วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ ๖ ฉบับที่ ๓ กันยายน-ธันวาคม ๒๕๕๑ Vol. 6 No. 3 September-December 2008

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ทางยาของเห็ดหลินจือ

กษมา สุขาภิรมย์*
นพมาศ สุนทรเจริญนนท์**
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน***
โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์*

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.) เป็นสมุนไพรจีนที่มีการใช้ในการสร้างเสริมสุขภาพ, ป้องกันและบำบัดโรคมาเป็นเวลานาน มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านมะเร็ง. ในประเทศไทยก็มีการใช้ผลิตภัณฑ์จากเห็ดหลินจือกันอย่างกว้างขวาง โดยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำมาเข้ามาจากต่างประเทศ. การศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งที่นำเข้ามาจากประเทศจีนหรือที่ขยายพันธุ์ในประเทศ โดยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี. การวัดการปรากฏของโมเลกุล CD69 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์พบว่าสารสกัดน้ำและส่วนที่ละลายน้ำได้ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสปอร์ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G9 ที่ไม่กะเทาะซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มาจากประเทศจีน สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ได้ดีที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ G2 ที่เพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้เพียงประมาณครึ่งหนึ่งของสายพันธุ์ G9. ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้ประกอบการคัดเลือกหรือปรับปรุงสายพันธุ์ และพัฒนาเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือเพื่อนำไปไปใช้ประโยชน์ต่อไป.

คำสำคัญ : **เห็ดหลินจือ, สปอร์, ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน, ทีลิมโฟไซต์, โมเลกุล CD69**

ภูมิหลังและเหตุผล

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.) หรือเห็ดหมื่นปี เป็นสมุนไพรจีนที่มีการใช้ในการสร้างเสริมสุขภาพ, ป้องกันและบำบัดโรคมาเป็นเวลานาน มีบันทึกสรรพคุณในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็งและรักษาโรคมะเร็ง โรคตับ กระเพาะอักเสบ ลำไส้อักเสบ เบาหวาน โรคภูมิแพ้ รวมทั้งลดแรงดันเลือด, ระดับน้ำตาลในเลือด และคอเลสเตอรอล.

**สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล*
***ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*
****สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข*

เห็ดหลินจือเป็นราขนาดใหญ่ วงศ์ Polyporaceae, รูปร่างคล้ายไต, หมวกดอกสีน้ำตาลแดง, ผิวมันวาวคล้ายเคลือบด้วยแลคเกอร์, มีขอบสีขาวเหลือง, ผิวในของหมวกเห็ดสีขาวหรือน้ำตาลอ่อน; สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ เป็นรูเล็กอยู่ใต้หมวกดอก. ส่วนประกอบที่มีการนำมาใช้ประโยชน์นั้น มีตั้งแต่ดอกเห็ด, หมวกเห็ด และสปอร์ทั้งแบบกะเทาะเปลือกและไม่กะเทาะเปลือก. การนำมาบริโภคมีหลายรูปแบบ เช่น ผงบดแห้งบรรจุแคปซูล, ฝานเป็นชิ้นต้มกับน้ำ หรือสารสกัดบรรจุแคปซูล.

มีรายงานการศึกษามากมายที่เกี่ยวกับฤทธิ์ของเห็ดหลินจือทั้งการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยพบว่าสารสกัดน้ำจากดอกเห็ด ก้านและสปอร์ที่กะเทาะเปลือก

สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสาน, ก้าน และสปอร์ที่กะเทาะเปลือกเพิ่มการตอบสนองและหลั่งไซโตไคน์ชนิดอินเทอร์ฟีรอน-แกมมา (IFN-γ), อินเทอร์ลิวคิน-๔ (IL-4) และ IL-6 จากเซลล์ลิมโฟไซต์ในม้ามของ S-180 sarcoma-bearing mice ได้[๑]. เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งทางโลหิตวิทยา พบว่าสารสกัดน้ำจากดอกเห็ดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด HL-60, U937, K562, Blin-1 และ RPMI8226 และการศึกษาในเซลล์ HL-60 นั้น ยังพบว่าทำให้เกิด cell cycle phase arrest ที่ระยะ G2/M และเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วย[๒]. นอกจากฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งทางโลหิตวิทยาแล้ว สารสกัดจากเห็ดหลินจือยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเนื้อตันชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29[๓], เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, MDA-MB-231[๔], เซลล์มะเร็งปอด PG[๕].

