-mannitol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทั้งสารสกัดและสารสำคัญมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดี ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบและการถอนคุณไสยซึ่งอาจจะมีการอักเสบเกี่ยวข้องด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสารสกัดและสารสำคัญไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบทั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ ในการศึกษาฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจน พบว่า สารสกัดและสารสำคัญมีฤทธิ์ estrogenic-like effect โดยสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 ได้เหมือนฤทธิ์ของเอสโตรเจน ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับสรรพคุณในการบำรุงมดลูกและเต้านมที่หย่อนยานให้กระชับได้ ส่วนฤทธิ์ในการต้านเอสโตรเจน พบว่า สารสกัดและสารสำคัญเมื่อทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งดังกล่าวพร้อมทั้งเอสโตรเจนมีผลให้ลดฤทธิ์ในการชักนำให้เซลล์เพิ่มจำนวนของเอสโตรเจนได้โดยเฉพาะ D-mannitol ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสรรพคุณในการทำให้ก้อนเนื้อมะเร็งยุบลงได้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้น การศึกษาที่มากขึ้นด้วยเทคนิคและวิธีอื่นๆ ที่ลงลึกถึงระดับโมเลกุลตลอดจนการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองต่อไปในอนาคตจะช่วยให้สามารถยืนยันฤทธิ์ดังกล่าวตลอดจนกลไกในการออกฤทธิ์ได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การนำไปสู่การอนุรักษ์ การเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตยาจากธรรมชาติและเป็นการส่งเสริมการใช้ภูมิปัญญาไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้นต่อไปในอนาคต

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มขึ้น ตลอดจนการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง
2. ควรศึกษาสารสำคัญเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจทำให้พบสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมและช่วยให้อธิบายกลไกได้มากขึ้น
3. ควรศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดขล้าหมาทั้งในลักษณะเส้นใยและดอกเห็ด เพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์และเพื่อการนำมาใช้ในอนาคตโดยไม่ต้องรอให้เห็ดเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งเกิดเพียงปีละ 1 ครั้ง
4. ผลจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและ/หรือความงามได้

## ผลผลิต

### ผลงานตีพิมพ์

- Niramai Fangkrathok, Orapun Yodsaoue, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai, Sunan Jaisamut. 2017. Inhibitory effect of D-mannitol isolated from mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells. **Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University**. Special issue September 2017; 1-6.
- Jintana Junlatat, Orapun Yodsaoue, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. 2018. Inhibitory effect of mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* extract on COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW 264.7 macrophage cells. 1<sup>st</sup> International Conference of Innovation of Functional Foods in Asia (IFFA) 2018. 22-24 Jan 2018. Phayao, Thailand. p120.





วารสาร

# วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Journal of Science & Technology, Ubon Ratchathani University

ฉบับพิเศษ : กันยายน 2560 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

# Natural Medicine

Nutrition

Biotechnology

Biotechnology

Pharmacology

Natural Drug

Complementary

Standardization

Pharmacology

Cosmetics

Pharmacognosy

Standardization

Natural Drug

Pharmacology

Pharmacognosy

## Content

| List  | Page |
|---|------|
| Inhibitory Effect of D-Mannitol Isolated from Mushroom <i>Mycoamaranthus cambodgensis</i> on LPS-Induced Inflammation of RAW264.7 Cells<br>Dr. Niramai Fangkrathok                    | 1    |
| DPPH Scavenging Activities and Phytochemical Studies of Extracts and Embelin Isolated from <i>Ardisia elliptica</i> Fruits<br>Mr. Thatchaphon Meemin                                  | 7    |
| Antioxidant and Anticancer Activities of <i>Buchanania siamensis</i> Miq. Stem and Leaf Extracts<br>Dr. Orapun Yodsaoue   | 13   |
| Antiproliferative Effect of <i>Eurycoma longifolia</i> Root Extract and Eurycomanone on Human Hepatocellular Carcinoma and Human Dermal Fibroblast Cell Lines<br>Mr. Yuttakan Wattana | 18   |
| Antifungal Activity of Alginate Microparticles of Blended Essential Oils<br>Asst. Prof. Patravadee - Buranatrakul   | 26   |
| Comparison of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity between the Ethanolic Leaf Extracts from Two Local Sapodilla Varieties<br>Miss Pawika Mahasawat                         | 32   |
| Comparison of Total Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Activity in Young and Old Leaf Extract of <i>Azadirachta excelsa</i> (Jack) Jacobs.<br>Mr. Sittichai Pholarree    | 41   |
| Microscopic Characterization of Erythrina Species Distributed in Thailand<br>Mr. Kitipan Khaonim  | 52   |
| Pharmacognostic Specification and Chrysin Content of <i>Oroxylum indicum</i> Seeds in Thailand<br>Miss Kirana Prasardmek  | 60   |
| Antibacterial Activity of Essential Oil from <i>Zanthoxylum Rhetsa</i> (Roxb.) Dc. Fruit<br>Miss Thanawan Sungrai   | 69   |
| Interaction of <i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels with Conventional Digoxin in Everted Rat Intestine<br>Mr. Watchara Dulyasittipom   | 76   |
| Effects of Auricular Acupressure and Moxibustion on Pain Relief in Primary Dysmenorrhea<br>Dr. Sulukkana Noiprasert   | 81   |
| Screening of Antibacterial Activities of 53 Thai Herbal Extracts against Acne-Involved Bacteria<br>Miss Nicharee Pinit  | 85   |
| Development of Plastic Hollow Microneedles<br>Mr. Surat Wangwarunyoo  | 93   |
| Isoliquiritigenin from <i>Butea monosperma</i> Suppresses Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells<br>Mr. Rana Dhar                                       | 97   |
| Novel Dissolving Microneedles Made of Maltose Solution for Transdermal Drug delivery<br>Mr. Apiwat Jaroonpol  | 105  |

## Inhibitory Effect of Mannitol Isolated from Mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-Induced Inflammation of RAW264.7 Cells

Niramai Fangkrathok<sup>1,\*</sup>, Orapun Yodeaoue<sup>2</sup>, Jintana Junlatat<sup>3</sup>, Bungom Sripanidkulchai<sup>4</sup>, Sunan Jaisamut<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus, Sa Kaeo, 27180, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Science and Social Science, Burapha University Sakaeo Campus, Sa Kaeo, 27180, Thailand

<sup>3</sup> Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Mueang, Ubon Ratchathani, 34000, Thailand

<sup>4</sup> Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

<sup>5</sup> Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, Mueang, Chonburi, Thailand, 20130, Thailand

\*Corresponding Author: niramai@buu.uo.th

### Abstract

*Mycoamaranthus cambodgensis* is an edible wild mushroom found in Thailand. The objective of this study was to isolate and elucidate the chemical structure of the bioactive compound from the mushroom, in addition, the anti-inflammatory effect of the compound on LPS-induced RAW264.7 cells was also studied by using RT-PCR technique. A white solid compound was isolated from methanolic extract of *M. cambodgensis* with a yield of 0.9% from crude extract. The results from NMR analysis showed that the compound was mannitol. The mannitol showed no cytotoxic effect on the test cells at concentration ranges of 1.25 to 20 µg/ml. The mannitol had no effect on inflammatory mediator gene expression of RAW264.7 cells, whereas the compound showed significant suppression on the expression of COX-2, IL-6, iNOS and TNF-α genes of LPS-induced RAW264.7 cells in a dose-dependent manner. In conclusion, the isolated mannitol from this mushroom may play an important role in health beneficial effect of *M. cambodgensis* mushroom.

**Keywords:** *Mycoamaranthus cambodgensis*, Mannitol, Anti-Inflammatory Effect

### Introduction

Inflammation is an immune mechanism in response to infections. Several pro-inflammatory biomarkers activated from pro-inflammatory cells play an important role in this inflammatory response including inducible nitric oxide synthase (iNOS), inducible type cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukins (IL) -1β, IL-6, IL-8, prostaglandin E2 (PGE2) and tumor necrosis factor-α (TNF-α). The imbalance or excessive response of inflammation may lead to different kinds of damage, chronic inflammatory diseases, cancers, and autoimmune diseases. Therefore, decreasing the inflammatory response is one of the main treatment targets of those diseases.

*Mycoamaranthus cambodgensis* ( Pat. ) Trappe, S. Lumyong, P. Lumyong, Sanmee & Zhu L. Yang. is an edible mushroom found in Australia and southeastern Asia [1]. This brilliant yellow sequestrate fungus is in the family Hymenogasteraceae (Figure 1A) [2]. Its white gleba changes to dark brown gleba when it turns to maturity (Figure 1B) [1]. This mushroom was used as a traditional medicine for maintenance of a regular menstrual cycle and treatment of tumor. *M.*

*cambodgensis* was reported to have high nutritional value and contain phenolics and flavonoids [3]. However, there was no scientific report of its bioactive compounds and pharmaceutical effects. Therefore, the objectives of this study were to elucidate the chemical structure of the isolated bioactive compound and study its anti-inflammatory activity by using RAW264.7 cells.

### Methodology

#### Extract preparation

Fresh fruiting bodies of *M. cambodgensis* mushroom were collected from community forest in Wattana Nakom district, Sa Kaeo province, Thailand. The mushroom was sliced and dried by using hot air oven at 50°C. The dried mushroom was macerated by using 50% ethanol for 7 days at room temperature. The extract was filtered and concentrated by using rotary evaporator. Yield of crude extract from fruiting body dry weight was 15.1%.

#### Chemical isolation and structure elucidation

The crude extract (28.0 g) was dissolved in methanol and then partitioned by using n-hexane. The methanol fraction was concentrated by using rotary

evaporator. The crude methanol extract (9.73 g) was further purified by Quick Column Chromatography using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  as eluent and increasing polarity with methanol to give 10 fractions (S1-S10). Fraction S8 (612 mg) was recrystallized from methanol to give a white solid

compound (252.3 mg) with the yield of 0.9% from the crude extract. The compound was structurally elucidated by using 400 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometers in DMSO- $d_6$  solution.



Figure 1. The outside (A) and inside (B) appearances of *M. cambodgensis* fresh fruiting body

#### Study of cytotoxicity

The compound was dissolved in distilled water and filtered by using 0.4  $\mu\text{m}$  syringe filter. RAW264.7 cells were cultured in 96-well plate (10,000 cells/well) by using RPMI culture medium supplemented with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin and incubated overnight at 37°C in the humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ . The cells were treated with various concentrations of compound and then incubated for 24 h. Cell viability was measured by using Alamar blue assay [4]. The cytotoxicity was expressed as % cell viability.

#### Determination of inflammatory-related gene expression

The RAW264.7 cells were cultured overnight in 12-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well) and treated with various concentrations of compound and Indomethacin as a positive control. After incubation at 37°C in the humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  for 22 h, the *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) was added then further incubated for 2 h. Total RNA was extracted from the treated cells by using a GE Healthcare extraction kit. The first-strand cDNA was synthesized from total RNA (40 ng) with Omniscript reverse transcriptase kit. The primers were used for amplifying the respective fragments. Polymerase chain reaction (PCR) was performed by incubation of each cDNA sample with the primers, Taq polymerase, and deoxynucleotide mix. Amplification was completed for 30 cycles and the conditions for PCR amplification followed previous reports [5-6]. The PCR products were then analyzed on 1.5% agarose gel, visualized by NovelJoice staining and RT-PCR product densities measured by Gel Documentation and System Analysis machine. The

inflammatory-related gene expressions were calculated for the relative mRNA expression level compared with  $\beta$ -actin and expressed as 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ).

#### Statistical analysis

The results are reported as mean  $\pm$  S.D. One-Way ANOVA and multiple comparison (LSD) were analyzed by using SPSS version 16.0.

#### Results

The white solid compound was structurally elucidated and the following data were described. The compound melting point was 166-168°C. The IR spectrum showed absorption bands of hydroxyl group ( $3385 \text{ cm}^{-1}$ ), and C-H stretching ( $2938 \text{ cm}^{-1}$ ). The  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT spectral data exhibited 2 carbons of an oxymethylene ( $\delta$  64.3) and two oxymethines ( $\delta$  70.1 and 71.8) (Table 1). The  $^1\text{H}$  NMR spectral data displayed the presence of a AB system at  $\delta$  3.37 (2H, m,  $\text{H}_A$ -1/  $\text{H}_A$ -6) and 3.61 (2H, m,  $\text{H}_B$ -1/  $\text{H}_B$ -6), two oxymethine protons at  $\delta$  3.46 (2H, m, H-2/H-5) and 3.54 (2H, t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , H-3/H-4) and three hydroxyl groups at  $\delta$  4.14 (2H, d,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , OH-3/OH-4), 4.33 (2H, t,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , OH-1/OH-6) and 4.41 (2H, d,  $J = 5.2 \text{ Hz}$ , OH-2/OH-5). The structure was confirmed by HMBC correlations. The oxymethine proton at  $\delta$  3.46 (H-2/H-5) showed correlation with carbons at  $\delta$  64.3 (C-1/C-6), 70.1 (C-3/C-4) and 71.8 (C-2/C-5) and an oxymethine proton at  $\delta$  3.54 (H-3/H-4) showed correlation with carbons at  $\delta$  64.3 (C-1/C-6) and 71.8 (C-2/C-5). The correlation of oxymethylene protons at  $\delta$  3.37 and 3.61 (2H-1/2H-6)

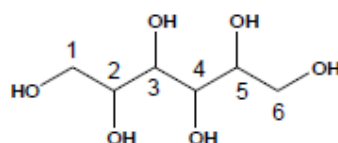
with carbons at  $\delta$  70.1 (C-3/C-4) and 71.8 (C-2/C-5) suggested the position of OH at C-1/C-6, C-2/C-5 and C-3/C-4. From the spectral data and comparison with those of mannitol [7-9], the compound was assigned as mannitol (Figure 2).

The mannitol was analyzed for its cytotoxicity against RAW264.7 cells prior to determination of anti-

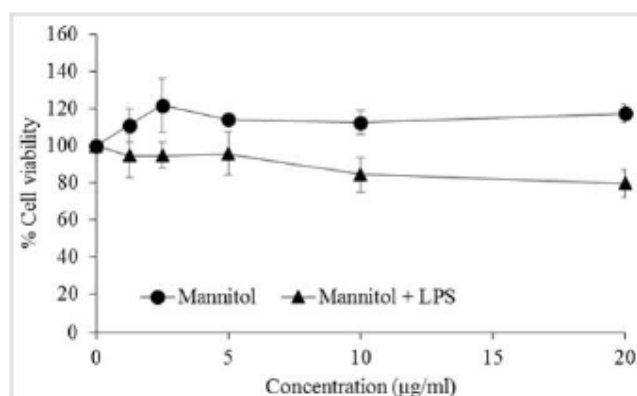
inflammatory activity. Without LPS addition, mannitol had no cytotoxicity to the tested cells and cell proliferation was slightly increased when treated with 1.25 to 20  $\mu\text{g/ml}$  of mannitol. Mannitol slightly decreased cell viability in the LPS supplemented medium (Figure 3). Therefore, mannitol at concentration of 1.25 to 20  $\mu\text{g/ml}$  was safe for RAW264.7 cells in this study.

