



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูล
ทารกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Screening and Studies the Activities of Lactic Acid Probiotic Bacteria
from Infant Feces on Inhibiting Proliferation of Colon Cancer Cells

โดย

นายมงคล ธิรบุญยานนท์ และ นางเพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2554



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลทารกที่มี
ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
Screening and Studies the Activities of Lactic Acid Probiotic Bacteria from Infant
Feces on Inhibiting Proliferation of Colon Cancer Cells

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552 - 2553
จำนวน 635,000 บาท

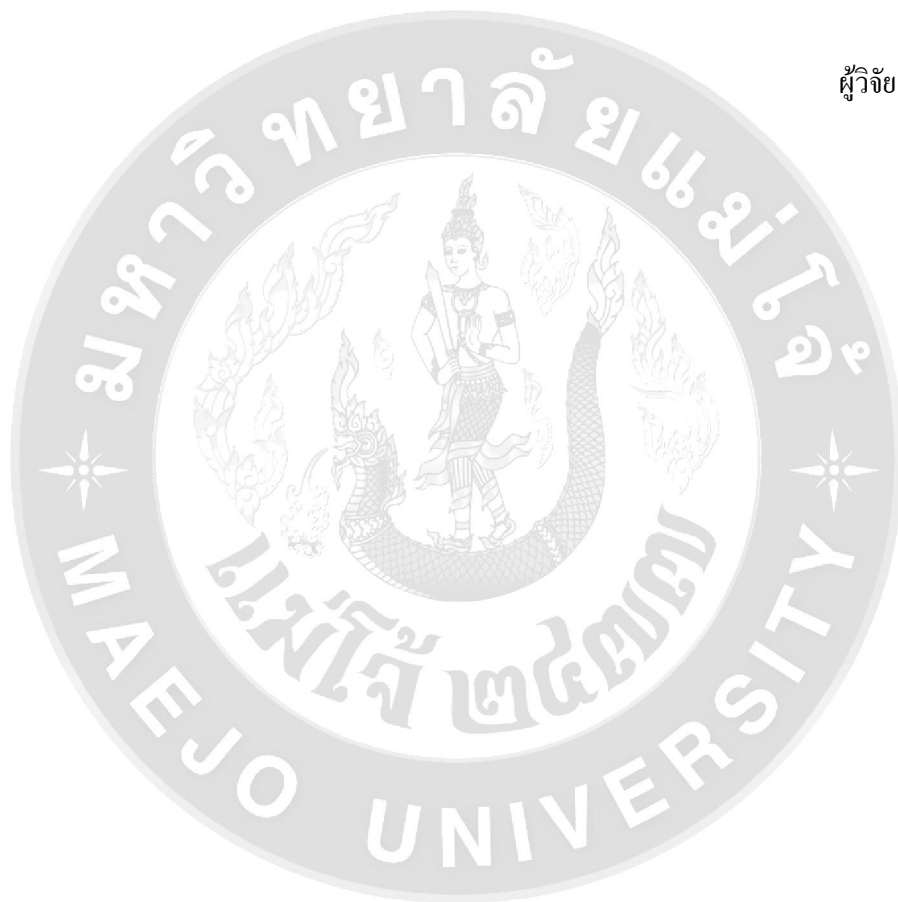
หัวหน้าโครงการ นายมงคล อธิบุญยานนท์
ผู้ร่วมโครงการ นางเพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
31/มีนาคม/2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลทารกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ได้ดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2552 – 2553 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์ผลการวิจัย	26
สรุปผลการวิจัย	31
เอกสารอ้างอิง	32

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลทารกต่อการยับยั้ง การเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์	19
ตารางที่ 2	ผลของแบคทีเรียทดสอบต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการ ต้านยาปฏิชีวนะ	20



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง	21
ภาพที่ 2	อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทนต่อเกลือ น้ำเค็มที่ 0.3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง	22
ภาพที่ 3	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่ คัดเลือกมาจากมูลทารก โดยใช้วิธีการแบบ MTT	23
ภาพที่ 4	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่ คัดเลือกมาจากมูลทารก โดยใช้ลักษณะแบคทีเรียแบบ CM โดย วิธีการทดสอบแบบ Trypan blue	24
ภาพที่ 5	อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่คัด เลือกมาจากมูลทารก โดยใช้ลักษณะแบคทีเรียแบบ LWC โดยวิธี การทดสอบแบบ Trypan blue	25
ภาพที่ 6	อัตราการยึดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูล ทารกกับเซลล์มะเร็งลำไส้	25
ภาพที่ 7	ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด acetic acid ของโปรไบโอติก แบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก	26
ภาพที่ 8	ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด propionic acid ของโปรไบโอติก แบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก	27
ภาพที่ 9	ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด butyric acid ของโปรไบโอติก แบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก	28