สารสำคัญที่พบในเห็ดหลินจือมีหลายกลุ่ม เช่น โปรตีน[๖], ไทรเทอร์พีน[๗], พอลีย์แซ็กคาไรด์[๘] โดยมีรายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ทั้งในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและต้านมะเร็ง. ฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นสามารถกระตุ้นได้ทั้งภูมิคุ้มกันพึ่งเซลล์ และภูมิคุ้มกันฮิวมอรัล โดยมีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมโครเฟจ, นิวโทรฟิล, ทีลิมโฟไซต์, บีลิมโฟไซต์, เอ็นเคเซลล์ และเดนดริติกเซลล์, และฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งศัยโทไคน์ชนิด IL-1β, tumor necrosis factor-α (TNF-α) และ IL-6 จากแมโครเฟจ และ IFN-γ จากทีลิมโฟไซต์ได้[๙].

ในปัจจุบันนี้ ประเทศไทยมีการใช้ผลิตภัณฑ์เห็ดหลินจือกันอย่างแพร่หลาย โดยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำมาเข้า. ด้วยเหตุนี้ สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้, กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ได้ร่วมมือกับโครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองงายในองค์สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ทำการขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งที่นำมาจากต่างประเทศและในประเทศ. คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเห็ดหลินจือและสปอร์ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์และการนำไปใช้ประโยชน์ของเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือในประเทศไทยต่อไป.

ระเบียบวิธีศึกษา

ตัวอย่างดอกเห็ดและสปอร์เห็ดหลินจือ

๑. เห็ดหลินจือที่ปลูกในประเทศไทย

- พันธุ์ G2 (โครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองงายในพระองค์สมเด็จพระนางเจ้าฯพระบรมราชินีนาถ จังหวัดเชียงใหม่): สปอร์ที่ไม่กะเทาะ.

๒. เห็ดที่ปลูกในประเทศจีน

- พันธุ์ G5 (Liaoning/Jilin): สปอร์ที่ไม่กะเทาะและสปอร์ที่กะเทาะ.

- พันธุ์ G9 (Chang Baishan/Jilin): สปอร์ที่ไม่กะเทาะ และสปอร์ที่กะเทาะ.

อาสาสมัคร

คนสุขภาพแข็งแรง ๕ คน ที่ผ่านการวิเคราะห์หาประชากรย่อยของลิมโฟไซต์แล้วพบว่ามีค่าปรกติ.

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์

ชั่งตัวอย่างเห็ดหลินจือแต่ละชนิดอย่างละ ๒๐ มิลลิกรัม เติมเอทานอล ๙๕% ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร. นำตัวอย่างไปผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง ๑๕ นาที แล้วกรอง, นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยแห้งบนหม้ออังไอน้ำ.

การเตรียมสารสกัดน้ำ

ชั่งตัวอย่างเห็ดหลินจือ G2 (unbroken spore), และ G5 (unbroken spore) อย่างละ ๓ กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่. จากนั้นเติมน้ำกลั่น ๖๐ มิลลิลิตร ตัวอย่าง G9-1 (unbroken spore) และ G9-1 (broken spore) ชั่ง ๖ กรัม เติมน้ำ ๑๒๐ มิลลิลิตร. ส่วนตัวอย่าง G5 (broken spore) ชั่ง ๑ กรัม เติมน้ำ ๒๐ มิลลิลิตร. จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มจนเดือดเป็นเวลา ๓๐ นาที. รอจนกระทั่งเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง KUBOTA® 6930 ที่ความเร็ว ๙,๐๐๐ รอบ/นาที อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จะได้ส่วนใส และส่วนตะกอน. นำส่วนใสไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Lyophilizer Christ® LOC-1m ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่แห้ง และเก็บในภาชนะปิดสนิท ที่อุณหภูมิ ๐ องศาเซลเซียส.

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างเห็ดหลินจือ โดยวิธี Phenol-sulfuric acid assay[๑๐].

การวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิค

วิเคราะห์หาปริมาณกรดยูโรนิคในตัวอย่างเห็ดหลินจือโดยวิธี meta-hydroxydiphenyl method[๑๑].

*การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลเชิงเดี่ยว*โดยวิธีทำปฏิกิริยาทางเคมีและวิธี Thin layer chromatography

วิเคราะห์ชนิดน้ำตาลเชิงเดี่ยวในตัวอย่างเห็ดหลินจือโดยวิธี acid hydrolysis/TLC[๑๒].

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ

ละลายสารสกัดน้ำ และสารสกัดแอลกอฮอล์ ใน phosphate buffered saline (PBS). ส่วนสารสกัดที่ไม่ละลายน้ำ ละลายใน DMSO ๒๐% ในน้ำเลี้ยงเซลล์ RPMI1640.

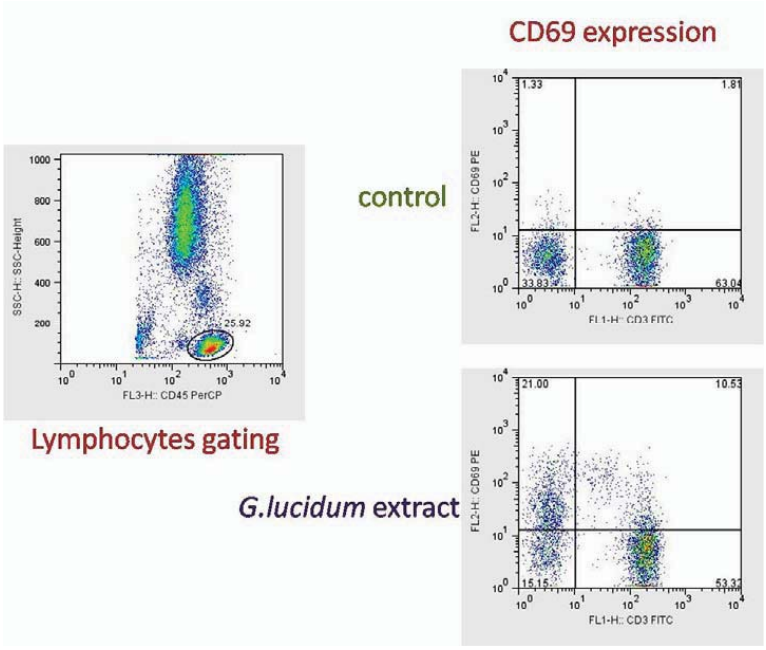
การตอบสนองของลิมโฟไซต์ต่อสารสกัดเห็ดหลินจือ

เจาะเลือดจากอาสาสมัครใส่ลงในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งเฮพาริน. จากนั้นใช้ตัวอย่างเลือดปริมาณ ๕๐๐ ไมโครลิตร กระตุ้นด้วยสารสกัดต่างๆ จากเห็ดหลินจือที่ความเข้ม ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือกระตุ้นร่วมกับ *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB) (Sigma, St.Louis, MO) ปริมาณ ๕ ไมโครกรัม โดยมี SEB เป็นตัวควบคุมผลบวก และน้ำเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 เป็นตัวควบคุมผลลบ. ผสมให้เข้ากันและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ ๕% เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง.

ภายหลังการเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างเลือดที่ถูกกระตุ้น ๕๐ ไมโครลิตร มาย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีย์ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิดต่าง ๆ (Becton Dickinson, San Jose, CA) ๓ ชนิด คือ CD3 (ทีลิมโฟไซต์) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC), CD69 (early avtivation marker) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) และ CD45 (เม็ดเลือดขาว) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง peridinin chlorophyll protein (PerCP) เป็นเวลา ๑๕ นาที, แล้วทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยสารละลาย lysing. จากนั้นจึงปั่นล้างด้วย wash buffer (2% fetal calf serum ใน PBS) เติมพาราฟอร์มัลดีไฮด์ ๑% ลงในตะกอนเซลล์. จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ FACSort (Becton Dickinson) ค่าร้อยละของทีลิมโฟไซต์ที่มี CD69 ปรากฏอยู่บนผิวหลังจากถูกกระตุ้น วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CellQuest (Becton Dickinson) ดังแสดงในรูปที่ ๑.