**Table 1.**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY and HMBC NMR (400 and 100 MHz, DMSO- $d_6$ ) spectroscopic data of mannitol in DMSO- $d_6$  ( $\delta$  in ppm, multiplicities, J in Hz)

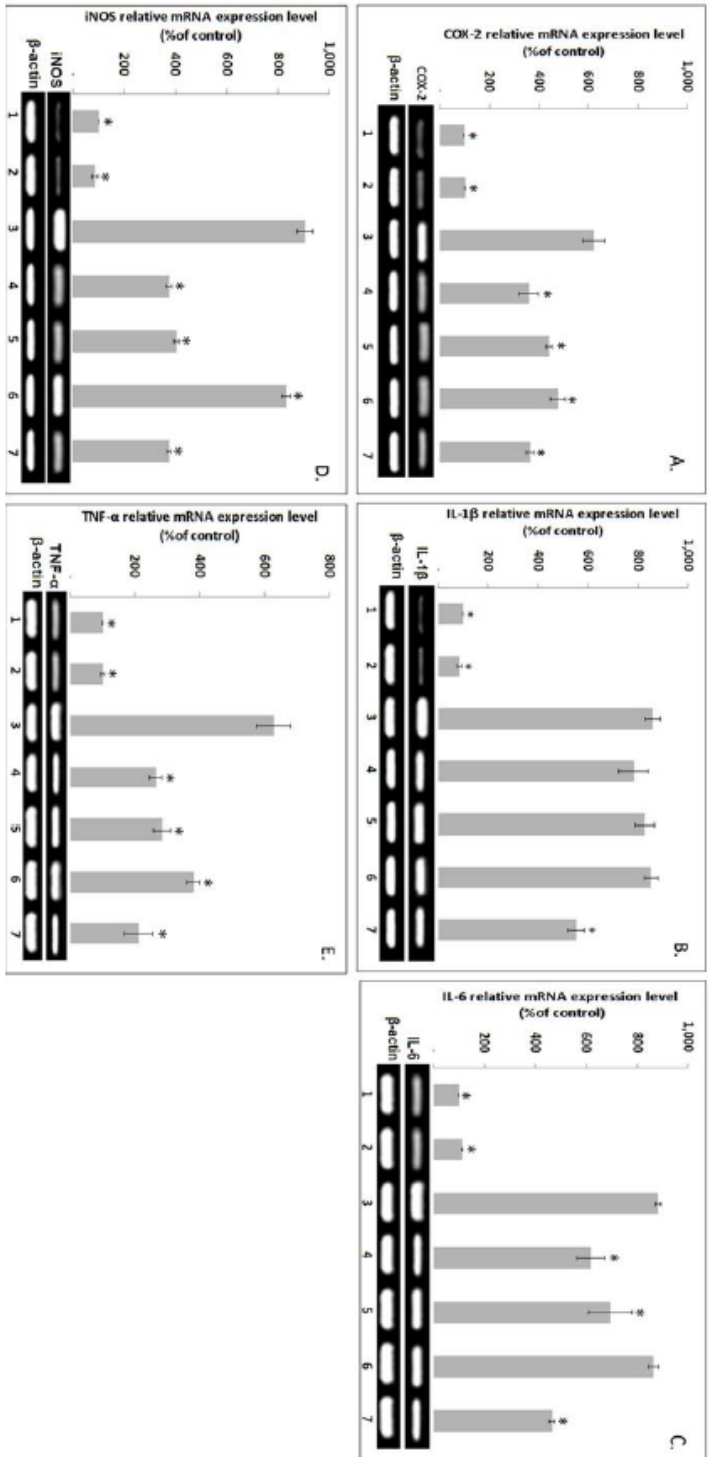
| positions | $\delta$ $^1\text{H}$ | $\delta$ $^{13}\text{C}$ | DEPT          | COSY     | HMBC          |
|-----------|-----------------------|--------------------------|---------------|----------|---------------|
| 1         | 3.37 m, 3.61 m        | 64.3                     | $\text{CH}_2$ | 2, 1-OH  | 2,3           |
| 2         | 3.46 m                | 71.8                     | CH            | 1,3,2-OH | 1,3           |
| 3         | 3.54 t (7.2)          | 70.1                     | CH            | 2, 3-OH  | 1,2           |
| 4         | 3.54 t (7.2)          | 70.1                     | CH            | 5, 4-OH  | 5,6           |
| 5         | 3.46 m                | 71.8                     | CH            | 4,6,5-OH | 4,6           |
| 6         | 3.37 m, 3.61 m        | 64.3                     | $\text{CH}_2$ | 5,6-OH   | 4,5           |
| 1,6-OH    | 4.33 t (5.2)          | -                        | -             | 1,6      | 1,2 (5,6)     |
| 2,5-OH    | 4.41 d (5.2)          | -                        | -             | 2,5      | 1,2,3 (4,5,6) |
| 3,4-OH    | 4.14 d (7.2)          | -                        | -             | 3,4      | 2,3 (4,5)     |



**Figure 2.** Chemical structure of mannitol isolated from *M. cambodgensis*.



**Figure 3.** Cytotoxicity of mannitol against RAW264.7 with and without LPS induction



**Figure 4.** mRNA expression of pro-inflammatory mediators: A) COX-2; B) IL-1 $\beta$ ; C) IL-6; D) iNOS and E) TNF- $\alpha$ . Lane 1: unstimulated cells; lane 2: 20  $\mu$ g/ml mannitol stimulated cells, lane 3: LPS stimulated cells; lane 4: 20  $\mu$ g/ml mannitol and LPS co-stimulated cells; lane 5: 10  $\mu$ g/ml mannitol and LPS co-stimulated cells; lane 6: 5  $\mu$ g/ml mannitol and LPS co-stimulated cells and lane 7: 50  $\mu$ g/ml indomethacin and LPS co-stimulated cells

In Figure 4, mannitol did not induce the expression of all studied pro-inflammatory mediator genes compared to the control, whereas LPS induced gene expression of all pro-inflammatory mediators. After co-treatment with mannitol and LPS, the expression of those genes, except IL-1 $\beta$ , was significantly suppressed in a dose-dependent manner. Interestingly, 10 to 20  $\mu\text{g/ml}$  mannitol could decrease the expression of COX-2 ( $\text{IC}_{50} = 22.77 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$ ), iNOS ( $\text{IC}_{50} = 14.95 \pm 0.61 \mu\text{g/ml}$ ) and TNF- $\alpha$  ( $\text{IC}_{50} = 13.38 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ ) genes to levels similar to 50  $\mu\text{g/ml}$  of Indomethacin. These results indicate that mannitol isolated from *M. cambodgensis* shows strong anti-inflammatory activity and may play an important role in the anti-inflammatory activity of the *M. cambodgensis* mushroom.

#### Discussion and Conclusion

Mushrooms are a good source of nutritional and medicinal natural products. A number of bioactive substances have been discovered from mushrooms such as polysaccharides, phenolics, polyphenolics, flavonoids, terpenoids, ergosterols, and peptides. These substances were reported to have several pharmaceutical effects such as anti-tumor, anti-inflammation, anti-virus and immunomodulation [10-11]. Various compounds from mushroom were reported to show significant anti-inflammatory activity such as ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* [12], fucomannogalactan from *Lentinus edodes* [13], ergosterol from *Inonotus obliquus* [14], and cordymin from *Cordyceps sinensis* [15]. In this study, *M. cambodgensis* isolated mannitol showed no cytotoxic effect against macrophages. This is the first report that mannitol can be found in *M. cambodgensis* fruiting bodies. Mannitol was found in several mushrooms such as *L. Edodes* [16], *Agaricus bisporus* [17], *Clitocybe nebularis* [18], *Pleurotus cornucopiae* [19] and *Agaricus silvaticus* [20]. Mannitol is important for NADPH regeneration in mushroom. Mannitol is found in the mycelium stage at low concentration and then dramatically increases during differentiation to sporophores [17]. Mannitol dehydrogenase catalyzes mannitol synthesis from fructose and NADPH is a cofactor in this metabolism [21]. Increasing mannitol synthesis is related to the initiation and development of mushroom fruiting bodies [22]. Therefore, mannitol metabolism plays an important role in the development of mushroom fruiting bodies. Moreover, the isolated mannitol in this study showed strong anti-inflammatory

activity by suppression of pro-inflammatory mediator gene expression, especially COX-2, iNOS and TNF- $\alpha$  genes. There have been few reports on the anti-inflammatory activity of mannitol. Mannitol was reported to reduce inflammatory edema in a rat model of arthritis and also to reduce inflammation in adjuvant-induced arthritis in the rat [23-24].

In conclusion, *M. cambodgensis* contains mannitol as a bioactive compound which shows a strong suppressive effect on inflammatory mediators *in vitro*. The anti-inflammatory activity of *M. cambodgensis* crude extract and other compounds will be further studied. These results can support the use of *M. cambodgensis* as a traditional medicine and as a good candidate for inflammatory treatment from natural products.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 129/2560). Thank you to the Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, for facility support.

#### References

- [1] Lumyong, S., Sanmee, R., Lumyong, P., Yang, Z.L. and Trappe, J. M. 2003. *Mycoamaranthus cambodgensis* comb. nov., a widely distributed sequestrate basidiomycete from Australia and southeastern Asia. *Mycological Progress*. 2(4): 323–325.
- [2] Chandrasrikul, A., Suwanarit, P., Sangwanit, U., Lumyong, S., Payapanon, A., Sanoamuang, N., Pukahuta, C., Petcharat, V., Sardud, U., Duengkae, K., Klinhom, U., Thongkantha, S. and Thongklam, S. 2011. Checklist of Mushrooms (Basidiomycetes) in Thailand. Bangkok: Office of National Resources and Environmental Policy and Planning. pp203.
- [3] Srikram, A. and Supapvanich, S. 2016. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. *Agriculture and Natural Resources*. 50: 432-436.
- [4] Page, B., Page, M. and Noel, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *International Journal of Oncology*. 3: 473-476.

- [5] Won, J.H., Im, H.T., Kim, Y.H., Yun, K.J., Park, H.J., Choi, J.W. and Lee, K.T. 2006. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *British Journal of Pharmacology*. 148: 216–225.
- [6] Sripanidkulchai, B., Junlatat, J., Wara-aswapati, N. and Homdee, D. 2009. Anti-inflammatory effect of *Strebilus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 124: 566-570.
- [7] Potekhina, N.V., Shashkov, A.S., Evtushenko, L.I., Gavrish, E.U., Senchenkova, S.N., Stomakhin, A.A., Usov, A.I., Naumova, I.B. and Stackebrandt, E. 2003. A novel mannitol teichoic acid with side phosphate groups of *Brevibacterium* sp. VKM Ac-2118. *European Journal of Biochemistry*. 270: 4420–4425.
- [8] Kim, Y.S., Lee, I.K., Seok, S.J. and Yun, B.S. 2008. Chemical constituents of the fruiting bodies of *Clitocybe nebularis* and their antifungal activity. *Mycobiology*. 36(2): 110-113.
- [9] Munkhgerel, L., Erdenechimeg, N., Dumaa, M., Zhang, G., Odonmajig, P. and Regdel, D. 2011. Chemical and biological investigation of the *Agaricus silvaticus* Schaeff ex. Secr. Mongolian *Journal of Chemistry*. 12: 92-97.
- [10] Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Apply Microbiology and Biotechnology*. 60: 258-274.
- [11] Elsayed, E.A., Enshasy, H.E., Wadaan, M.A.M. and Aziz, R. 2014. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of Inflammation*. 2014: 1-15.
- [12] Akihisa, T., Nakamura, Y., Tagata, M., Tokuda, H., Yasukawa, K., Uchiyama, E., Suzuki, T. and Kimura, Y. 2007. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity*. 4(2): 224–231.
- [13] Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Komura, D.L., Marconb, R., Freitasc, C. S., Baggio, C. H., Santosd, A.R.H., Torrie, G., Gorina, P.A.J. and Iacomini, M. 2008. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry*. 111(3): 531–537.
- [14] Ma, L., Chen, H., Dong, P. and Lu, X. 2013. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*. 139: 503–508.
- [15] Qian, G.M., Pan, G.F. and Guo, J.Y. 2012. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research*. 26(24): 2358–2362.
- [16] Tan, Y.H. and Moore, D. 1994. High concentrations of mannitol in the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *Microbios*. 79: 31 -35.
- [17] Hammond, J.B.W. and Nichols, R. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology*. 93: 309-320.
- [18] Kim, Y.S., Lee, I.K., Seok, S.J. and Yun, B.S. 2008. Chemical constituents of the fruiting bodies of *Clitocybe nebularis* and their antifungal activity. *Mycobiology*. 36(2): 110-113.
- [19] Hagiwara, S.Y., Takahashi, M., Shen, Y., Kaihou, S., Tomiyama, T., Yazawa, M., Tamai, Y., Sin, Y., Kazusaka, A. and Terazawa, M. 2005. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus comucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69(8): 1603-1605.
- [20] Munkhgerel, L., Erdenechimeg, N., Dumaa, M., Zhang, G., Odonmajig, P. and Regdel, D. 2011. Chemical and biological investigation of the *Agaricus silvaticus* Schaeff ex. Secr. Mongolian *Journal of Chemistry*. 12(38): 92-97.
- [21] Edmundowicz, J. M. and Wriston, J. R. 1963. Mannitol dehydrogenase from *Agaricus campestris*. *Journal of Biological Chemistry*. 238: 3539-3541.
- [22] Hammond, J. B. W. 1981. Variation on enzyme activity during periodic fruiting of *Agaricus bisporus*. *New Phytology*. 89: 419-428.
- [23] Lewis, D.A., Thanib, S.M. and Veitch, G.B.A. 2008. The Anti-inflammatory Activity of Celery *Apium graveolens* L. (Fam. Umbelliferae). *International Journal of Crude Drug Research*. 23(1): 27-32.
- [24] Cavone, L., Calosi, L., Cinci, L., Moroni, F. and Chiarugi, A. 2012. Topical mannitol reduces inflammatory edema in





**THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
INNOVATION OF FUNCTIONAL FOODS IN ASIA**

**IFFA 2018**

**FUNCTIONAL FOODS: NEW TRENDS OF INNOVATION,  
RESEARCH AND MARKETS**

**JANUARY 22<sup>ND</sup> - 24<sup>TH</sup>, 2018**

**PROGRAM AND ABSTRACTS**

**UNIVERSITY OF PHAYAO, PHAYAO, THAILAND**



## Contents

|   | <b>Page</b> |
|---|-------------|
| <b>Information</b>  |             |
| Message from the President of University of Phayao                                  | ii          |
| Introduction to IFFA 2018   | iii         |
| Message from Society for Free Radical Research-Thai (SFRR-Thai)                     | v           |
| Organizing Committee  | vi          |
| Conference Program  | vii         |
| List of oral presentations  | x           |
| List of poster presentations  | xiii        |
| Area guide  | xviii       |
| <b>Abstracts</b>  |             |
| Keynote Lecture   | 1           |
| Symposium 1: Role of Functional Foods in Health and Diseases                        | 5           |
| Symposium 2: Innovation Ingredients of Functional Foods                             | 11          |
| Symposium 3: Functional Foods for Diabetes  | 15          |
| Symposium 4: Functional Foods for Brain Memory and Cognitive Promotion              | 21          |
| Symposium 5: Current Situation and Innovative Trends of Functional<br>Foods in Asia | 29          |
| Symposium 6: Probiotics, Prebiotics and Synbiotics                                  | 33          |
| Symposium 7: Innovation Approach for Value-Added Functional Foods                   | 37          |
| Symposium 8: Trends in Consumption and Food Preferences                             | 43          |
| Symposium 9: Update of Traditional and Functional Foods in Asia                     | 45          |
| Symposium 10: Innovation in Traditional Food Research and Their Health<br>Benefits  | 51          |
| Oral Presentations  | 57          |
| Poster Presentations  | 99          |
| <b>Author Index</b>   | <b>183</b>  |
| <b>Proceedings (presented in the companion CD)</b>                                  |             |
| IFFA2018P1- IFFA2018P27   |             |

## Contents

|  | <b>Page</b> |
|--|-------------|
| <b>Information</b>   |             |
| Message from the President of University of Phayao                               | ii          |
| Introduction to IFFA 2018  | iii         |
| Message from Society for Free Radical Research-Thai (SFRR-Thai)                  | v           |
| Organizing Committee   | vi          |
| Conference Program   | vii         |
| List of oral presentations   | x           |
| List of poster presentations   | xiii        |
| Area guide   | xviii       |
| <b>Abstracts</b>   |             |
| Keynote Lecture  | 1           |
| Symposium 1: Role of Functional Foods in Health and Diseases                     | 5           |
| Symposium 2: Innovation Ingredients of Functional Foods                          | 11          |
| Symposium 3: Functional Foods for Diabetes                                       | 15          |
| Symposium 4: Functional Foods for Brain Memory and Cognitive Promotion           | 21          |
| Symposium 5: Current Situation and Innovative Trends of Functional Foods in Asia | 29          |
| Symposium 6: Probiotics, Prebiotics and Synbiotics                               | 33          |
| Symposium 7: Innovation Approach for Value-Added Functional Foods                | 37          |
| Symposium 8: Trends in Consumption and Food Preferences                          | 43          |
| Symposium 9: Update of Traditional and Functional Foods in Asia                  | 45          |
| Symposium 10: Innovation in Traditional Food Research and Their Health Benefits  | 51          |
| Oral Presentations   | 57          |
| Poster Presentations   | 99          |
| <b>Author Index</b>  | 183         |
| <b>Proceedings (presented in the companion CD)</b>                               |             |
| IFFA2018P1- IFFA2018P27  |             |



# Inhibitory effect of mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* extract on COX-2 and IL-1 $\beta$ mRNA expression in RAW 264.7 macrophage cells



Jintana Junlatat<sup>1</sup>, Orapun Yodsauoe<sup>2</sup>, Bungorn Sripanidkulchai<sup>3</sup>, Niramal Fangkrathok<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchasit Rajabhat University, Mueang, Ubon Ratchasit, 4000, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Sciences and Social Sciences, Burapha University Sakon Nakhon Campus, Sa Kaeo, 27160, Thailand

<sup>3</sup> Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

<sup>4</sup> Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakon Nakhon Campus, Sa Kaeo, 27160, Thailand

\*Corresponding Author: niramal@buu.ac.th

## Introduction and Objectives

*Mycoamaranthus cambodgensis*, Family Hymenogasteraceae, is an edible wild mushroom and found in Thailand. This mushroom was used as a traditional medicine for maintenance a regular menstrual cycle and treatment of tumor [1]. *M. cambodgensis* was reported to have high nutritional value and contain phenolics and flavonoids [2]. This brilliant yellow sequestrate fungus is in the family Hymenogasteraceae (Fig.1A). Its white gleba is changed to dark brown gleba when it turns to maturity (Fig.1B). The objective of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of *M. cambodgensis* extract (MCE) via the alteration of cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) expressions. COX-2 is an inducible isoform of prostaglandin synthase found in activated phagocytes that are responsible for inflammation. In addition to IL-1 $\beta$  play roles as endogenous pyrogens by stimulating the release of prostaglandins catalyzed from COX [3].