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลทารกที่มี
ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Screening and Studies the Activities of Lactic Acid Probiotic Bacteria from Infant
Feces on Inhibiting Proliferation of Colon Cancer Cells

นายมงคล ธิราบุณยานนท์ และ นางเพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร

Mongkol Thirabunyanon and Penrut Hongvitayakorn

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การคัดเลือกและการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากมูลทารกในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ จากการคัดแยกแบคทีเรียจากมูลทารกที่มีสุขภาพดี มีอายุอยู่ในช่วง 1 – 14 วัน จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่าสามารถรวบรวมแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปร่างเป็นทั้งแบบท่อนหรือแบบกลมได้จำนวน 81 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดไปทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย อาทิเช่น การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 ชนิด การไม่ย่อยสลายเม็คลีแดง และการทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและกลีอน้ำดี ผลการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียเพียง 15 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี จากการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียเหล่านี้ ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยวิธีการแบบ MTT และ Trypan blue exclusion พบว่ามีโปรไบโอติกแบคทีเรียเพียง 4 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีประมาณ 17 – 35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำ โปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดีเหล่านี้ มาจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์โดยการเปรียบเทียบลำดับ 16S rRNA ผลจากการตรวจสอบสายพันธุ์และทำการตั้งชื่อโปรไบโอติกแบคทีเรียเหล่านี้ว่าเป็นสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* FP3, *Lactobacillus salivarius* FP35,

Lactobacillus salivarius FP25 และ *Enterococcus faecium* FP51 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เล็ก พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเข้ายึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้และผลิตหรือหลั่งกรดไขมันสายสั้นในกลุ่ม acetic, propionic และ butyric โดยไปกระตุ้นทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ตาย

โปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองในครั้งนี้ คาดหวังว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้เป็นอย่างดี

Abstract

The aims of this study were to evaluate the activities of lactic acid probiotic bacteria isolated from infant feces in order to protection and/or biotherapy of colon cancer. Feces samples were summarized from healthy infant of 1- 14 d. Eighties-one isolates of Gram-positive rod or cocci bacteria were obtained. Of only 15 isolates had bacterial probiotic criteria including activities against 8 foodborne pathogens, no blood haemolysis, and tolerances in the human gastrointestinal tract such as pH 2.5 and 0.3% bile salt. There are only 4 isolates from these probiotic bacteria that had an antiproliferation of colon cancer cells by using MTT and Trypan blue exclusion assay as the rates of 17 – 35%. Comparison of 16S rRNA sequences of these 4 bacterial probiotic isolates showed that they are genera of *Pediococcus pentosaceus* FP3, *Lactobacillus salivarius* FP35, *Lactobacillus salivarius* FP25 and *Enterococcus faecium* FP51. The modes of action of these potential probiotic on antiproliferation of colon cancer cells are direct adhere to colon cancer cells and produce short chain fatty acids including acetic acid, propionic acid and butyric acid that inducing death of the colon cancer cells.

This study suggested that these probiotic bacteria could be used for protection and/or biotherapy of colon cancer.

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์เรานั้น มักจะมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของเศรษฐกิจหรือสังคมอยู่เสมอๆ เช่นเดียวกับการบริโภคอาหารที่มักจะเห็นการรับประทานอาหารแบบเร่งด่วนเพื่อความสะดวกหรือประหยัดเวลาในการทำกิจกรรมอื่น แต่อย่างไรก็ตามกลุ่มของอาหารเหล่านี้มักขาดหลักโภชนาการที่เหมาะสมต่อร่างกายของผู้บริโภค การที่มนุษย์เราบริโภคอาหารประเภทนี้อยู่อย่างต่อเนื่องเรื่อยมาจะส่งผลให้เกิดโรค หรือมีความผิดปกติต่อร่างกายเกิดขึ้นหลายชนิด โรคมะเร็งลำไส้ (colon cancer) เป็นหนึ่งในกลุ่มของโรคที่มีสาเหตุหลักๆ จากการบริโภคอาหารที่ขาดหลักโภชนาการดังกล่าว Bingham (1999) รายงานถึงภาวะเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ที่เกิดจากการรับประทานอาหารประเภทไขมันหรืออาหารที่มีเนื้อแดงมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Guarner and Malagelada (2003) ที่พบว่าการรับประทานอาหารไขมันหรือเนื้อแดงโดยไม่รับประทานผักหรือผลไม้ นั้น จะส่งผลให้แบคทีเรียในลำไส้สร้างสาร N. nitroso และ heterocyclic aromatic amines ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งขึ้นมา อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งนั้นมีสูงมากขึ้นทุกๆ ปี ในปัจจุบันก็เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการเสียชีวิตมากที่สุดซึ่งสูงกว่าอุบัติเหตุ ในขณะที่วัยกันมะเร็งลำไส้ดังกล่าวก็ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในอันดับต้นๆ ของโรคมะเร็งทั้งหมด นอกจากนี้แล้วจะพบว่าทรัพยากรที่นำมาใช้ในการบำบัดหรือรักษาโรคมะเร็งนั้นนับมีปริมาณจำนวนมาก อาทิเช่น ยาหรือสารเคมี ซึ่งส่วนใหญ่ก็นำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้ในแต่ละปีประเทศของเราจะต้องเสียเงินจำนวนมากในการจัดหาทรัพยากรเหล่านี้ รวมถึงรัฐบาลจะต้องจัดทรัพยากรอื่นมาดูแลคนป่วยเพิ่มเติม เป็นต้น