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างหลอดควบคุมและหลอดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากเห็ดหลินจือ



รูปที่ ๑ การวิเคราะห์เซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ เมื่อย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีย์ต่อ CD3/CD69/CD45. เซลล์ลิมโฟไซต์สามารถแยกได้โดยดู SSC/CD45 (R1) (ซ้ายมือ) และค่าร้อยละการแสดงออกของ CD69 บนทีลิมโฟไซต์ สามารถวิเคราะห์ได้จาก quadrant บนขวา (ขวามือ)

โดยใช้การทดสอบทีจับคู่. ถ้าค่าพีน้อยกว่าหรือเท่ากับ ๐.๐๕ ถือว่ามีความแตกต่างโดยนัยสำคัญทางสถิติ.

ผลการศึกษา

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และกรดยูโรนิค ในสารสกัดเห็ดหลินจือ

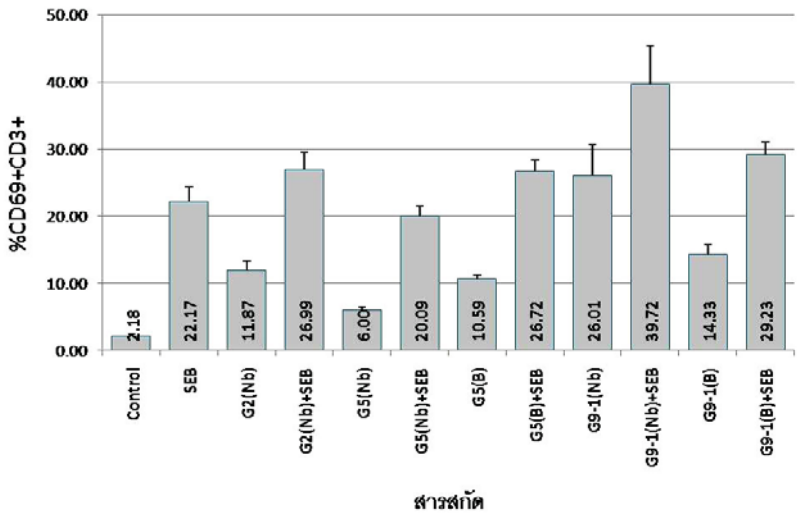
การวิเคราะห์ปริมาณพอลีย์แซ็กคาไรด์และกรดยูโรนิคในสารสกัดเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ ๑. สปอร์ที่ไม่กะเทาะจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G2 มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดคือร้อยละ ๓.๖๔. ส่วนสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G9-1 มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์น้อยที่สุดคือร้อยละ ๒.๔๕. สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิค พบว่าสปอร์เห็ดหลินจือสายพันธุ์ G5 ที่กะเทาะเปลือกมีปริมาณกรดยูโรนิคมากที่สุดคือร้อยละ ๐.๒๖. ส่วนสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากสายพันธุ์ G9-1 มีปริมาณกรดยูโรนิคเพียงร้อยละ ๐.๐๔ เท่านั้น.

การตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ต่อสารสกัดน้ำ, สารสกัดแอลกอฮอล์และ สารไม่ละลายน้ำจากเห็ดหลินจือ

เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยสารสกัดจากเห็ดหลินจือเป็นเวลา ๔ ชั่วโมง แล้วนำมาวัดปริมาณเซลล์ทีลิมโฟไซต์ที่มีโมเลกุลของ activation marker CD69 ปรากฏอยู่บนผิว พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากเห็ดหลินจือที่ความเข้ม ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดทุกตัวอย่างสามารถกระตุ้นให้เกิดการ ตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกับหลอดควบคุม (๒.๑๘%) (รูปที่ ๒) โดยสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากสายพันธุ์ G9-1 นั้น สามารถกระตุ้นได้มากที่สุดคือร้อยละ ๒๖.๐, รองลงมาคือสปอร์สายพันธุ์ G9-1 ที่กะเทาะ. ส่วนสปอร์ที่ไม่กะเทาะ