## Results and conclusion

The MCE showed less cytotoxic effect on the test cells at concentration higher than 200  $\mu$ g/ml (Fig.2). In addition, MCE significant inhibited mRNA expression of COX-2 and IL-1 $\beta$  genes in a dose-dependent manner (Fig.3). The MCE exhibited the inhibition with IC<sub>50</sub> value at 223.09 $\pm$ 8.85 and 224.97 $\pm$ 21.43  $\mu$ g/mL on COX-2 and IL-1 $\beta$  gene expression, respectively (Fig.4). This mushroom extract may play an important role in health beneficial effect and the results confirm its potential to be a functional food.

## Methods

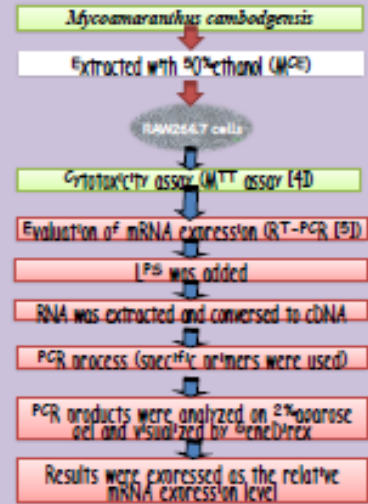


Fig. 1: The outside (A) and inside (B) appearances of *M. cambodgensis* fresh fruiting body

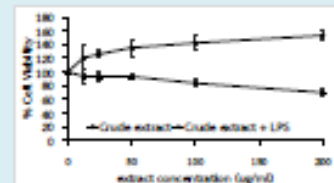


Fig. 2: Effect of MCE on cell viability

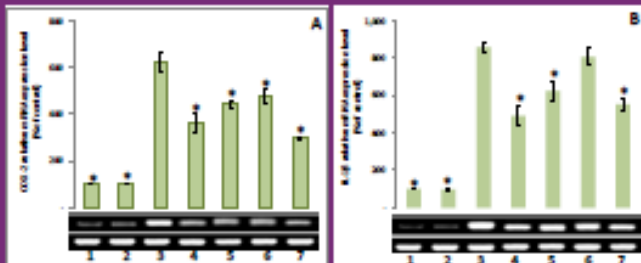


Fig. 3: Inhibitory effect of MCE on mRNA expression of COX-2 (A) and IL-1 $\beta$  (B) compared with  $\beta$ -actin mRNA expression. (\*Significant difference from LPS treatment alone,  $p < 0.05$ )

1=Unstimulated Cells  
2=Cells+MCE[200  $\mu$ g/ml]  
3=Cells+LPS  
4=Cells+MCE[200  $\mu$ g/ml]+LPS  
5=Cells+MCE[100  $\mu$ g/ml]+LPS  
6=Cells+MCE[50  $\mu$ g/ml]+LPS  
7=Cells+Indomethacin [30  $\mu$ g/ml]+LPS

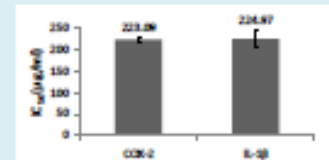


Fig. 4: The half maximal inhibitory effect of MCE on COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW 264.7 cells

## References

- [1] Linying et al. 2008. *Mycological Progress*, 2(6): 321–325.
- [2] Srikarn and Supayavanich. 2016. *Agriculture and Natural Resources*, 50: 432–436.
- [3] Fangkrathok et al. 2013. *Journal of Ethnopharmacology*, 147: 615–632.
- [4] Mawman T. 1980. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63.
- [5] Won et al. 2006. *British Journal of Pharmacology*, 148: 216–225.

This research was facilities supported by the Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University and financial supported from the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no.129/2560)

รายงานการเงิน  
 เลขที่โครงการระบบบริหารวิจัย 2560A10802007 สัญญาเลขที่ 129/2560  
 โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา  
 (Study of chemical composition and biological activities of crude extract and bioactive  
 compounds from mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis*)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ. ดร. นีรามัย ฝางกระโทก

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

|                |                   |   |
|----------------|-------------------|---|
| งวดที่ 1 (50%) | .....199,250..... | บาท เมื่อวันที่.....31 มกราคม 2560.....         |
| งวดที่ 1 (40%) | .....159,400..... | บาท เมื่อวันที่.....31 กรกฎาคม 2560....         |
| งวดที่ 1 (10%) | .....39,850....   | บาท เมื่อวันที่.....-.....                      |
| รวม            | .....398,500..... | บาท...(สามแสนเก้าหมื่นแปดพันห้าร้อยบาทถ้วน).... |

รายจ่าย

| รายการ   | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|--|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1. ค่าตอบแทน   | 38,000             | 38,000             | 0                     |
| 2. ค่าจ้าง   | 36,000             | 36,000             | 0                     |
| 3. ค่าวัสดุ  | 209,400            | 254,999.27         | -45,599.27            |
| 4. ค่าใช้สอย   | 75,250             | 30,227             | 45,023                |
| 5. ค่าครุภัณฑ์                                       | 0                  | 0                  | 0                     |
| 6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ<br>- ค่าธรรมเนียม<br>สถาบัน (10%) | 39,850             | 39,850             | 0                     |
| รวม  | 398,500            | 399,076.27         | -576.27               |

ลงนาม.....

(อ. ดร. นีรามัย ฝางกระโทก)

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

## บรรณานุกรม

- มติชนสุดสัปดาห์. สมุนไพรเพื่อสุขภาพ โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง มูลนิธิสุขภาพไทย “เห็ดห้าพระ บำรุงสุขภาพสตรี”. ฉบับที่ 1823, 24-30 กรกฎาคม 2558, หน้า 102.
- อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนวิไล สุวรรณฤทธิ์, อุทัยวรรณ แสงวณิช, Tsutomu Morinaga, Yoshinori Nishizawa, Yasuaki Murakami. 2551. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร. หน้า 252.
- Achenbach H, Benirschke G. 1995. Joannesialactone and other compounds from *Joannesia princeps*. *Phytochemistry*. 45; 149-157.
- Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 6: 203-208.
- Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, Tokuda H, Yasukawa K, Uchiyama E, Suzuki T, Kimura Y. 2007. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity*. 4(2): 224-231.
- Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. 2011. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2: 537-544.
- Artur HS, Dunn AJ. 2001. Cyclooxygenase 1 is not essential for Hypophagic responses to interleukin-1 and endotoxin in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 69: 659-663.
- Ashcroft GS, Mills SJ, Lei KJ, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, et al. 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*. 111: 1309-1318.
- Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MWJ. 1999. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol*. 155: 1137-1146.
- Ashcroft GS, Lei KJ, Jin WW, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, et al. 2000. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*. 6: 1147-1153.
- Ashcroft GS, Horan MA, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson MWJ. 1997. Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. *Cell Tissue Res*. 290: 581-591.
- Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, et al. 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med*. 3: 1209-1215.
- Attasara P, Buasom R. 2011. Hospital-based cancer registry. National Cancer Institute. Union Ultraviolet Co. Ltd. 55p.
- Babior BM. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 93: 1464-1476.

- Balkwill F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 9: 361-371.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 78, 431 – 441.
- Bose-Basu B, Klepach T, Bondo G, Bondo PB, Zhang W, Carmichael I, Serianni AS. 2007.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spin-spin coupling constants in saccharides: structural correlations involving all carbons in aldohexopyranosyl rings. *J Org Chem*. 72: 7511-7522.
- Burian M, Geisslinger G. 2005. COX-dependent mechanisms involves in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 107: 139-154
- Carbonero ER, Gracher AHP, Komura DL, Marconb R, Freitasc CS, Baggioch CH, Santosd ARH, Torrie G, Gorina PAJ, Iacomini M. 2008. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry*. 111(3): 531–537.
- Cavone L, Calosi L, Cinci L, Moroni F, Chiarugi A. 2012. Topical mannitol reduces inflammatory edema in a rat model of arthritis. *Pharmacology*. 89(1-2): 18-21.
- Chiarugi P, Fiaschi T. 2007. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, 19: 672-682.
- Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
- Devkota S. 2006. Yarsagumba [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.]; traditional utilization in Dolpa district, western Nepal. *Our Nat*. 4: 48–55.
- Edmundowicz JM, Wriston JR. 1963. Mannitol dehydrogenase from *Agaricus campestris*. *Journal of Biological Chemistry*. 238: 3539-3541.
- Elsayed EA, Enshasy HE, Wadaan MAM, Aziz R. 2014. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of Inflammation*. 2014: 1-15.
- Emmerson E, Hardman MJ. 2012. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. *Biogerontology*. 13: 3-20.
- Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Umehara K, Noguchi H. 2013. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. *Natural Product Research*. 27(18), 1611-1619.
- Fangkrathok N, Junlatat J, Sripanidkulchai B. 2013. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 147, 631-637.
- Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Umehara K, Noguchi H. 2013. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. *Natural Product Research*. 27(18): 1611-1619.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 7: 21-33.

- Fiaschi T, Chiarugi P. 2012. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol.* 2012: 762825.
- Fitzpatrick FA. 2001. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol.* 1, 1651–1667.
- Fruehauf JP, Trapp V. 2008. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? *Expert Rev Anticancer Ther.* 8: 1751-1717.
- Guo J, Friedman SL. 2007. Hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease.* 27(4): 413–426.
- Gupta RK, Patel AK., Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UD, Gupta PK, Pakuwal U. 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15, 4405-4409.
- Hagiwara SY, Takahashi M, Shen Y, Kaihou S, Tomiyama T, Yazawa M, Tamai Y, Sin Y, Kazusaka A, Terazawa M. 2005. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 69(8): 1603-1605.
- Hammond JBW. 1981. Variation on enzyme activity during periodic fruiting of *Agaricus bisporus*. *New Phytology.* 89: 419-428.
- Hammond, J.B.W. and Nichols, R. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology.* 93: 309-320.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 646-674.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 3: 276-285.
- Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, et al. 2006. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 101: 246-253.
- Jackson RL, Greiwe JS, Schwen RJ. 2011. Ageing skin: oestrogen receptor  $\beta$  agonists offer an approach to change the outcome. *Exp Dermatol.* 20: 879-882.
- Jo WS, Choi YJ, Kim HJ, Lee JY, Nam BH, Lee JD, Lee SW, Seo SY, Jeong MH. 2010. The Anti-inflammatory Effects of Water Extract from *Cordyceps militaris* in Murine Macrophage. *Mycobiology.* 38(1): 46–51.
- Kaushal N, Kudva AK. 2013. Oxidative stress and inflammation: “The lesser of two evils” in carcinogenesis. *Journal of Postdoctoral Research.* 1(2): 89-101.
- Kagiyada K, Chida D, Sakatani T, Asano M, Nambu A, Kakuta S, Iwakura Y. 2004. Interleukin (IL)-6, but not IL-1, induction in the brain downstream of cyclooxygenase-2 is essential for the induction of febrile response against peripheral IL-1 $\alpha$ . *Endocrinology.* 145: 5044-5048.



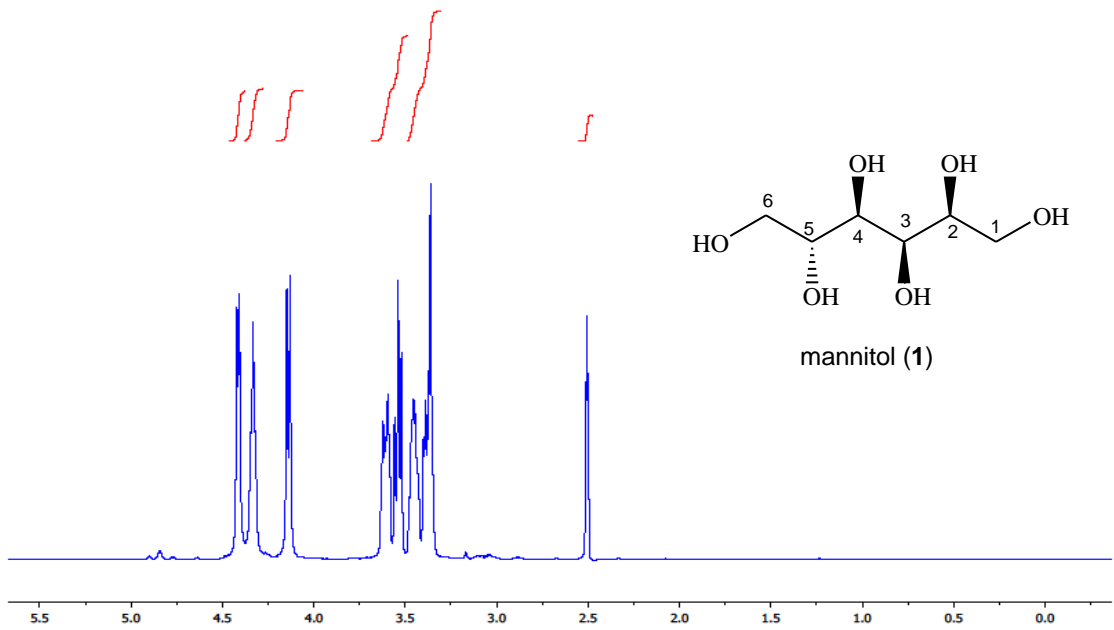
- Kim YS, Lee IK, Seok SJ, Yun BS. 2008. Chemical constituents of the fruiting bodies of *Clitocybe nebularis* and their antifungal activity. *Mycobiology*. 36(2): 110-113.
- Lado C, Then M, Varga I, Szoke E, Szentmihalyi K. 2004. Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. *Z. Naturforsch.* 59c: 354-358.
- Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, Choi DK, Choi WS. 2006. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 103: 208-216.
- Lewis D, Smith D. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.* 66: 143-184.
- Lewis DA, Tharib SM, Veitch GBA. 2008. The Anti-inflammatory Activity of Celery *Apium graveolens* L. (Fam. Umbelliferae). *International Journal of Crude Drug Research*. 23(1): 27-32.
- Lin JY, Tang CY. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101, 140-147.
- Liu Y, Wang J, Wang W, Zhang H, Zhang X, Han C. 2015. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; Article ID 575063: 1-12.
- Lumyong S, Sanmee R, Lumyong P, Yang ZL, Trappe JM. 2003. *Mycoamaranthus cambodgensis* comb. Nov., a widely distributed sequestrate basidiomycetes from Australia and southeastern Asia. *Mycological Progress*. 2(4): 323-325.
- Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. 2013. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*. 139: 503-508.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454: 436-444.
- Miyauchi M, Hiraoka M, Oka H, Sato S, Kudo Y, Ogawa I, Noguchi K, Ishikawa I, Takata T. 2004. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Archives of Oral Biology*. 49: 739-746.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63
- Munkhgerel L, Erdenechimeg N, Dumaa M, Zhang G, Odonmajig P, Regdel D. 2011. Chemical and biological investigation of the *Agaricus silvaticus* Schaeff ex. Secr. *Mongolian Journal of Chemistry*. 12: 92-97.
- Nomani AZ, Nabi Z, Rashid H, et al. 2014. Osmotic nephrosis with mannitol: review article. *Renal Failure*. 36(7): 1169-1176.
- Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A. 2014. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15: 4745-4751.

