

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางด้วยเอทานอล

In Vitro Anticancer Activity of *Ganoderma lucidum* var. *antler* Ethanol Extract Against Melanoma Skin Cancer Cells

อนัญญา จินดารักษ์¹, เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์², สันชัย พยุงกร³ และ
ณัฐนันท์ ปัญจวรญาณ ต.เทียนประเสริฐ^{1*}
Ananya Jindaruk¹, Yaovapa Armsirujiwet², Sunchai Payungporn³ and
Nattanan Panjaworayan T-Thienprasert^{1*}

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

¹ Department of Biochemistry, faculty of Science, Kasetsart University

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

² Department of Microbiology, faculty of Science, Kasetsart University

³ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

บทคัดย่อ

มะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา เป็นมะเร็งที่พบว่ามีอุบัติการณ์สูงมากขึ้นทุกปี มีความรุนแรงและเป็นสาเหตุการตายถึงร้อยละ 75 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนังทั้งหมด ทั้งนี้แนวทางรักษาปัจจุบัน เช่น การผ่าตัด ยาเคมีบำบัดและรังสีรักษาส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วย ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนาแนวทางการรักษาแบบใหม่จึงมีความจำเป็น จากรายงานพบว่าสารสกัดจากดอกเห็ดหลินจือเขากวางมีฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆ แต่ยังไม่มีการรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (A375) ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางด้วยเอทานอล ผลการศึกษาความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT พบว่า ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางแปรผันตรงกับความความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A375 แต่มีความเป็นพิษที่ต่ำมากในเซลล์ปกติ (Vero) สำหรับผลการศึกษาการติดฉลากเซลล์ด้วย Annexin V พบว่า ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารสกัดเห็ด สามารถเหนี่ยวนำโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็ง A375 ได้ในระดับอ่อน และผลการศึกษาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบเวลาจริง พบว่า ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารสกัดเห็ด สามารถลดการแสดงออกของยีน signal transducer and activator of transcription 1 (ยีน *STAT1*) ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายของโรคมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมาถึง 5 เท่า แต่ไม่มีผลต่อยีน 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (ยีน *OAS1*) ในเซลล์มะเร็ง A375 ดังนั้น ผลการทดลองนี้เป็นการนำเสนอองค์ความรู้ใหม่ บ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวาง มีศักยภาพในการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

คำสำคัญ: มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา เห็ดหลินจือเขากวาง โปรแกรมการตายของเซลล์ การแสดงออกของยีน

Abstract

Melanoma skin cancer is a cancer that has been found to have a significantly increasing incidence every year. It is severe and accounts for up to 75% of deaths among all skin cancer patients. Current treatment approaches include surgery, chemotherapy, and radiation therapy associated with side effects on patients. Therefore, it is necessary to study and develop new treatment strategies. Previous reports showed that *Ganoderma lucidum* var. *antler* fruiting

* Corresponding author : fscinnp@ku.ac.th

body extract has anticancer activities against various types of cancers, but there have been no reports on the anticancer effects on melanoma skin cancer. This study aimed to investigate the anticancer activity of *G. lucidum* var. *antler* mycelium extract with ethanol on melanoma skin cancer cells (A375). By using MTT assay, the results demonstrated that the mycelium extract increased toxicity against A375 cells in a dose-dependent manner, but it had very low toxicity on normal cells (Vero). Moreover, the result from Annexin V assay showed that 250 µg/mL of mycelium extract could induce apoptosis in A375 cells at a mild level. Additionally, the real-time polymerase chain reaction (PCR) indicated that 250 µg/mL of the extract could downregulate the expression of the signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*) gene, which is a marker gene for melanoma skin cancer, by up to five folds. However, it did not affect the 2'-5'- oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1*) gene in A375 cells. Therefore, these experimental results present new knowledge, indicating that *G. lucidum* var. *antler* mycelium extract has the potential for further in-depth study.

Keywords: melanoma skin cancer, *Ganoderma lucidum* var. *antler*, apoptosis, gene expression

1. บทนำ

ในปี 2563 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) รายงานว่ามะเร็งผิวหนังเป็นกลุ่มมะเร็งที่พบบ่อยและมีอัตราการผู้ป่วยเพิ่มขึ้นทุกปี โดยพบว่ามีผู้ป่วยรายใหม่มากกว่า 1.5 ล้านรายต่อปี และเป็นมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาถึงประมาณ 325,000 รายทั่วโลก นอกจากนี้ยังพบผู้เสียชีวิตจากมะเร็งผิวหนังถึง 57,000 ราย (WHO, 2020) ปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรครวมจากหลายปัจจัยได้แก่ ผิวสัมผัสกับแสงแดดจัดเป็นเวลานาน มลพิษ สารเคมี นอกจากนี้ยังเกิดได้จากการสูบบุหรี่ ความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี ผลเรื้อรัง ผลข้างเคียงจากรังสีบำบัด ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Simoes et al., 2015)