ตารางที่ ๑ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และกรดยูโรนิค ในสารสกัดเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตัวอย่าง	พอลิแซ็กคาไรด์ (%)	กรดกลูคูโรนิค (%)
G2 (unbroken spore)	๓.๖๔	๐.๑๘
G5 (unbroken spore)	๒.๕๕	๐.๑๗
G5 (broken spore)	๒.๙๒	๐.๒๖
G9-1 (unbroken spore)	๒.๔๕	๐.๐๔
G9-1 (broken spore)	๓.๕๗	๐.๑๘

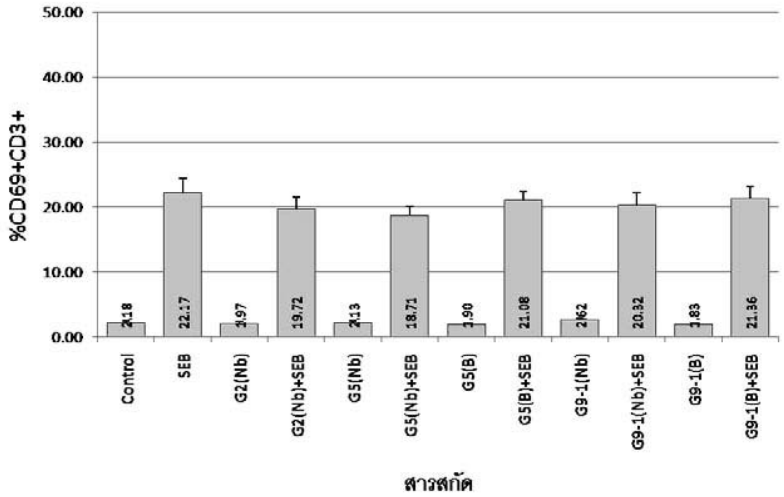


รูปที่ ๒ ค่าเฉลี่ยค่าร้อยละทีลิมโฟไซต์ที่มีโมเลกุล CD69 ปรากฏบนผิว หลังถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่างๆ ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาสาสมัคร ๕ ราย

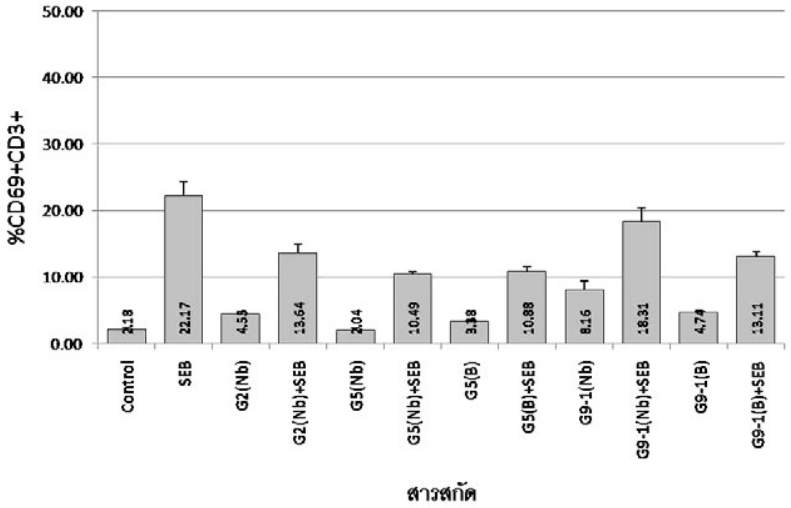
จากสายพันธุ์ G5 สามารถกระตุ้นได้น้อยที่สุดคือร้อยละ ๖.๐๐ เท่านั้น และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากเห็ดหลินจือร่วมกับ SEB แล้ว พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างมีฤทธิ์เสริมการตอบสนองของของ SEB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.

สำหรับสารสกัดแอลกอฮอล์ของเห็ดหลินจือ พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ ๒ และเมื่อกระตุ้นร่วมกับ SEB ก็ไม่สามารถเสริมฤทธิ์การตอบสนองได้.