- Oh HT, Kim SH, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS. 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*). *Toxicology*. 22: 1484-1488.
- Osborne CK. 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 51(3): 227-238.
- Otsuka Y, Masayuki I, Masaru Y, Shigeno S, Kagumi U, Kazutaka K, Yoshimitsu A, Junichi M. 2002. Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production in gingival fibroblasts from individuals with Down syndrome. *Mechanism Development*. 123: 663-674.
- Ouyang YY, Zhang Z, Cao YR, et al. 2013. Effect of cordyceps acid and cordycepin on the inflammatory and fibrogenic response of hepatic stellate cells. *Chinese Journal of Hepatology*. 21(4); 275–278.
- Pan SY, Zhou SF, Gao SH, Yu ZL, Zhang SF, Tang MK, Sun JN, Ma DL, Han YF, Fong WF, Ko KM. 2013. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013, 1-26.
- Park SY, Jung SJ, Ha KC, Sin HS, Jang SH, Chae HJ, Chae SW. 2015. Anti-inflammatory effects of *Cordyceps* mycelium (*Paecilomyces hepiali*, CBG-CS-2) in Raw264.7 murine macrophages. *Orient Pharm Exp Med*. 15(1):7–12.
- Patel TK, Williamson JD. 2016. Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. *Trends in Plant Science*. 21(6): 486-497.
- Potekhina NV, Shashkov AS, Evtushenko LI, Gavrish EU, Senchenkova SN, Stomakhin AA, Usov AI, Naumova IB, Stackebrandt E. 2003. A novel mannitol teichoic acid with side phosphate groups of *Brevibacterium* sp. VKM Ac- 2118. *European Journal of Biochemistry*. 270: 4420–4425.
- Qian GM, Pan GF, Guo JY. 2012. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research*. 26(24): 2358–2362.
- Sahmeddini MA, Zahiri S, Khosravi MB, Ghaffaripour S, Eghbal MH, Shokrizadeh S. 2014. Effect of mannitol on postreperfusion cardiac output and central venous oxygen saturation during orthotopic liver transplant: a double-blind randomized clinical trial. *Progress in Transplantation*. 24(2): 121–125.
- Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M. 2006. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblast. *Life Sciences*. 78: 2012-2018.
- Sprecher M, Sprinson DB. 1963. A reinvestigation of the structure of 'cordycepic acid'. *J Org Chem*. 28: 2490–2491.

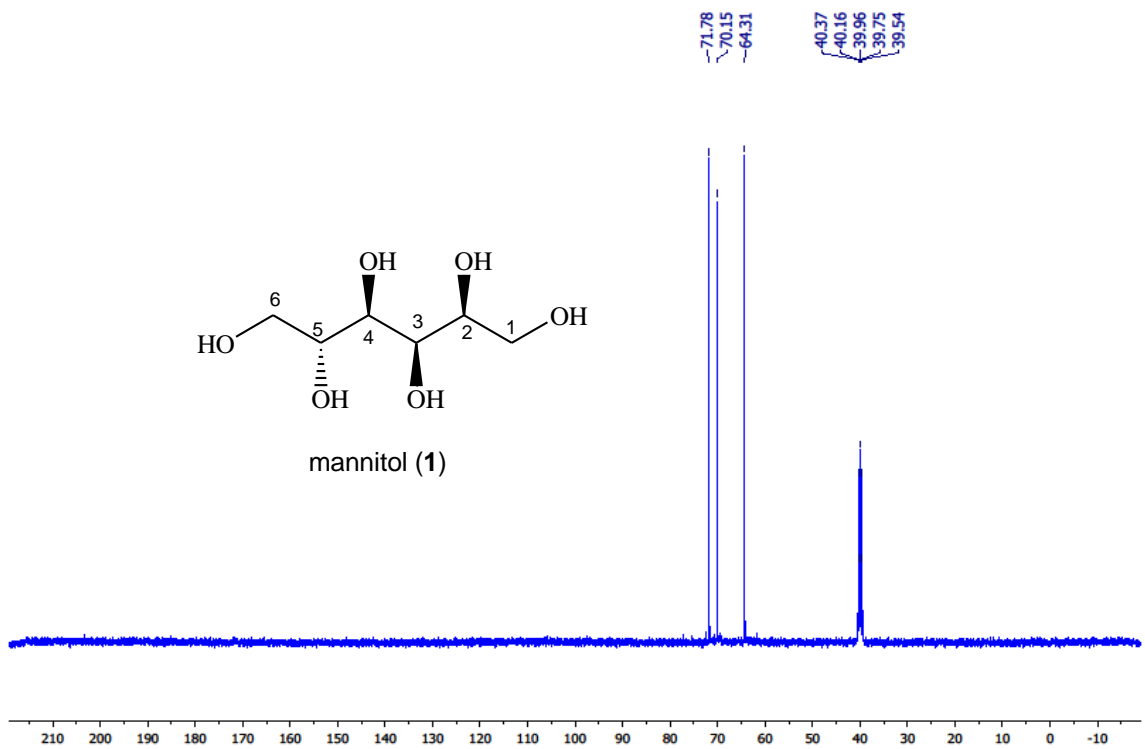
- Srikram A, Supapvanich S. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. *Agriculture and Natural Resources*. 50(2016); 432-436.
- Sripanidkulchai B, Junlatat J, Wara-aswapati N, Hormdee D. 2009. Antiinflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 124: 566-570.
- Stevenson S, Thornton J. 2007. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging*. 2: 283-97.
- Stevenson S, Taylor AH, Meskiri A, Sharpe DT, Thornton MJ. 2008a. Differing responses of human follicular and nonfollicular scalp cells in an in vitro wound healing assay: effects of estrogen on vascular endothelial growth factor secretion. *Wound Repair Regen*. 16: 243-53.
- Stevenson S, Nelson LD, Sharpe DT, Thornton MJ. 2008b. 17beta-estradiol regulates the secretion of TGF- $\beta$  by cultured human dermal fibroblasts. *J Biomater Sci Polym Ed*. 19: 1097-1109.
- Stevenson S, Sharpe DT, Thornton MJ. 2009. Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an *in vitro* wounding assay. *Exp Dermatol*. 18: 988-990.
- Storz P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 10: 1881-1896.
- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. 2003. Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 29-34.
- Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect Biol Med*. 49(2): 159-70.
- Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*. 3: 276-284.
- Tan YH, Moore D. 1994. High concentrations of mannitol in the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *Microbios*. 79: 31 -35.
- Thornton MJ. 2002. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol*. 11: 487-502.
- Thornton MJ. 2005. Oestrogen functions in skin and skin appendages. *Expert Opin Ther Targets*. 9: 617-629.
- Thornton MJ. 2013. Estrogens and aging skin. *Dermato-Endocrinology*. 5(2): 264-270.
- Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault JM, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. 2003. IL-1 $\beta$  induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 $\beta$  and IL-6 in human tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 21: 256-264.
- Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallese EM. 2005. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunological Reviews*. 208: 228-251.

- Waris G, Ahsan H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*. 5: 14.
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Apply Microbiology and Biotechnology*. 60: 258-274.
- Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT. 2006. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *British Journal of Pharmacology*. 148: 216-225.
- Wong RSY. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 30:87; 1-14.
- Yoon JY, Kim JH, Baek KS, Kim GS, Lee SE, Lee DY, Choi JH, Kim SY, Park HB, Sung GH, Lee KR, Cho JY, Noh HJ. 2015. A direct protein kinase B-targeted anti-inflammatory activity of cordycepin from artificially cultured fruit body of *Cordyceps militaris*. *Pharmacogn Mag*. 11(43): 477-485.
- Zhong JJ, Xiao JH. 2009. Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction. In: *Biotechnology in China I from Bioreaction to Bioseparation and Bioremediation*. 113: 79-150.
- Zhou X, Gong Z, Su Ying, Lin J, Tang K. 2009. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61: 279-291.

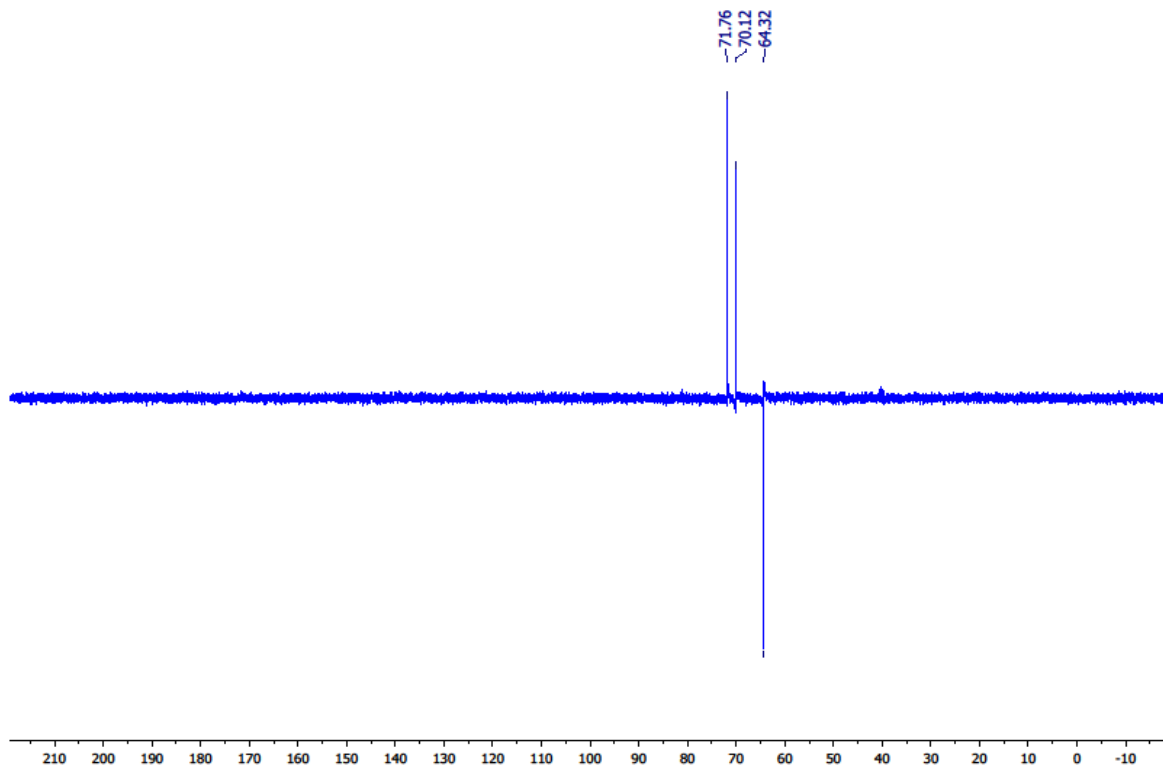
ภาคผนวก



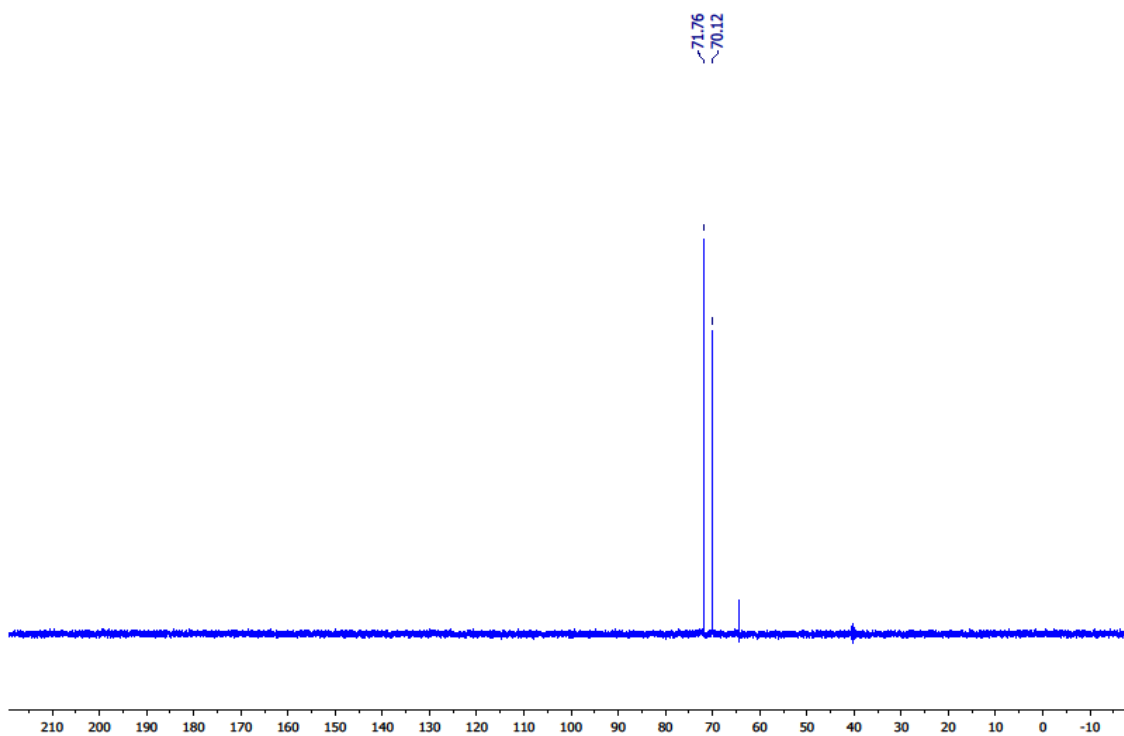
ภาพผนวกที่ 1 แสดง  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ( $\text{DMSO}-d_6$ ) spectrum ของ compound 1



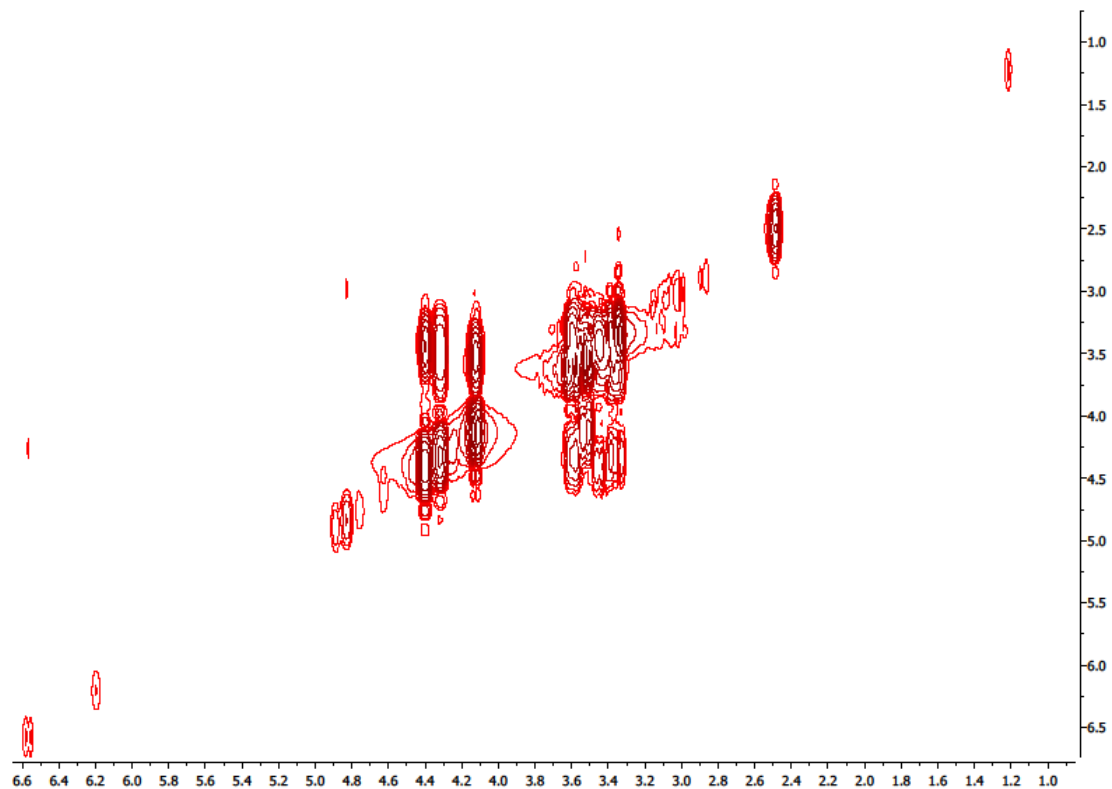
ภาพผนวกที่ 2 แสดง  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) ( $\text{DMSO}-d_6$ ) spectrum ของ compound 1