มะเร็งผิวหนังแบ่ง 3 ประเภท ได้แก่ มะเร็งผิวหนังชนิดเบซัลเซลล์ (Basal cell carcinomas หรือ BCCs) มะเร็งผิวหนังชนิดสแควมัสเซลล์ (Squamous cell carcinomas หรือ SCCs) และ มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (Cutaneous malignant melanomas หรือ CMs) ซึ่ง BCCs และ SCCs เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อผิวหนังของผิวหนัง จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า มะเร็งผิวหนังประเภทไม่ใช่เมลาโนมา (Non melanoma skin cancer) ในขณะที่ CMs เกิดจากความผิดปกติของเซลล์สร้างเม็ดสี หรือเมลาโนไซต์ (D'Orazio et al., 2013) ทั้งนี้มะเร็งผิวหนังประเภทไม่ใช่เมลาโนมาพบอัตราการเสียชีวิตต่ำ ในขณะที่มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งผิวหนังโดยพบประมาณร้อยละ 80 (Sajadimajd et al., 2020)

ในปัจจุบัน การรักษาโรคมะเร็งผิวหนังนิยมใช้เคมีบำบัด (Chemotherapy) และการฉายรังสี (Radiotherapy) แต่พบการรายงานว่าการรักษาดังกล่าวมีผลข้างเคียงเพราะไม่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งจึงสามารถทำลายเนื้อเยื่อปกติตลอดจนทำลายระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยได้ นอกจากนี้พบว่าการใช้ยาต้านมะเร็งส่งผลให้เกิดการดื้อยาต้านมะเร็ง ทำให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงได้พยายามค้นคว้าเพื่อหายาต้านมะเร็งที่มีเป้าหมายจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและมีผลข้างเคียงต่ำ ทั้งนี้สารสกัดธรรมชาติซึ่งประกอบด้วยสารประเภทเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์เชิงการแพทย์จึงได้รับความสนใจสูง (Patel and Goyal, 2012)

เห็ดหลินจือเขากวาง (*Ganoderma lucidum* var. *antler*) เป็นที่รู้จักกันอย่างดีในทางการแพทย์แผนโบราณจีนมาอย่างยาวนาน โดยพบว่ามีการออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ โพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ และกรดกาโนเดอริก (Sudheer et al., 2018) จากรายงานพบว่าเห็ดหลินจือเขากวางให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกับเห็ดหลินจือแดงรูปร่างโต แต่มีคาร์โบไฮเดรตและปริมาณเส้นใยที่สูงกว่าแบบปกติ (Mau et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าเห็ดหลินจือแดงทั่วไป (Sudheer et al., 2018) โดยผลงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากเห็ดหลินจือเขากวางช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหนูทดลองผ่านการกระตุ้นอินเตอร์เฟอรอนแกมมาที่เซลล์ม้าม (Kohguchi et al., 2004) ในขณะที่สารเฮสเปอร์เรติน (Hesperetin) และ กาโนซิน

บี (Ganocin B) ของเห็ดหลินจือเขากว้างนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออก โดยสารออกฤทธิ์สำคัญสามารถจับที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาทั้งสาม (Catalytic triad) ของเอนไซม์โปรติเอสของไวรัส (DENV2 NS2B-NS3pro) ผ่านพันธะไฮโดรเจน พันธะแวนเดอร์วาลส์ และอันตรกิริยาระหว่าง pi-pi (Lim et al., 2020) นอกจากนี้พบว่าสารไตรเทอร์พีนที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือเขากว้างสามารถลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ของมะเร็งปอดในหนู (Liu et al., 2020) และยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (de Mendonça et al., 2023) ทั้งนี้ ยังไม่มีการรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาของสารสกัดเส้นใยจากเห็ดหลินจือเขากว้าง

อนึ่ง โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติ มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วไม่สามารถควบคุมได้ โดยพบว่าเซลล์มะเร็งนั้นมีกิจกรรมโปรแกรมการตายของเซลล์ (Apoptosis) ที่ต่ำมาก ทำให้เซลล์มะเร็งไม่ตายเฉกเช่นเซลล์ปกติ การเหนี่ยวนำให้กิจกรรมโปรแกรมการตายของเซลล์ที่สูงขึ้น จึงเป็นหนึ่งในแนวคิดของการพัฒนายาต้านมะเร็ง (Pfeffer and Singh, 2018)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสารสกัดเห็ดหลินจือด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยผ่านโปรแกรมการตายของเซลล์ (Hong et al., 2004) และพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพสำคัญในเห็ดหลินจือ ได้แก่ ฟินอลิก ไตรเทอร์พีนอยด์ (Hu et al., 2017) ทั้งนี้การใช้เอทานอลในการสกัดซึ่งเป็นตัวทำละลายมีขั้วนั้นสามารถสกัดสารทุติยภูมิที่มีขั้วออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Abubakar and Haque, 2020)

ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาของสารสกัดเส้นใยจากเห็ดหลินจือเขากว้างด้วยเอทานอล โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประเภทมะเร็งผิวหนังเมลาโนมา (A375) รวมถึงการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรแกรมการตายของเซลล์ (Apoptosis) ตลอดจนฤทธิ์ของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือเขากว้างต่อระดับการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา ได้แก่ ยีน Signal Transducer and Activator of Transcription 1 หรือยีน *STAT1* (Stephanou and Latchman, 2003) และ ยีน 2'-5'- Oligoadenylate synthetase 1 หรือยีน *OAS1* ในเซลล์ A375 โดยผลการศึกษาจะเพิ่มองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับศักยภาพในการต้านมะเร็งผิวหนังของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือเขากว้าง

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยจากเห็ดหลินจือเขากว้างด้วยตัวทำละลายเอทานอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา
- 2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเส้นใยจากเห็ดหลินจือเขากว้างต่อกิจกรรมของโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา
- 2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์เส้นใยของสารสกัดจากเส้นใยจากเห็ดหลินจือเขากว้างต่อระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* และ ยีน *OAS1* ในเซลล์มะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดเห็ดตัวอย่าง

นำเส้นใยเห็ดหลินจือเขากว้างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นเติมเอทานอลในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 220 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประเหยแห้งโดยตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อตัวอย่างแห้งนำมาละลายด้วย ดีเอ็มเอสโอ (DMSO, Dimethyl Sulfoxide) เมื่อละลายเสร็จจึงมากรองผ่านที่กรองสารชนิดไนลอน ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Syringe filter 0.2 μ m)

3.2 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์

นำเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (A375, CRL-1619TM, ATCC) และเซลล์ปกติ (Vero, CCL-81TM, ATCC) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) เสริมด้วยร้อยละ 10 ของซีรัมลูกวัว (Fetal bovine serum) และร้อยละ 10 ของ ยาต้านจุลชีพ (Antimycotic-antibiotic) บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่มีสภาวะของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณร้อยละ 80 จึงนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในภาชนะ 96 หลุม โดยนับจำนวนเซลล์ประมาณ 5,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ และเติมสารสกัดเห็ดตัวอย่างที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0- 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติม เอ็มทีที (MTT, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) และบ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์อีก 3 ชั่วโมง จากนั้นนำ MTT ออก และเติมดีเอ็มเอสโอ หลุมละ 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิง 630 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท จากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ดังอธิบายใน (Waiyaput et al., 2012) และคำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 โดยโปรแกรม GraphPad Prism

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมโปรแกรมการตายของเซลล์

นำเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 มาเพาะเลี้ยงในภาชนะ 24 หลุม โดยนับจำนวนเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อหลุม และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมสารสกัดเห็ดให้มีความเข้มข้นท้ายสุดที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในตู้เลี้ยงเซลล์ สำหรับตัวแปรควบคุมเชิงบวก เติมน้ำเกลือ ดีเอ็มเอสโอ ความเข้มข้นร้อยละ 10 และบ่ม 3 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยเครื่องหมุนปั่นเหวี่ยง ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มเซลล์กับสารเคมีในชุดตรวจอะพอพโทซิส ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในที่มีดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ (Flow cytometer)

3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 มาเพาะเลี้ยงบนภาชนะ 6 หลุม จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม และบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดเห็ดให้มีความเข้มข้นท้ายสุดที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์โดยน้ำยาไตรโซล ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นกำจัดจีโนมดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ด้วยเอนไซม์ ดีเอ็นเอส วัน (DNase I) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต หลังจากนั้นใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร และ การวัดอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 230 นาโนเมตร รวมถึงการวิเคราะห์ผ่านเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อไดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพแล้วนำไปสังเคราะห์ ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA, Complementary DNA) โดยใช้เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (Reverse transcriptase) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จัดเก็บดีเอ็นเอคู่สมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