ส่วนตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดหลินจือที่ละลายน้ำได้นั้น จากการทดสอบที่แสดงในรูปที่ ๓ พบว่า สารสกัดทุกตัวอย่างสามารถกระตุ้นการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G5 เท่านั้น ที่ไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองได้ โดยสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากสายพันธุ์ G9-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้มากที่สุดคือร้อยละ ๘.๑๖. ส่วนสารสกัดอีก ๓ ตัวอย่างที่เหลือนั้น สามารถกระตุ้นการตอบสนองได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อกระตุ้นร่วมกับ SEB กลับพบว่าสารสกัด



รูปที่ ๓ ค่าเฉลี่ยค่าร้อยละทีลิมโฟไซต์ที่มีโมเลกุล CD69 ปรากฏบนผิวหลังถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดแอลกอฮอล์จากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาสาสมัคร ๕ ราย



รูปที่ ๔ ค่าเฉลี่ยค่าร้อยละทีลิมโฟไซต์ที่มีโมเลกุล CD69 ปรากฏบนผิวหลังถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดที่ไม่ละลายน้ำ จากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่างๆ ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาสาสมัคร ๕ ราย

ทุกตัวอย่างทำให้การตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ลดลง เช่น เหลือเพียงร้อยละ ๑๐.๔๙. เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดจากเห็ดสปอร์หลินจือสายพันธุ์ G5 ที่ไม่กะเทาะร่วมกับ SEB เทียบกับร้อยละ ๒๒.๑๗ ที่กระตุ้นด้วย SEB เพียงอย่างเดียว แต่มีเพียงสปอร์ที่ไม่กะเทาะจากสายพันธุ์ G9-1 ที่กระตุ้นร่วมกับ SEB เท่านั้น ที่ไม่พบความแตกต่าง.

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งที่นำเข้ามาจากประเทศจีนหรือขยายพันธุ์ในประเทศ ได้แก่ สปอร์ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G2, G5 และ G9 ทั้งแบบที่กะเทาะและไม่กะเทาะ โดยการใช้เทคนิคทางโฟลไซโตเมทรีโดยการวัดการปรากฏของโมเลกุล CD69 ซึ่งเป็น early activation marker ที่จะปรากฏขึ้นบนผิวของทีลิมโฟไซต์, บีลิมโฟไซต์, เอ็นเคเซลล์, นิวโทรฟิล หลังถูกกระตุ้นเพียง ๒-๓ ชั่วโมง ซึ่งสามารถใช้ทดสอบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ ที่มีต่อสารกระตุ้นได้[๑๓].

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำจากสปอร์ของเห็ดหลินจือสายพันธุ์ G9 ที่ไม่กะเทาะ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มาจากประเทศจีนนั้น สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ได้ดีที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ G2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้เพียงประมาณครึ่งหนึ่งเท่านั้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ G9 (สารสกัดน้ำ: ๑๑.๘๗% (G2) เทียบกับ ๒๖.๒๑ %(G9), สารไม่ละลายในน้ำ: ๔.๕๕% (G2) เทียบกับ ๘.๑๖ % (G9)).

จากการวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบ ซึ่งตรงกับผลการวิจัยอื่น ๆ ก่อนหน้านี้[๘,๑๔] โดยพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งได้จากสารสกัดน้ำนั้น มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-10, TNF-α, IL-1β, IL-6 และ IL-2 จากโมโนนิวเคลียเซลล์[๑๕] กระตุ้นการแบ่งตัวและการสร้าง IL-1, IL-2 และ IFN-γ จากเซลล์ม้ามหนู[๑๖] ซึ่งฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันนี้ยังเกี่ยวเนื่องไปถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดหลินจือ โดยเป็นผลมาจากไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้น เช่น IL-1β, IL-6, TNF-α และ IFN-γ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้.

การตอบสนองของทีลิมโฟไซต์โดยการปรากฏของโมเลกุล CD69 บนผิวเซลล์นั้น สามารถทำให้เกิดการตอบสนองอื่น ๆ ของทีลิมโฟไซต์ตามมา โดย CD69 ทำหน้าที่เป็น costimulatory molecule สามารถกระตุ้นให้ เกิดการแบ่งตัวของทีลิมโฟไซต์และหลั่ง IL-2, TNF-α และ IFN-γ[๑๗,๑๘] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า CD69 ยังมีบทบาทเป็น immunoregulatory molecule โดยมีความสัมพันธ์กับการสร้าง transforming growth factor-β (TGF-β)[๑๙] ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์, การจำแนกชนิด, การตายแบบ apoptosis ของเซลล์, ลดการสร้าง proinflammaory cytokines ซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องเป็นอย่างมากกับกลวิธานต้านมะเร็ง.