ภาพผนวกที่ 3 แสดง DEPT 135<sup>o</sup> (DMSO-*d*<sub>6</sub>) spectrum ของ compound 1



ภาพผนวกที่ 4 แสดง DEPT 90<sup>o</sup> (DMSO-*d*<sub>6</sub>) spectrum ของ compound 1

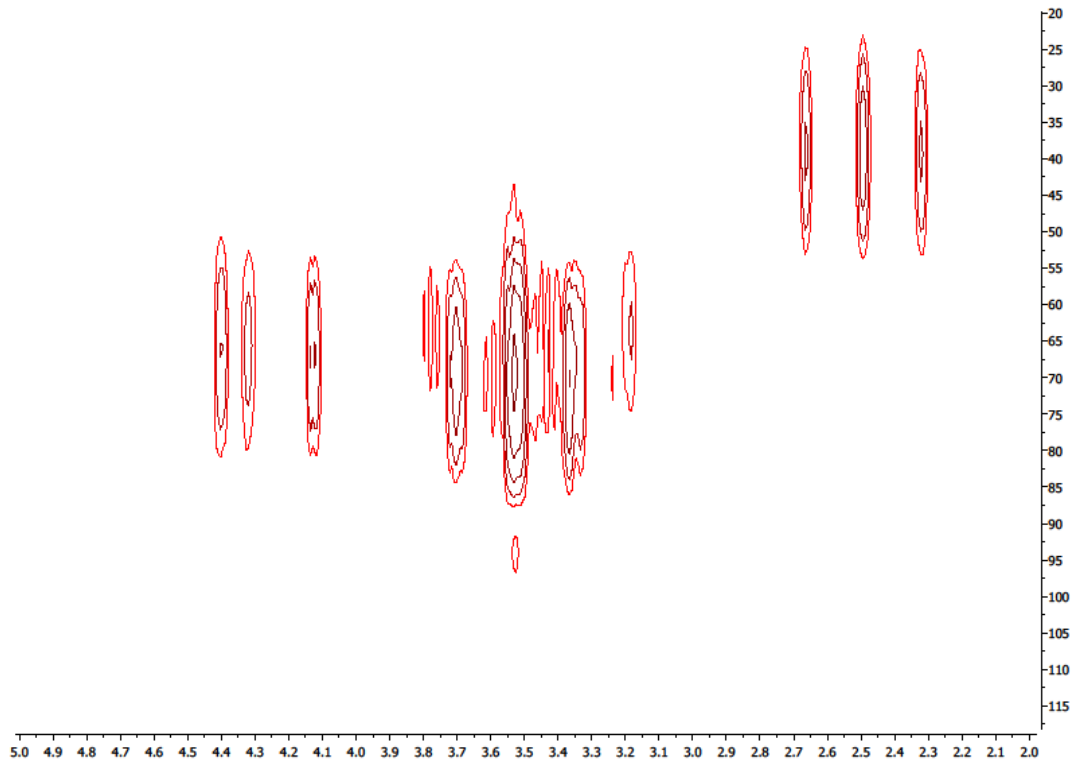


ภาพผนวกที่ 5 แสดง 2D COSY (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1

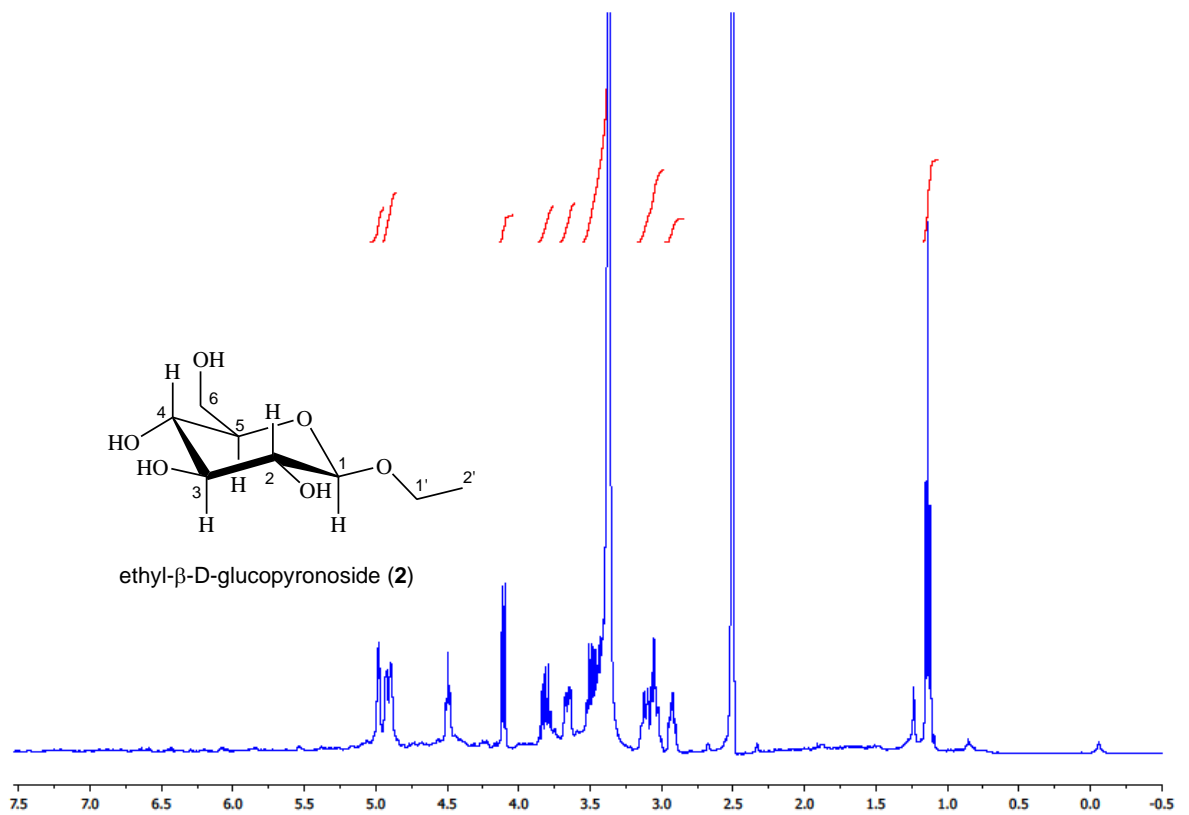


ภาพผนวกที่ 6 แสดง 2D HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1

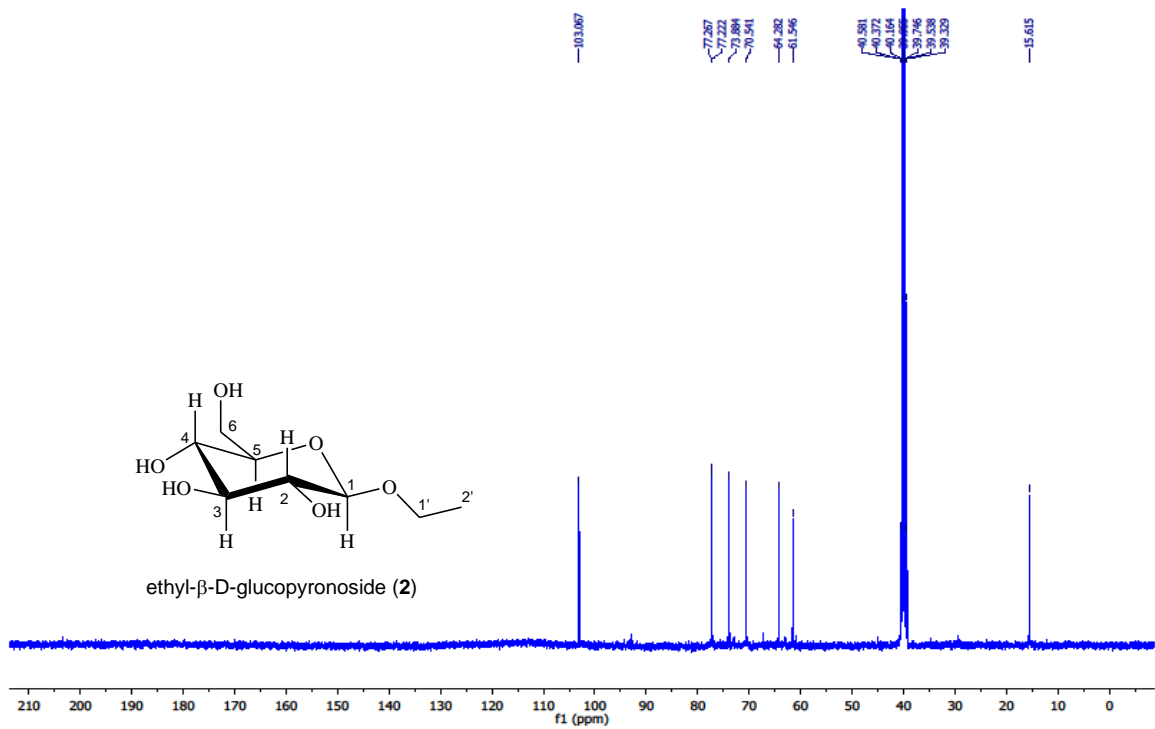




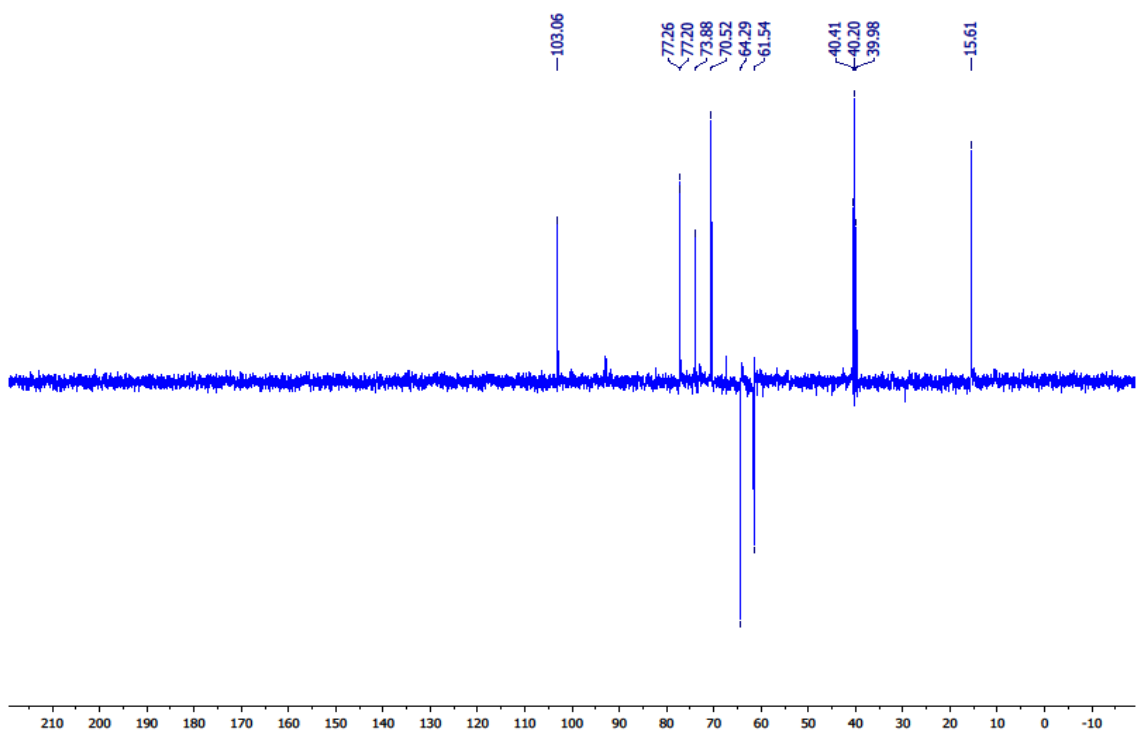
ภาพผนวกที่ 7 แสดง 2D HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 1



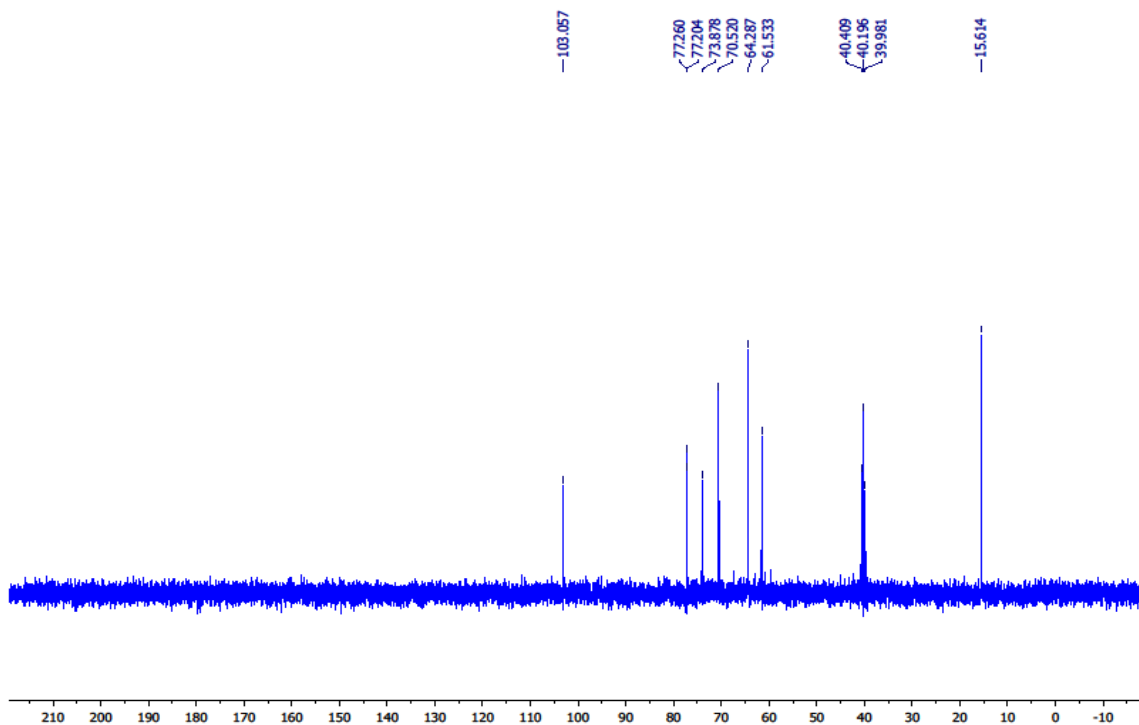
ภาพผนวกที่ 8 แสดง  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2