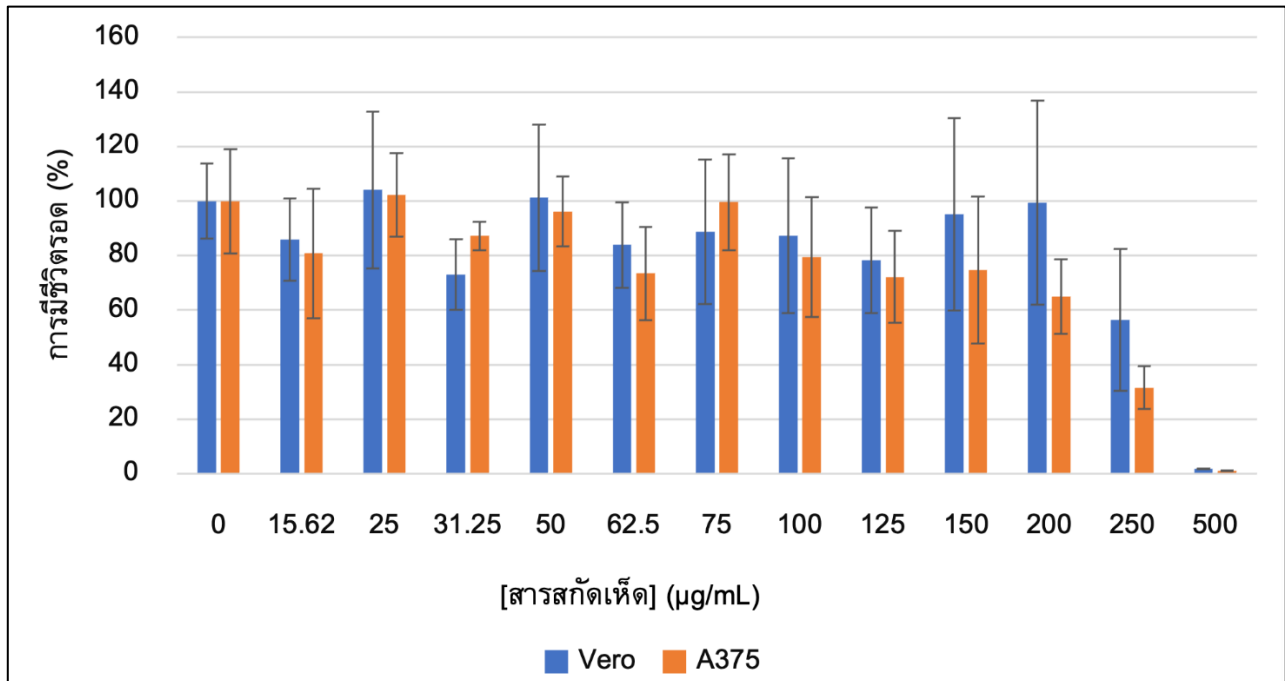
3.5 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาถูกโซฟอสไลเมอเรสแบบเวลาจริง (Realtime - PCR)

ผสมดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้กับน้ำยา Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยมีไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ยีน STAT1 คือ STAT1-F: 5'-atgtctcagtggtacgaactca-3' และ STAT1-R: 5'-tgtgcccaggtactgtctgatt-3' (Thongthae et al., 2014) สำหรับไพรเมอร์ของยีน OAS1 คือ OAS1-F: 5'- gatctcagaaatccccagcca-3' และ OAS1-R: 5'- agctacctcggaagcacctt-3' (Thongthae et al., 2014) โดยมียีนควบคุมภายในคือยีน beta-actin ซึ่งมีไพรเมอร์ดังนี้ beta-actin-F: 5'-ctgggcatggagtcctgtggcatcc-3' และ beta-actin-R: 5'- cgcaactaagtcatagtccgcctag-3' (Thongthae et al., 2014) จากนั้นทำปฏิกิริยาถูกโซฟอสไลเมอเรสแบบเวลาจริง ด้วย CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System คำนวณค่าการแสดงออกยีนสัมพันธ์ของยีน STAT1 และ OAS1 ด้วยเทคนิค delta delta ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ดังอธิบายใน (Thongthae et al., 2014)

4. ผลการวิจัย

4.1 สารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์นั้น แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวาง โดยที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรสามารถลดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 เหลือเพียงร้อยละ 31.60 ± 7.86 ในขณะที่มีความเป็นพิษน้อยมากเพียงร้อยละ 10 ต่อ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง A375 ได้ร้อยละ 50 (Inhibitory Concentration หรือ IC_{50}) อยู่ที่ 255.9 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ดังแสดงใน (ภาพที่ 1) ดังนั้นในงานศึกษาลำดับถัดไปจึงศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