โดยข้อมูลที่ค้นพบในการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะสามารถนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกหรือปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาการนำเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือในประเทศไทยไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. คุณบุญใจ ลิ่มศิลา และทีมงาน ได้ช่วยเหลือประสานงานต่าง ๆ เป็นอย่างดี.

เอกสารอ้างอิง

๑. Yue GGL, Fung K, Leung P, Lau CBS. Comparative studies on the immunomodulatory and antitumor activities of the different parts of fruiting body of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma spores*. Phytother Res 2008;22:1282-91.

๒. Muller C, Kumagai T, O'Kelly J, Seeram NP, Heber D, Koeffler HP. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. Leuk Res 2006;30:841-8.

๓. Hong KJ, Dunn DM, Shen CL, Pence BC. Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells. Phytother Res 2004;18:768-80.

๔. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. Nutr Cancer 2004;49:209-16.

๕. Cao QZ, Lin ZB. *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. Life Sci 2006;78:1457-63.

๖. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*. J Biol Chem 1989;264:472-8.

๗. Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of Ganoderma lucidum: mechanism of action and isolation of an active substance. Anticancer Res 2002;22:3309-18.

๘. Bao XF, Wang XS, Dong Q, Fang JN, Li XY. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry 2002;59:175-81.

๙. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, et al. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int J Cancer 1997;70:699-705.

๑๐. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350-6.

๑๑. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. Anal Biochem 1973;54:484-9.

๑๒. Yamada H, Sun XB, Matsumoto T, Ra KS, Hirano M, Kiyohara H. Purification of anti-ulcer polysaccharides from the roots of Bupleurum falcatum. Planta Med 1991;57:555-9.

๑๓. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. Cytometry 1995;20:127-33.

๑๔. Bao XF, Wang XS, Dong Q, Fang JN, Li XY. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry. 2002;59(2):175-81.

๑๕. Mao T, van De Water J, Keem CL, Stern CS, Hackman R, Gershwin ME. Two mushrooms, Grifola frondosa and *Ganoderma lucidum,* can stimulate cytokine gene expression and proliferation in human T-lymphocytes. Int J Immunother 1999;15:13-22.

๑๖. Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH. Studies on the immune-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharide: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorg Med Chem 2002;10:1057-62.

๑๗. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. J Exp Med 1988;168:1621-37.

๑๘. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yagiie E, et al. Tumor necrosis factor-a production induced in T lymphocytes through the AIMICD69 activation pathway. Eur J Immunol 1992;22:1253-59.

๑๙. Sancho D, Gómez M, Viedma F, Esplugues E, Gordón-Alonso M, García-López MA, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-β production in collagen-induced arthritis. J Clin Invest 2003;112:872-82.

Abstract

Immunomodulatory Activities of *Ganoderma lucidum* and Spores

Kasama Sukapirom*, Noppamas Soonthornchareonnon, Yenchit Techadamrongsin*****
Kovit Pattanapanyasat*

**Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University*
***Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University*
****Southeast Asian Institute of Thai-Chinese Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health*

Ganoderma lucidum **(lingzhi) is a medicinal mushroom that possesses immunomodulatory and anti-tumor effects. In Thailand, *G. lucidum* products are widely used as health-promoting agents but most of the products are imported. The aim of this study was to determine the immunomodulatory effects of various strains of *G. lucidum* grown in Thailand or imported. Flow cytometric measurement of early activation molecule CD69 expression on T lymphocytes showed that the water extract and water-insoluble fraction of unbroken spores of *G. lucidum* strain G9 (imported from China) at 100 μg/ml concentration gave the highest T lymphocytes proliferative responses, while the Thai-grown strain G2 could induce only 50 percent responses when compared with G9. The results from this preliminary study can be used in decision-making for *G. lucidum* strain selection and development in Thailand.**

Key words: ***Ganoderma lucidum,*** **spore, immunomodulatory, T lymphocytes, CD69**