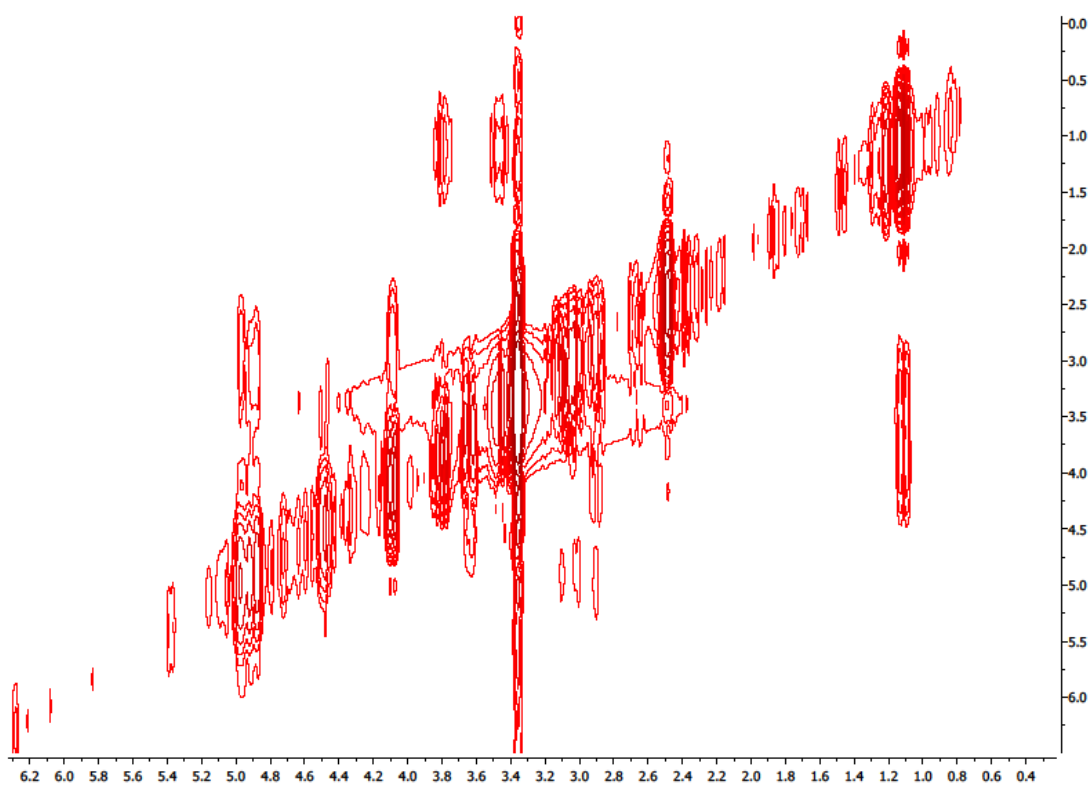
ภาพผนวกที่ 9 แสดง  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) ( $\text{DMSO-}d_6$ ) spectrum ของ compound 2



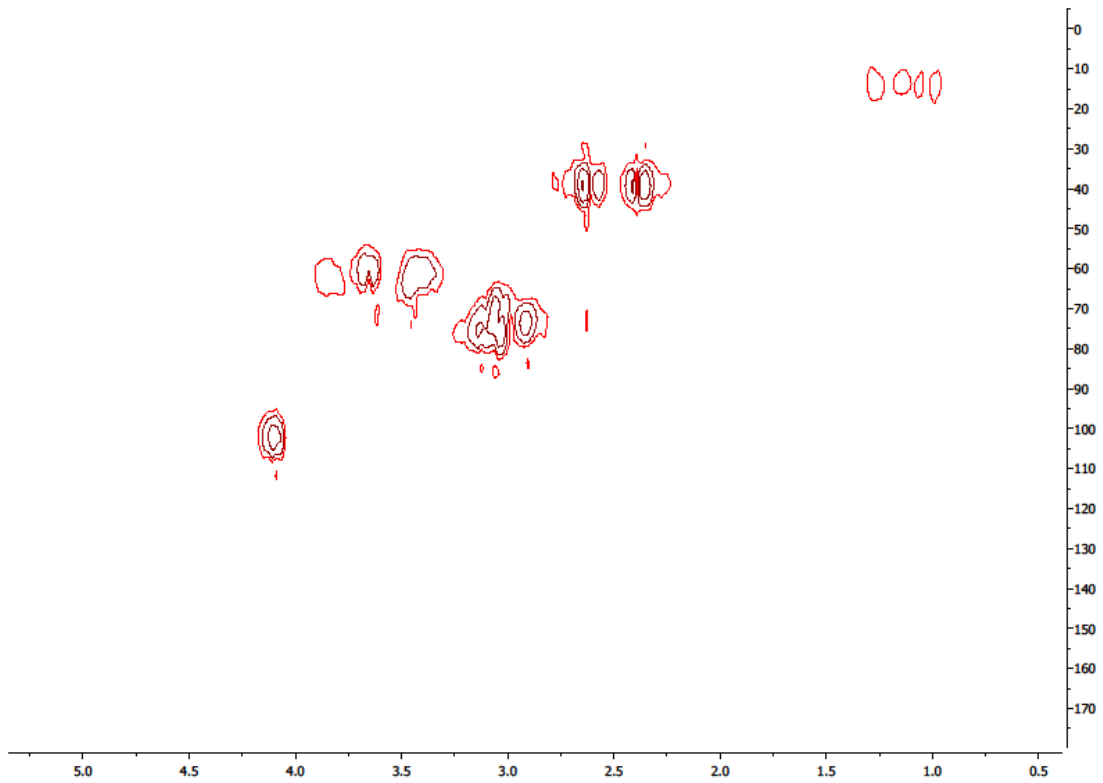
ภาพผนวกที่ 10 แสดง DEPT  $135^\circ$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) spectrum ของ compound 2



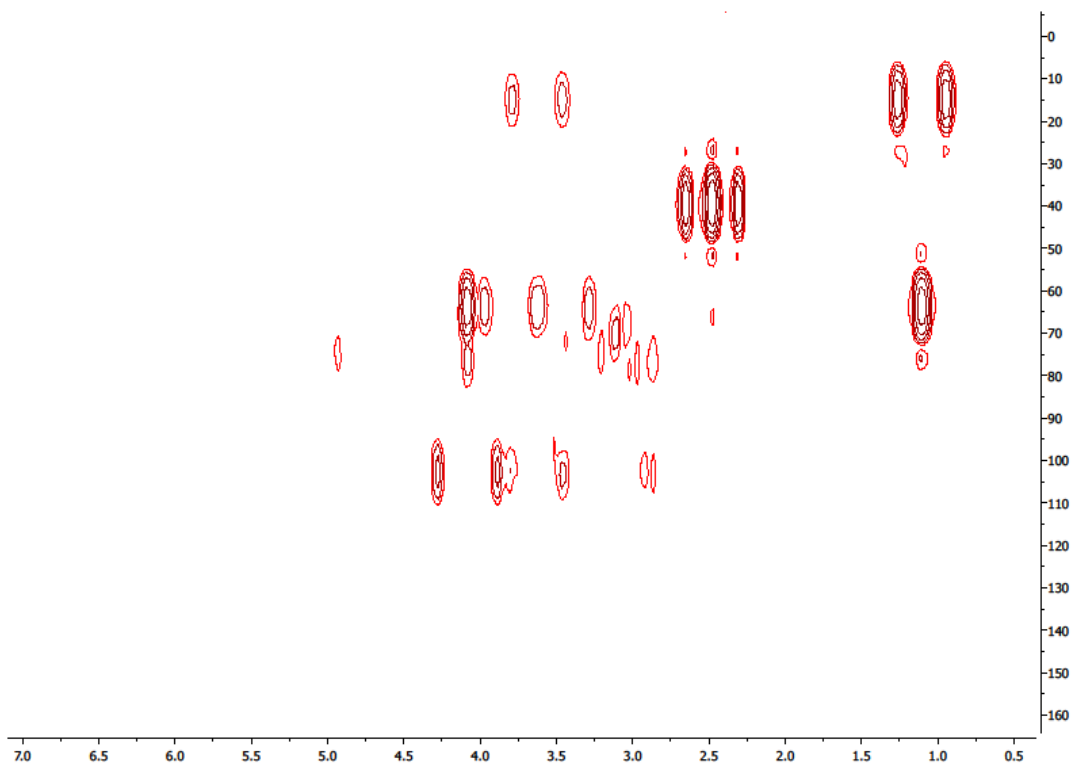
ภาพผนวกที่ 11 แสดง DEPT 90° (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2



ภาพผนวกที่ 12 แสดง 2D COSY (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2



ภาพผนวกที่ 13 แสดง 2D HMQC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2



ภาพผนวกที่ 14 แสดง 2D HMBC (DMSO- $d_6$ ) spectrum ของ compound 2

ประวัตินักวิจัยและคณะ

## ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. นีรามัย ฟางกระโทก  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Niramai Fangkrathok, Ph.D.
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 332020000XXXX
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

## 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ต. วัฒนานคร อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว 27160 โทรศัพท์/โทรสาร 037-261559-60 โทรศัพท์มือถือ 083-1477567, 088-0243168  
e-mail: niramai@buu.ac.th

## 5. ประวัติการศึกษา

| คุณวุฒิ                         | ปี พ.ศ.ที่จบ | สถานศึกษา                         |
|---------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| วท.บ. (จุลชีววิทยา)             | 2542         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| วท.ม (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)   | 2546         | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  |
| ปร.ด. (วิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์) | 2555         | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

จุลชีววิทยา, เทคโนโลยีชีวภาพ, เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

## 7. หมายเลขนักวิจัยแห่งชาติ: 03-67647

## 8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### หัวหน้าโครงการวิจัย :

- ฤทธิ์ของสารสำคัญจากกระชายดำต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ประจำปีงบประมาณ 2552 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (400,000 บาท)
- การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังจากสารสกัดใบสาบเสือ ปีงบประมาณ 2557 จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
- การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากจุลสาหร่ายในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงของจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย (สนองพระราชดำรินโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี). 2558. จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพิกัดเกสร ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา ประจำปีงบประมาณ 2560 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

### ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญของพืชสมุนไพรในพื้นที่โคกภูตากา (โครงการภายใต้ชุดแผนงานวิจัยการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่โคกภูตากา อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น งบอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2549 มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
2. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2551 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
4. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ของเส้นใยและดอกเห็ดกระด้าง ประจำปีงบประมาณ 2553 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอางเพื่อเพิ่มมูลค่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีสีโดยการปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
6. โครงการการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมของสมุนไพรวงศ์คาร์เดียซีในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
7. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ปกป้องเนื้อเยื่อประสาท และการพัฒนามาตรฐานของสารสกัดโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเซตจากข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีสี ประจำปีงบประมาณ 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
8. องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
9. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาตำรับปลิวี อาโป วาโย ต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูแรทที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซซิน ประจำปีงบประมาณ 2560 จากกรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก (679,374 บาท)
10. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาตำรับปลิวี อาโป วาโย ต่อหนูแรทที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะเบาหวานด้วยสเตรปโตโซซิน ประจำปีงบประมาณ 2560 จากกรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก (379,374 บาท)
11. การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ ฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง ประจำปีงบประมาณ 2560 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น (1,200,000 บาท)

12. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดเห็ดเพื่อเสริมความจำ ประจำปีงบประมาณ 2561 จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (1,361,000 บาท)

## 9. ผลงานวิจัย:

### ผลงานตีพิมพ์:

Niramai Fangkrathok, Suwanee Deeharing, Waraporn Petshri, Jantana Yahauyai, Jannarin Nontakham, Pongpun Siripong, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidant and Antityrosinase Activities of *Cochlospermum regium* Twig, Petal and Leaf Extracts. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2017; 41(5<sup>th</sup> IPNaCS Conference Issue): 13-16.

Jintana Junlatat, Pokpong Prayong, Pitchanan Thiantongin, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidative and anti-inflammatory activity effects of *Datura metel* leave extract. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2017; 41(5<sup>th</sup> IPNaCS Conference Issue): 33-36.

Niramai Fangkrathok, Orapun Yodsaoue, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai, Sunan Jaisamut. Inhibitory effect of D-mannitol isolated from mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells. **Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University**. 2017: Special issue September 2017; 1-6.

Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. *In vitro* bioactivity evaluation of ethanolic extract of *Cladogynos orientalis* leaves: Antioxidation, antimelanogenesis and antiinflammation. **Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University**. 2017: Special issue September 2017; 180-186.

Orapun Yodsaoue, Sirilak Kamonwannasit, Niramai Fangkrathok. Antioxidant and anticancer activities of *Buchanania siamensis* stem and leaf extracts. **Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University**. 2017: Special issue September 2017; 13-17.

Chokchai Chuangchot, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai, Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok. Antibacterial and antioxidant activity of *Rafflesia kerrii* extract against multidrug-resistant bacteria. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 2017: 39(2); 163-170.

Catheleeya Mekjaruskul, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Acute toxicity investigation of polysaccharide extracts of *Lentinus polychrous* in rats. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 2015: 34(4); 433-439.

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of extracts from *Phyllanthus emblica* branches. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 2014: 36(6); 669-674.

Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi, Bungorn Sripanidkulchai. Cytotoxic and immunomodulatory effects of polyhydroxyoctane



- isolated from *Lentinus polychrous* mycelia. **Journal of Natural Medicines**. 2014; 68(2); 302-309.
- Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013; 147(3); 631-637.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. **Natural Product Research**. 2013; 27(18): 1611-9
- Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkratok, Jintana Junlatat, Kittisak Sripanidkulchai. Antioxidative Activity and Antimutagenicity of Three Plants in Annonaceae in Plant Genetics Conservation at Khok Phutaka, Amphur Phuwiang, Khon Kaen. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2008; 4(2); 104-112.
- Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Praumjit Saralamp, Noppamas Soon thornchareonnon. Mutagenicity and Antimutagenicity tests of extracts from Thai traditional medicines. **J KKU Res**. 2007; 12(4): 492-8.
- Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Julatat, Kittisak Sripanidkulchai. Contamination of microbials and heavy metals in Thai herbal medicine produced in five ampores of Khon Kaen province. **J KKU Res**. 2007; 12(4): 499-507.

#### **การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ:**

- Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tatavasart, Jintana Junlatat, Niramai Jindakul, Wanna Sirisangtrakul. Antimutagenicity of extracts from dark and pale color rhizomes of *Kaempferia parviflora*. 10<sup>th</sup> World Congress on Clinical Nutrition (WCCN) 2004, Phuket, Thailand. p61.
- Niramai Fangkrathok, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Cratoxylum formosum*. The 3<sup>rd</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2008. China. p73-78.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tattawasart. Antiviral and immunomodulating effects of *Glochidion coccineum*. 1<sup>st</sup> Annual Northeast Pharmacy Research Conference 2009. Khon Kaen, Thailand. 9-10 Feb 2009. p61-64.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Biological activities of ethanolic extract from *Lentinus polychrous* mycelia. The 4<sup>th</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional

- Medicine and Natural Health Products. 2010. Khon Kaen. Thailand. 11-13 July 2010. p120-125.
- Niramai Fangkrathok, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) activity of five selected plants from Khon Kaen Province, Thailand. The 5<sup>th</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2012. China. 17- 20 Sep 2012. p49-53. (Very good oral presentation award).
- Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Julatat, Kittisak Sripanidkulchai. Contamination of pathogenic microorganism and heavy metals in Thai traditional medicines produced in Khon Kaen province. 1<sup>st</sup> International Conference on Natural Product for Health and Beauty (NATPRO1) 2005, Mahasarakarm, Thailand. p168.
- Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tatavasart, Niwat Sanoamuang, Niramai Fangkrathok, Darunee Juntaviset. Immunomodulating activity of Thai edible and medicinal mushroom mycelial extracts on Balb/cA mouse immunity in vitro. 1<sup>st</sup> Sino -Thai Conference on Traditional medicine and Natural Health Product 2006, China. p153-8.
- Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Khaetthareeya Sutthanut. Anti-cancer and immunomodulatory effects of *Kaempferia parviflora* in mitogen-stimulated murine spleen cells. 5<sup>th</sup> International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal transduction and drug effect (IRS2007) 2007, Japan. p107.
- Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Rakngan W. Antioxidative and anticancer activities of Thai black glutinous and brown rice bran. The 2<sup>nd</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Natural Products. Thailand. 2-6 December 2007. p 251-5.
- Fangkrathok N., Sripanidkulchai B, Sanoamuang N. Effects of local mushroom extracts on nitric oxide production, iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells. Commission on Higher Education Congress I, University staff Development Consortium. Thailand. p 113.
- Sripanidkulchai B, Rakngan W, Soahar C, Fangkrathok N, Khamkeaw P, Julatat J. Mutagenic, antimutagenic and antioxidative activity of *Glochidion coccineum*. The 3<sup>rd</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2008. China. P13-18.
- Fangkrathok N., Sripanidkulchai B., Rakngan W., Soaha C., Khamkeaw P., Julatat J. Naresuan Phayoa Journal, Vol 1, Suppl 1, 2008 : Antioxidative and antimutagenic activities of *Dalbergia darlacensis*. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO2). 17-19 December 2008. Thailand. p227.

- Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. Anti-cancer and anti-viral activities of *Lentinus polychrous* extracts. Commission on Higher Education Congress II, University staff Development Consortium. Thailand. 27-29 Aug 2009. p 217.
- Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. and Sripanidkulchai K. Anticancer activity of *Kaempferia parviflora* extract and its constituents against breast cancer cells. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO3), Bangkok, Thailand, 16-18 March 2011. P124.
- Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. and Sripanidkulchai K. Mutagenicity and anti-mutagenicity of *Erythrophleum succirubrum* extract. The Physiological Society of Thailand International Conference, Khon Kaen, Thailand, 2-4 May 2011. P137.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi. Steroidal constituents from mycelia of Thai local edible mushroom, *Lentinus polychrous*. The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy (Tokyo, 2011). September 24-25, 2011. Tokyo, Japan. p276.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Immunorestitution of *Lentinus polychrous* mycelial extract on immunocompromised model in in vitro. 1<sup>st</sup> ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. Chiang Mai, Thailand. 1-2 March 2012. pHS-255-HS259. (Excellent poster presentation award).
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Screening of mutagenic and anti-mutagenic activities of six selected plants from Chaiyapoom Province, Thailand. The 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO4). 28-30 Nov 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Antimicrobial activities of *Catimbiium speciosum* extract. Thai resources: Bring the best Thai things to the world. 21-23 Dec 2013. p95-96. Kanchanaburi, Thailand.
- Kittisak Sripanidkulchai, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat. Study of anti-cancer activity against breast cancer of Anacardiaceae plants. Thai resources: Bring the best Thai things to the world. 21-23 Dec 2013. P34-35. Kanchanaburi, Thailand.
- Panjapa Kolakul, Niramai Fangkrathok, Plearn Kammungkun, Ploykwan Kranjanasurat, Bungorn Sripanidkulchai. Antimicrobial effects of Thai Plants against Acne-induction bacteria. The 5<sup>th</sup> Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013 "Pharmacy Profession:

- Moving Forward to ASEAN Harmonization”. 16-17 Feb 2013. Mahasarakarm, Thailand. p34.
- Niramai Fangkrathok, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi, Bungorn Sripanidkulchai. Immunosuppressive effect of five ergosterols isolated from *Lentinus polychrous* mycelial extract and theirs *in vitro* cytotoxicity. 5<sup>th</sup> FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2014. 13-16 April 2014. Melbourne, Australia.
- Niramai Fangkrathok, Kittisak Sripanidkulchai, Bungorn Sripanidkulchai. Mutagenic and antimutagenic activities of two plant extracts from Euphobiaceae. 5<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5). 6-8 May 2014. p167. Phuket, Thailand.
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. In vitro mutagenic and antimutagenic effects of *Diosyros castanea* brance and leaf extracts. 6<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21-23 Jan, 2016. p132-135. Khon Kaen, Thailand.
- Catheleeya Mekjaruskul, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidative and anticancer activities of selected microalgae extracts isolated from East coast of Thailand. 6<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21-23 Jan, 2016. p146-149. Khon Kaen, Thailand.
- นิรามัย ผางกระโทก, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย และบังอร ศรีพานิชกุลชัย. (๒๕๕๙).ฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นเปลือยเลือดและแสนคำ. ใน การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ “การประชุมวิชาการ ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ ๗” (หน้า ๓๖๖-๓๗๐). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (“Thai Resources: Review Our Own Assets. 24-26 มีนาคม 2559)
- Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Immunosuppressive effect of *Lentinus polychrous* mycelial extract on T helper 1 differentiation. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Pharma-Food (ICPF 2016). November 17-18, 2016 Shizuoka, Japan. p148.
- Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-inflammatory and antioxidant activities of Pi-Kad-Ka-Sorn-5 herbal tea extracts. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Pharma-Food (ICPF 2016). November 17-18, 2016 Shizuoka, Japan. p117.
- Niramai Fangkrathok. Effects of *Chromolaena odorata* leaf extracts and its gel formulation on acne causative bacteria. 2<sup>nd</sup> International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. 25-27 Jan 2017. Bangkok, Thailand. p218-223.
- Kanyarat Peng-ngummuang, Jintana Junlatat, Gunnanut Thapsuriyanon, Rattanaporn Ainthanam, Suparat Rahotan, Angsana Meemoe, Niramai Fangkrathok, Bungorn

Sripanidkulchai. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of Thai herbal teas. 2<sup>nd</sup> International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. 25-27 Jan 2017. Bangkok, Thailand. p357-364.

Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat, Monthaka Teerachaisakul, Wiwan Worakunphanich, Bungorn Sripanidkulchai. Inhibitory effect of a traditional herbal formulary, Deph-Rungsith, extract on in vitro model of psoriasis. 1<sup>st</sup> International Conference of Innovation of Functional Foods in Asia (IFFA) 2018. 22-24 Jan 2018. Phayao, Thailand. p134.

Niramai Fangkrathok, Kamonwan Bancheun, Nitapa Inchai, Duangkeaw Panyapu. Bungorn Sripanidkulchai. Effect of Pathavi Apo Vayo formulary extract on activation of RAW264.7 macrophages in normal and high glucose medium. 1<sup>st</sup> International Conference of Innovation of Functional Foods in Asia (IFFA) 2018. 22-24 Jan 2018. Phayao, Thailand. p142.

Jintana Junlatat, Orapun Yodsaoue, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Inhibitory effect of mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* extract on COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW 264.7 macrophage cells. 1<sup>st</sup> International Conference of Innovation of Functional Foods in Asia (IFFA) 2018. 22-24 Jan 2018. Phayao, Thailand. p120.

## ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอรพรรณ ใจสมุทร

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Orapun Jaisamut

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 140050001XXXX

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ต. วัฒนานคร อ.

วัฒนานคร จ. สระแก้ว 27160 โทรศัพท์/โทรสาร 0-3810-2222 ต่อ 4053

โทรศัพท์มือถือ 086-746-5117 e-mail: [orapun@buu.ac.th](mailto:orapun@buu.ac.th)

## 5. ประวัติการศึกษา

| คุณวุฒิ              | ปี พ.ศ.ที่จบ | สถานศึกษา                               |
|----------------------|--------------|---|
| วท.บ. (เคมี)         | 2549         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| วท.ม (เคมีอินทรีย์)  | 2551         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| ปร.ด. (เคมีอินทรีย์) | 2556         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เคมี เคมีอินทรีย์ เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ purification, elucidation, spectroscopy

## 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### 7.1. หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.1.1. โครงการวิจัยเรื่อง Chemical constituents from stems of *Artocarpus lakoocha* Roxb งบอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2556 จากคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

7.1.2. โครงการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7.1.3. โครงการวิจัยเรื่อง anti-inflammatory activity from *Centella asiatica* (L.) Urb. leaf extract for application at commercial level งบประมาณ 2561 จากคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

### 7.2. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Cheenpracha, S., Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., Tewtrakul, S. and Kanjana-Opas, A. Potential anti-allergic ent-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. *Phytochemistry*, 2006, 67, 2630–2634.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Fun, H.-K. and Kanjana-Opas, A. Phanginin A-K, diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Phytochemistry*, 2008, 69, 1242–1249.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., and Tewtrakul, S. Anti-allergic activity of principles from the roots and heartwood of *Caesalpinia sappan* on antigen-induced  $\beta$ -hexosaminidase release. *Phytother. Res.*, 2009, 23, 1028–1031.

- Yodsaoue, O.**, Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*, 2010, 71, 1756–1764.
- Fun, H.-K., **Yodsaoue, O.**, Karalai, C. and Chantrapromma, S. Absolute configuration of isovouacapenol C. *Acta Cryst.*, 2010, E66, o2059–o2060.
- Fun, H.-K., **Yodsaoue, O.**, Chantrapromma, S. and Karalai, C. Absolute configuration of vouacapen-5- $\beta$ -ol. *Acta Cryst.*, 2010, E66, o2166–o2167.
- Fun, H.-K., Chantrapromma, S., **Yodsaoue, O.** and Karalai, C. Absolute configuration of odorine. *Acta Cryst.*, 2010, E66, o2437–o2438
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Cheenpracha, S., **Yodsaoue, O.**, Karalai, C. and Ponglimanont, C. Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E2 releases. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 133, 63–66.
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Pulcherrins D–R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Tetrahedron*, 2011, 67, 6838–6846.
- Yodsaoue, O.**, Sonprasit, J., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaiia odorata*. *Phytochemistry*, 2012, 76, 83–91.
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical constituents from the heartwood and roots of *Caesalpinia sappan*.: PERCH-CIC Congress V. Jomtein Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. 6-9 May 2007. (Poster)
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*.: The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand, Walailak University, Nakhon si thammarat, Thailand. 18-20 October 2007. (Poster).
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C., Ponglimanont, C. and Tewtrakulb, S. Anti-Inflammatory Constituents from the Roots of *Caesalpinia mimosoides*.: PERCH-CIC Congress VI. Jomtein Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. 3-6 May 2008. (Poster)
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical Constituents from the Seeds of *Caesalpinia sappan* Linn.: The 6th regional IMT-GT UNINET conference 2008. The Gurney resort hotel, Penang, Malaysia. 28-30 August 2008. (Oral)
- Yodsaoue, O.**, Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakulb, S. and Chantrapromma, S. Anti-inflammatory constituents from the roots of *Caesalpinia mimosoides*.: Commission on Higher Education Congress III: University Staff Development Consortium CHE-USDC Congress III. A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Chonburi, Thailand. 9-11 August 2010. (Poster)
- Yodsaoue, O.** Chemical Constituents from the Stems of *Artocarpus lakoocha* Roxb. SRU National conference 11<sup>th</sup>. October 29 – 30, 2015. Suratthani Rajabhat University. (Poster)

- Yodsaoue, O.** and Jaisamut, S. Chemical constituents from the tubers of *Tacca leontopetaloides*. 11<sup>th</sup> national graduate research conference NGRC 2017. December 16th, 2017. Udon Thani Rajabhat University (Poster)
- Junlatat, J.; **Yodsaoue, O.**; Sripanidkulchai, B.; Fangkrathok, N. Inhibitory Effect of Mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* extract on COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW264.7 macrophage cells. The first international conference on innovation of functional foods in Asia, IFFA 2018. January 22nd – 24th, 2018. University of Phayao, Phayao, Thailand. (Poster)
- Fangkrathok, N.; **Yodsaoue, O.**; Junlatat, J.; Sripanidkulchai, B.; Jaisamut, S. Inhibitory Effect of D-Mannitol Isolated from Mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-Induced Inflammation of RAW264.7 Cells. Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University : Special Issue September 2017 (TCI1). p 1-6.
- Yodsaoue, O.**; Sirilak Kamonwannasit, S.; Fangkrathok, N. Antioxidant and Anticancer Activities of *Buchanania siamensis* Miq. Stem and Leaf Extracts. Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University : Special Issue September 2017 (TCI1). p 13-17.



## ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวจินตนา จุลทัศน์  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Jintana Junlatat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3415 01254 21 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

## 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี  
เลขที่ 2 ถนนแจ้งสนิท ตำบลในเมือง อำเภอเมือง อุบลราชธานี 34000  
โทรศัพท์ 0-4535-2000 ต่อ 4300, 4302 / 092-3546249  
โทรสาร 0-4547-4051  
E-mail: plara\_jin@hotmail.com

## 5. ประวัติการศึกษา

| คุณวุฒิ                                  | ปี พ.ศ.ที่จบ | สถานศึกษา                         |
|--|--------------|-----------------------------------|
| วท.บ. (ชีววิทยา)                         | 2546         | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| วท.ม (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์<br>ธรรมชาติ) | 2550         | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| ปร.ด. (วิจัยและพัฒนาเภสัช<br>ภัณฑ์)      | 2557         | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Herbal medicine, Standard of herbal medicine, Instrument for pharmaceutical sciences, Biological activity, Animal and plant cell cultures, Standard of Laboratory (ISO/IEC 17025)

## 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### 7.1 การตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

อรุณศรี ปรีเปรม, บังอร ศรีพานิชกุลชัย, **จินตนา จุลทัศน์**, ผดุงขวัญ จิตโรภาส. Heavy Metals in Some Thai Traditional Drugs and Herbal Extracts. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2(1), January-June, 2006.

บังอร ศรีพานิชกุลชัย, สุธาสินี พิษณุวศิน, ผดุงขวัญ จิตโรภาส, เดชพล ปรีชากุล, **จินตนา จุลทัศน์**. ลักษณะของผงวุ้นว่านหางจระเข้เมื่อเตรียมโดยวิธีสเปรย์ดราย. วารสารวิจัย มข. ปีที่ 12 ฉ.1 มกราคม-มีนาคม 2550.

บังอร ศรีพานิชกุลชัย, นีรามัย ฝางกระโทก, **จินตนา จุลทัศน์**, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคและโลหะหนักในยาแผนโบราณไทยที่ผลิตใน 5 อำเภอของจังหวัดขอนแก่น. วารสารวิจัย มข. ต.ค.-ธ.ค. 2550; 12(4): 499-507.

บังอร ศรีพานิชกุลชัย, นีรามัย ฝางกระโทก, **จินตนา จุลทัศน์**, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพรรักษา 3 ชนิดในวงศ์ Annonaceae ในเขตอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชพื้นถิ่น

- โคกภูตากา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน (Isan Journal of Pharmaceutical Science, IJPS) ๕.ค. 2551; 4(2): 104-112.
- Sripanidkulchai B, **Junlatat J**, Wara-aswapati N and Hormdee D. 2009. Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 124. 566-570.
- Fangkrathok N, **Junlatat J** and Sripanidkulchai B. 2013. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. Journal of Ethnopharmacology. 147 (3): 631-637.
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Hair growth promoting effect of *Carthamus tinctorius* floret extract. Phytotherapy research. Accepted (18-Nov-2013) and published online in Wiley Online Library.
- Sripanidkulchai B and **Junlatat J**. Bioactivities of alcohol based extracts of *Phyllanthus emblica* branches: antioxidation, antimelanogenesis and anti-inflammation. J Nat Med. Accepted: 26 January 2014.
- Fangkrathok N, **Junlatat J**, Umehara K, Noguchi H and Sripanidkulchai B. Cytotoxic and immunomodulatory effects of polyhydroxyoctane isolated from *Lentinus polychrous* mycelia. J Nat Med. Accepted: 29 July 2013.
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Effect of plants used for hair treatment on dermal papilla cells proliferation. วารสารวิชาการหมอยาไทย ฉบับที่ 3 กรกฎาคม – ธันวาคม 2557 Volume 3 July – December 2014.
- จินตนา จุลทัศน์ และบังอร ศรีพานิชกุลชัย**. ผลของสารสกัดเปลือกต้นจันทน์ในการยับยั้งการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์. วารสารวิจัยหมอยาไทย
- จินตนา จุลทัศน์ และบังอร ศรีพานิชกุลชัย**. ฤทธิ์ต้านการสร้างเมลานินของสารสกัดใบมังคุดป่า. วารสารวิจัยหมอยาไทย
- Bunwijit J, Sripanidkulchai B, Pannangrong W, **Junlatat J** and Sripanidkulchai K. Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract of *Ocimum africanum* leaves. Songklanakarin Journal of Science and Technology.
- Werawattanachai N, Kaewanatawong R, **Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Anti-Inflammatory Potential of Ethanolic Bulb Extract of *Allium ascalonicum*. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่17 ฉบับที่2 พฤษภาคม – สิงหาคม 2558.

**Jintana J** and Sripanidkulchai B. Anti-melanin Production Effect of *Cratoxylum formosum* Bark Extract. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 10 (Supplement), January 2015.

Chokchai Chuangchot, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai, **Jintana Junlatat**, and Niramai Fangkrathok. Antibacterial and antioxidant activity of *Rafflesia kerrii* extract against multidrug-resistant bacteria. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 39 (2): 163-170, Mar.-Apr.2017.