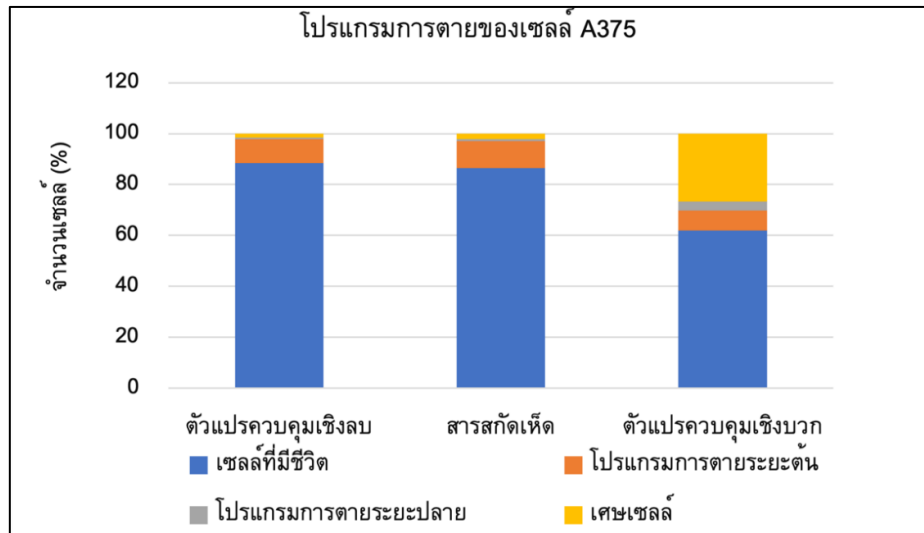


ภาพที่ 1 ฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

โดยกราฟแท่งและแถบข้อผิดพลาด (Error bar) แสดงถึง ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อมูลจากผลการทดลองจำนวน 3 การทดลองอิสระที่มีจำนวนซ้ำของตัวอย่าง 4 ซ้ำต่อการทดลอง

4.2 สารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางเหนี่ยวนำโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็ง A375 ในระดับอ่อน

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อกิจกรรมโปรแกรมการตายของเซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางสามารถเหนี่ยวนำโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็ง A375 ได้ในระดับอ่อน กล่าวคือ สามารถเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เข้าสู่โปรแกรมการตายระยะต้นเพิ่มขึ้น 1.15 เท่า และ เพิ่มจำนวนเซลล์ที่เข้าสู่โปรแกรมการตายระยะปลาย 0.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ด (ตัวแปรควบคุมเชิงลบ) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อกิจกรรมโปรแกรมการตายของเซลล์

กราฟแท่งตัวแปรควบคุมเชิงลบ คือ ผลของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง

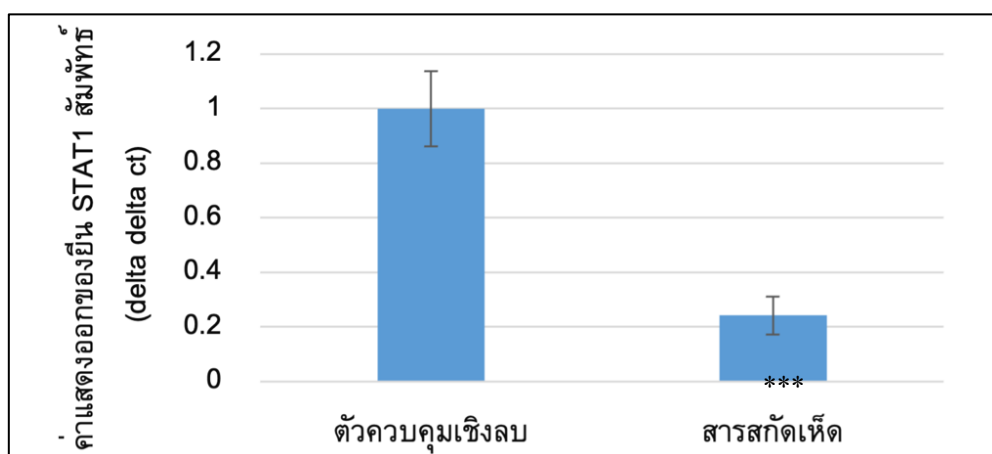
กราฟแท่งของสารสกัดเห็ด คือ เซลล์ที่ได้รับ 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวาง

ตัวแปรควบคุมเชิงบวก คือ เซลล์ที่ได้รับร้อยละ 10 ของ dimethyl sulfoxide

ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลองอิสระ

4.3 สารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางลดระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *OAS1* ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375

ผลการทดลองโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเวลาจริง พบว่าที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* ได้ประมาณ 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเห็ด (ตัวแปรควบคุมเชิงลบ) โดยทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม สารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางไม่ส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *OAS1* (ภาพที่ 4)