**Jintana Junlatat** and Bungorn Sripanidkulchai. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Glochidion daltonii* branch extract. Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia. 3(1): 29-33, July 2016.

Niramai Fangkrathok, Suwanee Deeharing, Waraporn Petsri, Jantana Yahauyai, Jannarin Nontakham, Pongpun Siripong, **Jintana Junlatat**, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidant and Antityrosinase Activities of *Cochlospermum regium* Twig, Petal and Leaf Extracts. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. TJPS 2017. Supplement Issue.

**Jintana Junlatat**, Pokpong Prayong, Pitchanan Thiantongin, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Bioactivities of *Datura metel* Leaves Extract: Antioxidation, Hemorrhoids-Related Inflammatory Factors Inhibition. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. TJPS 2017. Supplement Issue.

**Jintana Junlatat**, Niramai Fangkrathok and Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidative and melanin production inhibitory effects of *Syzygium cumini* extracts. Songklanakarin Journal of Science and Technology. Accepted, *article inpress*

#### 7.2 การเผยแพร่ผลงานวิจัยในการงานประชุมวิชาการ

Sripanidkulchai B., Tattawasart U., **Junlatat J.**, Jindakul N., Sirisangtrakul W. Antimutagenicity of extracts from dark and pale color rhizomes of *Kaempferia parviflora*. The 10<sup>th</sup> World Congress on Clinical Nutrition, Thailand, Nov.30-Dec.3, 2004.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Hair growth promoting effect of *Carthamus tinctorius* floret extract RGJ Seminar Series No.86<sup>th</sup> Research and Development in Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KCU, Khon Kaen, Thailand. April 19, 2012.

**รางวัล: Outstanding Oral Presentation**

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. *In vitro* evaluation of hair growth potential of *Carthamus tinctorius* L. The 5<sup>th</sup> Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products, September 17-19, 2012, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, P.R.China. **รางวัล: Excellent Oral Presentation**)

- Junlatat J.,** Sripanidkulchai B., Taweechaisupapong S. and Wara-aswapati Charoen N. Effect of *Streblus asper* leaf extract on oral microbial and monocyte THP-1 cells. The 1<sup>st</sup> Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products (STCTMNHP), Nanning, Guangxi, P.R. China, Nov.12-19, 2006.
- Junlatat J.,** Sripanidkulchai B., Wara-aswapati Charoen N. and Hormdee D. Inhibition of COX-2 and IL-1 $\beta$  expression in monocytic THP-1 cells stimulated by LPS support the anti-inflammatory effect from *Streblus asper* leaf. The 5<sup>th</sup> International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects (IRS2007), Shizuoka, Japan, May. 10-11, 2007
- Junlatat J.,** Sunthonsart T., Amadee Peerachaheed P. and Sripanidkulchai B. Inhibitory effect of *Cissus quadrangularis* on TNF- $\alpha$  and COX-2 expression in monocytic THP-1 cells stimulated by LPS. The 2<sup>nd</sup> Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products (STCTMNHP), Khon Kaen, Thailand, Dec.2-6, 2007.
- Junlatat J.,** Chantuma R., Rukngan W., Soaha C. and Sripanidkulchai B. Antioxidant and anticancer activities of ethanolic extract of *Cladogynos orientalis* Zipp.Ex Span. The 3<sup>th</sup> Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products (STCTMNHP), Nanning, Guangxi, P.R. China, Oct.30-31, 2008.
- Junlatat J.,** Sunthonsart T., Amadee Peerachaheed P. and Sripanidkulchai B. Inhibitory effect of *Cissus quadrangularis* on iNOS and IL-1 $\beta$  expression in RAW 264.7 macrophage cells stimulated by LPS. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO), Phayao, Thailand, Dec.17-19, 2008.
- จินตนา จุลทัศน์,** บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์, นิรามัย ฝางกระโทก. การศึกษาความนิยมและความปลอดภัยของแกงฮีสาน. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี พ.ศ.2552. วันที่ 29 มกราคม 2552.
- Junlatat J.,** Fangkrathok N., Soahar C. And Sripanidkulchai B. Monograph of *Aganosma marginata* (Roxb.) G.Don and its potential antioxidative activity. The 4<sup>th</sup> Sino-Thai International Conference. Khon Kaen University, Thailand, July 11-13, 2010.
- Junlatat J,** Weerapreeyakul N, Sutthanut K and Sripanidkulchai B. Development of high antioxidative capacity and ready-to-eat soup products called “Aom Curry Soup”. The 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Thailand, Khon Kaen, Thailand, May 2-4, 2011.
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Safety evaluation of *Carthamus tinctorius* L. extract. The 1<sup>st</sup> International Conference, Patient Safety: From Product to Patient Care and Translational Research. Ubon Ratchathani University, Thailand. July 20-21, 2011.

- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Effect of *Carthamus tinctorius* floret extract on melanogenesis in B16 murine melanoma cells. The first Asean Plus Three Graduate Research Congress. Chiang Mai, Thailand. March 1-2, 2012. **รางวัล: Outstanding Poster Presentation)**
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Cytotoxicity and skin permeation studies of *Carthamus tinctorius* floret extract. The 1<sup>st</sup> International Conference on Pharma and Food, November 15-16, 2012, Nippondaira Hotel, ShiZuoka, Japan. **รางวัล: Poster Presentation Award)**
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Anthocyanin and melanogenesis stimulating effect of *Clitoria ternatea* L. and *Hibiscus sabdariffa* L. flower extract The 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty: Future Trends in Health Products: Safety and Effectiveness for All, November 28-30, 2012, Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Stimulation of melanogenesis by *Carthamus tinctorius* floret extract in B16F10 murine melanoma cells. ประชุมวิชาการ: ความงามตามธรรมชาติและสุขภาพดีผ่านวิถีวิทยาศาสตร์ความงาม. 25 มกราคม 2556. โรงแรมเซ็นทารา ขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Hair growth promotion, cytotoxicity and skin permeability evaluation of *Carthamus tinctorius* floret extract. ประชุมวิชาการ: ความงามตามธรรมชาติและสุขภาพดีผ่านวิถีวิทยาศาสตร์ความงาม. 25 มกราคม 2556. โรงแรมเซ็นทารา ขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. *Carthamus tinctorius* floret extract inhibited the expression of 5 $\alpha$ -reductase in dermal papilla cells and promoted hair growth in mice. 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, June 27-29, 2013, Haeundae Grand Hotel, Busan, Korea.
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย, ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์, **จินตนา จุลทัศน์**. การศึกษามาตรฐานและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์อะนาคาร์เดียซี. การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย นำสิ่งดีงามสู่ทั่วโลก. วันที่ 21-23 ธันวาคม 2556.
- Junlatat J**, Sripanidkulchai K and Sripanidkulchai B. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory evaluation of *Cladogynos orientalis* extract. 5<sup>th</sup> FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC), 13-16 April, 2014, Melbourne, Australia.
- Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Melanogenesis inhibitory effect of *Tetracera loureiri* bark extract. 5<sup>th</sup> Internaltional Conference on Natural Products for Health and Beauty: “Current Trends in Natural Products”, May 6-8, 2014, Movenpick Resort&Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Melanogenesis inhibitory effect of *Erythrophleum succirubrum* bark extract. The 2<sup>nd</sup> Sharing Teaching and Research Experience in International Education (STRE2014), August 13-14, 2014, Ree Hotel, Siem Reap, Cambodia.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Anti-inflammatory effect of *Dalbergia darlacensis* extract in rats and its molecular regulation. The 1<sup>st</sup> International Symposium on Traditional and Alternative Medicine under the Theme of “An Integration of Traditional Healing and Western Medicine”, December 15-16, Ubon Ratchathani, Thailand.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Monograph of *Erythrophleum succirubrum* Gagnep. and its potential anti-oxidative activity. The 1<sup>st</sup> International Symposium on Traditional and Alternative Medicine under the Theme of “An Integration of Traditional Healing and Western Medicine”, December 15-16, Ubon Ratchathani, Thailand.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Anti-melanin production effect of *Cratoxylum formosum* bark extract. The 1<sup>st</sup> International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM-2015), 28-30, 2015, Khon Kaen, Thailand.

**Junlatat J** and Sripanidkulchai B. Hair growth promoting effect of *Moringa oleifera* oil. The 6<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty “New Frontiers in Natural Products for Health&Longevity” (NATPRO6), January 21-23, 2016. Khon Kaen, Thailand.

Lakkam W, Chaitong R, Nisathon S, Promvong U, Sripanidkulchai B, **Junlatat J**. Chemical components of indigenous pigmented-fruits and its potential anti-tyrosinase activity. The 6<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty “New Frontiers in Natural Products for Health&Longevity” (NATPRO6), January 21-23, 2016. Khon Kaen, Thailand.

Wanna S, Sripanidkulchai B, Aldila F, Mahardiani A, **Junlatat J**. Antioxidant and antibacterial activities of *Wedelia trilobata* extract. The 6<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Health and Beauty “New Frontiers in Natural Products for Health&Longevity” (NATPRO6), January 21-23, 2016. Khon Kaen, Thailand

**จินตนา จุลทัศน์** และบังอร ศรีพานิชกุลชัย. การศึกษามาตรฐานและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชสองชนิดในสกุลเทอร์มินาเลีย STANDARD AND ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY OF TWO PLANTS IN *TERMINALIA*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ) ทรัพยากรไทย: หวนดูทรัพย์สิ่งสินตน. 15-17 ธันวาคม 2558. มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

Kanyarat Peng-ngummuang, **Jintana Junlatat**, Gunnanut Thapsuriyanoon, Rattanaaporn Ainthanam, Suparat Rahotan, Angsana Meemoe, Niramai Fangkrathok and Bungorn Sripanidkulchai. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of Thai herbal teas. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017 (HTM 2017): “Value-Added of Herbs and Phytotherapy: Challenges for the 21st Century” 25-27 January, 2017. Asia Hotel, Bangkok, Thailand.

**Jintana Junlatat** and Bungorn Sripanidkulchai. Inhibitory effect of Thai traditional hemorrhoids-treatment plants on COX-2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression in RAW 264.7 macrophage cells. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017 (HTM 2017): “Value-Added of Herbs and Phytotherapy: Challenges for the 21st Century” 25-27 January, 2017. Asia Hotel, Bangkok, Thailand.

**Jintana Junlatat**, Ananya Dechakhamphu, Pronkaran Somkhow and Thatsaneeya Laothong. The Quality of Student Life in Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University. The 4<sup>th</sup> Sharing Teaching and Research Experience in International Education (STRE2014), 2016, Lao PDR.

Pokpong Prayong, Ngampuk Tayana and **Jintana Junlatat**. Comparison yields of naringin extracted by modified method between Pommelo and Mandarin orange peel waste products. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Pharma and Food. November 16-18, 2016. Nippondaira Hotel, Shizuoka, Japan

**Jintana Junlatat**, Niramai Fangkrathok and Bungorn Sripanidkulchai. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of Pi-Kad-Ka-Sorn-5 herbal tea extracts. The 3<sup>rd</sup> International Conference on Pharma and Food. November 16-18, 2016. Nippondaira Hotel, Shizuoka, Japan

Niramai Fangkrathok, Orapun Yodsaoue, **Jintana Junlatat** and Bungorn Sripanidkulchai. Inhibitory effect of mannitol isolated from mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells. The 1<sup>st</sup> International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research. August 5-6, 2017, The Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand.

**Jintana Junlatat**, Niramai Fangkrathok and Bungorn Sripanidkulchai. *In vitro* bioactivity evaluation of ethanolic extract of *Cladogynos orientalis* leaves: antioxidation, antimelanogenesis and anti-inflammation. The 1<sup>st</sup> International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research. August 5-6, 2017, The Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand.

**Jintana Junlatat**, Ananya Dechakhamphu, Pronkaran Somkhow, Jiranan Kaewduegyai and Rattana Kingtong. The Study of Factor Affecting on Borders in Education of Thai Traditional Medicine Students at UBRU, Thailand. The 4<sup>th</sup> International Conference on Urban Studies, December 8-9 2017, Indonesia.

Kanyarat Peng-ngummuang, Sirinporn Srisanga, Ploythakarn Promsit, Kanocnutya Noiming and **Jintana Junlatat**. Development of exercise program to enhance the ability of student for study in Thai massage classroom: Considerations for promoting of traditional medicine education at national and international levels. The 4<sup>th</sup> International Conference on Urban Studies, December 8-9 2017, Indonesia.

Ananya Dechakhamphu, Nattapong Wongchum, Saran Chaweerak and **Jintana Junlatat**. Integrating project based learning for crossing border knowledge of traditional and modern medicine: evidence from classroom at UBRU. The 4<sup>th</sup> International Conference on Urban Studies, December 8-9 2017, Indonesia.

**Jintana Junlatat**, Orapun Yodsaoue, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Inhibitory effect of mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* extract on COX-2 and IL-1B mRNA expression in RAW264.7 macrophage cells. The 1<sup>st</sup> International Conference on Innovation of Functional Foods in Asia. January 22<sup>nd</sup>-24<sup>th</sup> 2018. Phayao, Thailand.

### 7.3 ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

#### หัวหน้าโครงการวิจัย

- การศึกษา Bioavailability และการกระจายตัวในอวัยวะต่างๆ ของสารสกัดจากกระชายดำ ในหนู (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2552)
- การพัฒนามาตรฐานสารสกัดและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศเพื่อรักษาแผลเบาหวานและการต้านการอักเสบ (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2553)
- การศึกษาผลของน้ำมันมะรุมต่อเซลล์ผมและการเจริญของเส้นผมในสัตว์ทดลอง (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2554)
- การศึกษากลไกต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรไทยดั้งเดิมที่ใช้เป็นยาแก้ริดสีดวงทวาร ประจำปีงบประมาณ 2558 จากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

#### ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัย

- ผลและกลไกต่อยีนที่สัมพันธ์กับการอักเสบของกระชายดำ (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2552)
- การศึกษาแบบบูรณาการเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากกระชายดำและข่อย (งบบูรณาการปีงบประมาณ 2549 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
- โครงการ การศึกษามาตรฐานและสารสำคัญของพืชสมุนไพรในพื้นที่โคกภูตากการ (โครงการภายใต้ชุดแผนงานวิจัยการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่โคกภูตากา อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น งบอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2549 มหาวิทยาลัยขอนแก่น)



- การศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2551 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การวิจัยและพัฒนาอาหารไทยเพื่อสุขภาพ (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2551)
- การพัฒนาและศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากตำรับแกงอีสาน (งบประมาณของสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ 2552)
- โครงการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบ เพื่อบรรจุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำปีงบประมาณ 2551)
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางนาโนและการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากกิ่งมะขามป้อม (งบประมาณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552)
- การศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่ห้วยกุ่ม จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2554 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรในวงศ์อะนาคาร์เดียซี 3 ชนิด ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ: การศึกษามาตรฐานและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ปีที่1) ประจำปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างเมลานินของพืชสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิประจำปีงบประมาณ 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ปกป้องเนื้อเยื่อประสาท และการพัฒนามาตรฐานของสารสกัดโปรตีน ประจำปีงบประมาณ 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างเมลานินของพืชสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์และเขื่อนอุบลรัตน์ ประจำปีงบประมาณ 2557 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการสร้างเมลานินของพืชสมุนไพรในพื้นที่อุทยานสวนสัตว์อุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2558 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- การศึกษาภูมิปัญญาหมอยาพื้นบ้านในจังหวัดอุบลราชธานี กองทุนภูมิปัญญา กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยฯ งบประมาณปี 2558

- การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพิกัดเกสร ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559

- การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขล้าหมา ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

- การพัฒนาแคปซูลสมุนไพรเพื่อลดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

งานวิจัยที่กำลังทำอยู่

- การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ ฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ความก้าวหน้า 50%)

- การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดเห็ดเพื่อเสริมความจำ ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ความก้าวหน้า 50%)

- การศึกษากลไกออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของตำรับยาสมุนไพรทาแก้บวม ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี (ความก้าวหน้า 60%)

- การพัฒนาครีมรองพื้นกันแดดจากสารสกัดมะหาด โครงการอนุรักษ์พันธุ์พืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มรภ.อุบลฯ ปีงบประมาณ 2561 (ความก้าวหน้า 30%)