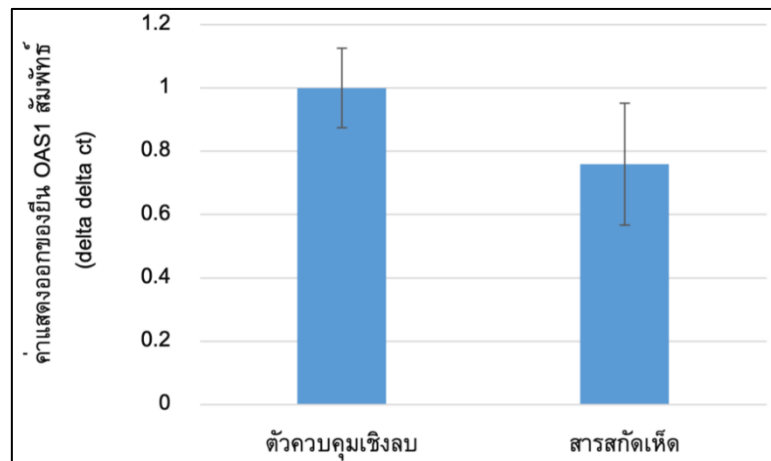


ภาพที่ 3 กราฟของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อค่าแสดงออกของยีน *STAT1* สัมพัทธ์

โดยกราฟแท่งและแถบข้อผิดพลาด (Error bar) แสดงถึง ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานตามลำดับ

ซึ่งเป็นข้อมูลจากผลการทดลองจำนวน 3 การทดลองอิสระที่มีจำนวนซ้ำของตัวอย่าง 4 ซ้ำต่อการทดลอง

สัญลักษณ์ "***" หมายถึงค่า $p < 0.001$



ภาพที่ 4 ฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อค่าแสดงออกของยีน OAS1 สัมพัทธ์

กราฟแท่งและแถบข้อผิดพลาด (Error bar) แสดงถึง ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานตามลำดับ ซึ่งเป็นข้อมูลจากผลการทดลองจำนวน 3 การทดลองอิสระที่มีจำนวนซ้ำของตัวอย่าง 4 ซ้ำต่อการทดลอง

5. อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้เพิ่มองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา ซึ่งไม่มีการรายงานมาก่อน ทั้งนี้การรายงานที่ผ่านมาเป็นการรายงานฤทธิ์ของสารสกัดดอกเห็ดหลินจือเขากวาง ซึ่งพบว่ามีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง (Kohguchi et al., 2004) และมีฤทธิ์ด้านการแพร่กระจายของมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลองที่ถูกกดภูมิคุ้มกันด้วยสารไซโคลฟอสฟาไมด์ (Nonaka et al., 2006) เนื่องจากการเพาะเห็ดให้ได้ดอกเห็ดนั้นใช้เวลานาน และควบคุมปริมาณสารออกฤทธิ์ได้ยาก เพราะมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารเมแทบอไลต์ของดอกเห็ด ถึงแม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน เช่น ปัจจัยจากแหล่งเพาะพันธุ์ สารอาหาร สภาวะแวดล้อม สภาพอากาศ (Belletini et al., 2019) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเส้นใยของเห็ด ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าในห้องปฏิบัติการ และสามารถควบคุมแหล่งอาหารและสภาวะแวดล้อมได้แน่นอนมากกว่า อย่างไรก็ตามทีมวิจัยพบว่าหากเพาะเส้นใยเห็ดจากหัวเชื้อเดิมซ้ำๆ หลายๆ รอบ ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 จะลดลง ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญระหว่างเส้นใยและดอกเห็ดของเห็ดหลินจือเขากวาง แต่มีรายงานเปรียบเทียบปริมาณของสารออกฤทธิ์สำคัญในเส้นใยและดอกเห็ดสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น พบการรายงานว่าปริมาณรวมของโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ ระหว่างเส้นใยและดอกเห็ดของเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) และ เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีระดับความเข้มข้นของเอนไซม์บางชนิดแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์แลคเคส (Laccase) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการออกซิเดชันของสารประกอบประเภทฟีนอลิก จะมีความเข้มข้นสูงในเส้นใยและมีความเข้มข้นต่ำในดอกของเห็ดแชมปิญอง ส่งผลให้สารฟีนอลิกประเภทฟีนอลิกในเส้นใยเห็ดแชมปิญองนั้นมีปริมาณที่ต่ำกว่าและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าดอกเห็ดแชมปิญอง ในขณะที่เห็ดนางรมฮังการีมีปริมาณสารฟีนอลิก และฟีนอลสูงในเส้นใยมากกว่าดอกเห็ด (Berger et al., 2022)

ผลการทดลองในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าที่ ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวาง สามารถเหนี่ยวนำโปรแกรมการตายของมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมาในระดับอ่อน (ภาพที่ 2) ทั้งนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารสกัดด้วยเมทานอล หรือ เอทานอลจากเส้นใยของเห็ดหลินจือสามารถกระตุ้นโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ โดยสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ กรดกาโนเดอริก (Tang et al., 2006; Zheng et al., 2018) เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้ดีมากขึ้น ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางให้สูงขึ้น จะสามารถเหนี่ยวนำโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็ง A375 ได้ดียิ่งขึ้น

ยีน *STAT1* แปลรหัสได้โปรตีน *STAT1* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในวิถีการส่งสัญญาณอินเตอร์เฟอรอน ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ต่อการกระตุ้นของไซโตไคน์ ฮอโมน และอินเตอร์ลิวคิน และได้รับการรายงานว่าเป็นหนึ่งในยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor) ในมะเร็งหลายชนิด เนื่องจาก *STAT1* สามารถกระตุ้นโปรแกรมการตายของเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิดได้ อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าโปรตีน *STAT1* นั้น ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบางประเภท (Zhang and Liu, 2017) รายงานล่าสุด ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีนระหว่าง 24 ตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา และ 13 ตัวอย่างของผิวหนังปกติ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* มีค่าสูงมากอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา จึงสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า ยีน *STAT1* มีความสำคัญต่อการพัฒนาของโรคมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา และ อาจใช้เป็นชีวโมเลกุลเป้าหมายในการวินิจฉัยโรคมะเร็งประเภทเมลาโนมา ทั้งนี้กลไกและบทบาทของโปรตีน *STAT1* ต่อการพัฒนาโรคมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมายังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน (Huang et al., 2019) ในงานวิจัยนี้พบว่าความเข้มข้นที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางนั้น สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* ถึง 5 เท่า ซึ่งอาจบ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางมีศักยภาพในการต่อยอดพัฒนาเพื่อรักษาโรคมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมา

ยีน *OAS1* แปลรหัสได้โปรตีน 2'-5'- Oligoadenylate synthetase 1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญของเซลล์ต่อการตอบโต้การติดเชื้อจากไวรัส รวมถึงมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและโปรแกรมการตายของเซลล์ (Schwartz et al., 2020) สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *OAS1* ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งผิวหนังประเภทเมลาโนมานั้น พบว่ามีระดับที่สูงมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างผิวหนังปกติ (Wu et al., 2016) นอกจากนี้มีการรายงานพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *OAS1* มีระดับที่สูงในผิวหนังที่บวม อักเสบ เช่น ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้นจึงอาจเป็นโมเลกุลเป้าหมายสำหรับแนวทางการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังอักเสบ (Huang et al., 2022) ในงานวิจัยชิ้นนี้พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ยังไม่สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *OAS1* ได้ ซึ่งอาจเป็นว่าความเข้มข้นที่ใช้ศึกษายังไม่สูงมากพอ หรืออาจเป็นเพราะการตายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 เป็นวิถีที่สัมพันธ์กับยีน *STAT1* แต่ไม่เกี่ยวข้องกับยีน *OAS1* ซึ่งวิถีและโมเลกุลเป้าหมายของสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางต้องมีการศึกษาอีกซึ่งต่อไปในอนาคต

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่น่าเสนอฤทธิ์ของสารสกัดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางด้วยเอทานอล ซึ่งพบว่าสารสกัดเห็ดสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา (A375) โดยที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโปรแกรมการตายระดับอ่อน. และลดระดับการแสดงออกของยีน *STAT1* ได้ถึง 5 เท่าในเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ดังนั้นสารสกัดเห็ดเส้นใยเห็ดหลินจือเขากวางมีศักยภาพที่ควรศึกษาพัฒนาต่อยอดในเชิงลึก เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์สำคัญ รวมถึงกลไกและโมเลกุลเป้าหมายต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นอย่างสูง รวมถึงภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์

7. เอกสารอ้างอิง

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci*, 12(1), 1-10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maievas, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., Júnior, A. M., & Ribani, R. H. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi J Biol Sci*, 26(4), 633-646. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>

- Berger, R. G., Bordewick, S., Krahe, N. K., & Ersoy, F. (2022). Mycelium vs. Fruiting Bodies of Edible Fungi-A Comparison of Metabolites. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071379>
- D' Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12222-12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- de Mendonça, D. E. A., de Godoy, M. A. F., Lucredi, N. C., Comar, J. F., Almeida, I. V., & Vicentini, V. E. P. (2023). Toxicogenic effects of the mushroom *Ganoderma lucidum* on human liver and kidney tumor cells and peripheral blood lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 307, 116226. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116226>
- Hong, K. J., Dunn, D. M., Shen, C. L., & Pence, B. C. (2004). Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells. *Phytother Res*, 18(9), 768-770. <https://doi.org/10.1002/ptr.1495>
- Hu, Y., Ahmed, S., Li, J., Luo, B., Gao, Z., Zhang, Q., Li, X., & Hu, X. (2017). Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep46623>
- Huang, L., Chen, J., Zhao, Y., Gu, L., Shao, X., Li, J., Xu, Y., Liu, Z., & Xu, Q. (2019). Key candidate genes of STAT1 and CXCL10 in melanoma identified by integrated bioinformatical analysis. *IUBMB life*, 71(10), 1634-1644. <https://doi.org/10.1002/iub.2103>
- Huang, Y. Z., Zheng, Y. X., Zhou, Y., Xu, F., Cui, Y. Z., Chen, X. Y., Wang, Z. Y., Yan, B. X., Zheng, M., & Man, X. Y. (2022). OAS1, OAS2, and OAS3 Contribute to Epidermal Keratinocyte Proliferation by Regulating Cell Cycle and Augmenting IFN-1—Induced Jak1—Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Phosphorylation in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 142(10), 2635-2645.e2639. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.02.018>
- Kohguchi, M., Kunikata, T., Watanabe, H., Kudo, N., Shibuya, T., Ishihara, T., Iwaki, K., Ikeda, M., Fukuda, S., & Kurimoto, M. (2004). Immuno-potentiating effects of the antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(4), 881-887. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.881>
- Lim, W. Z., Cheng, P. G., Abdulrahman, A. Y., & Teoh, T. C. (2020). The identification of active compounds in *Ganoderma lucidum* var. antler extract inhibiting dengue virus serine protease and its computational studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(14), 4273-4288. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1678523>
- Liu, W., Yuan, R., Hou, A., Tan, S., Liu, X., Tan, P., Huang, X., & Wang, J. (2020). *Ganoderma* triterpenoids attenuate tumour angiogenesis in lung cancer tumour-bearing nude mice. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 1070-1077. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1839111>
- Mau, J. L., Lin, H. C., & Chen, C. C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34, 521-526. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00067-9)
- Nonaka, Y., Shibata, H., Nakai, M., Kurihara, H., Ishibashi, H., Kiso, Y., Tanaka, T., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2006). Anti-tumor activities of the antlered form of *Ganoderma lucidum* in allogeneic and syngeneic tumor-bearing mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(9), 2028-2034.

<https://doi.org/10.1271/bbb.50509>

- Patel, S., & Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Sajadimajd, S., Bahramsoltani, R., Iranpanah, A., Patra, J. K., Das, G., Gouda, S., Rahimi, R., Rezaeihamiri, E., Cao, H., & Giampieri, F. (2020). Advances on natural polyphenols as anticancer agents for skin cancer. *Pharmacological research*, 151, 104584. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104584>
- Schwartz, S. L., Park, E. N., Vachon, V. K., Danzy, S., Lowen, A. C., & Conn, G. L. (2020). Human OAS1 activation is highly dependent on both RNA sequence and context of activating RNA motifs. *Nucleic Acids Research*, 48(13), 7520-7531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa513>
- Simoes, M. F., Sousa, J. S., & Pais, A. C. (2015). Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*, 357(1), 8-42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.001>
- Stephanou, A., & Latchman, D. S. (2003). STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *International journal of experimental pathology*, 84(6), 239-244. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2003.00363.x>
- Sudheer, S., Taha, Z., Manickam, S., Ali, A., & Cheng, P. G. (2018). Development of antler-type fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and determination of its biochemical properties. *Fungal biology*, 122(5), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.01.007>
- Tang, W., Liu, J. W., Zhao, W. M., Wei, D. Z., & Zhong, J. J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*, 80(3), 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.001>
- Thongthae, N., Payungporn, S., Poovorawan, Y., & T-Thienprasert, N. P. (2014). A rational study for identification of highly effective siRNAs against hepatitis B virus. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(1), 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.06.006>
- Waiyaput, W., Payungporn, S., Issara-Amphorn, J., & Panjaworayan, N. T. (2012). Inhibitory effects of crude extracts from some edible Thai plants against replication of hepatitis B virus and human liver cancer cells. *BMC Complement Altern Med*, 12, 246. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-246>
- World Health Organization. (2020). *Skin Cancer*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.who.int/cancer-type/skin-cancer/>
- Wu, L., Dong, B., Zhang, F., Li, Y., & Liu, L. (2016). Prediction of the engendering mechanism and specific genes of primary melanoma by bioinformatics analysis. *Dermatologica sinica*, 34(1), 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.07.003>
- Zhang, Y., & Liu, Z. (2017). STAT1 in cancer: friend or foe? *Discovery medicine*, 24(130), 19-29.
- Zheng, L., Wong, Y. S., Shao, M., Huang, S., Wang, F., & Chen, J. (2018). Apoptosis induced by 9, 11-dehydroergosterol peroxide from *Ganoderma Lucidum* mycelium in human malignant melanoma cells is Mcl-1 dependent. *Molecular Medicine Reports*, 18(1), 938-944. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9035>