โพรไบโอติก (probiotic) หมายถึงอาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายแล้วจะช่วยให้ร่างกายผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนั้นอาจจะช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้ (Salminen *et al.*, 1998) ในปัจจุบันนักวิจัยได้ศึกษาและคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นหัวเชื้อหมักในผลิตภัณฑ์นม อาทิเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มอรรถประโยชน์ให้กับผู้บริโภคอาหารดังกล่าวมากที่สุด การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการป้องกัน หรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ นั้นก็อยู่ในความสนใจของนักวิจัย ถึงแม้บทบาทของโพรไบโอติกแบคทีเรียในการป้องกันหรือรักษามะเร็งลำไส้จะมีการศึกษาในต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการในการคัดเลือก เพื่อให้ได้เชื้อโพรไบโอติกชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติยับยั้งมะเร็งลำไส้ นั้นยังไม่มีวิธีการที่เด่นชัด ส่วนในประเทศไทยเรานั้น การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าวมีน้อยมากทั้งที่เรื่องนี้มีความสำคัญต่อประชาชนอย่างสูง ด้วยเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยพยายามศึกษาและคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยดัดแปลงเทคนิคการเพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งลำไส้ร่วมกับเชื้อโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้หากผลการวิจัยเป็นไปตามความคาดหวัง ผู้วิจัยสามารถนำเชื้อโปรไบโอติกไปประยุกต์ใช้ให้กับประชาชนในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดการนำเข้ายาที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ และสามารถทำให้ประชาชนมีสุขภาพแข็งแรงดีขึ้นกว่าปกติได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจากมูลทารก
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ในงานวิจัยเรื่องนี้ จะสามารถพัฒนาจากระดับรากฐานของประเทศในด้านสาธารณสุข และความอยู่ดีมีสุขของประชาชน เนื่องจากคนไทยป่วยเป็นโรคมะเร็งลำไส้กันมากขึ้น โดยที่มะเร็งลำไส้นี้เป็นสาเหตุการตายในอันดับต้นๆ ของคนไทย ทั้งนี้ก็มีสาเหตุอันเนื่องมาจากคนไทยมีสุขภาพลักษณะในการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกต้อง ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งลำไส้สามารถรักษาได้โดยการผ่าตัด รังสีรักษา และเคมีบำบัด แต่เนื่องจากการใช้วิธีการเหล่านี้รักษา จะทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นวิธีการใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในการป้องกันและบำบัดโรคที่มีราคาสูงและปลอดภัยต่อผู้บริโภค พร้อมกันนั้นหากเรานำโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือพัฒนาในเชิงพาณิชย์ อาทิเช่น นมเปรี้ยว นมหมัก โยเกิร์ต และเนยแข็ง ก็จะเป็นการส่งเสริมให้ประชาชนทั่วไปได้รับประทานผลิตภัณฑ์ที่ดีในราคาที่ย่อมเยา และที่สำคัญสามารถป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ได้อีกทางหนึ่งด้วย

การตรวจเอกสาร

มะเร็งลำไส้ (colon cancer) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันของประชากรแถบยุโรป โดยเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 3 ในผู้ชายที่พบรองจาก มะเร็งอัณฑะ และปอด ในขณะที่พบเป็นมากอันดับที่ 2 รองจากมะเร็งเต้านมในผู้หญิง (McCann *et al.*, 2007) เช่นเดียวกับกับประชากรในประเทศไทยของเราที่พยายามเลียนแบบการบริโภคอาหารตามชาวตะวันตกมากขึ้นทุกวัน ก็พบอัตราเสี่ยงจากโรคมะเร็งลำไส้มากขึ้นทุกๆ ปีตามไปด้วย การเกิดโรคมะเร็งลำไส้หรือการพัฒนาการของมะเร็งลำไส้ นั้นพบว่ามีหลายขั้นตอน แต่จะมีจุดเริ่มต้นตรงที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีน oncogenes และ tumor suppressor genes ซึ่งจะนำไปสู่การเริ่มต้นเป็นมะเร็งในที่สุด (Fearon and Vogelstein, 1990) กระบวนการป้องกันหรือรักษานั้น นักวิจัยพยายามศึกษาวิจัยหาวิธีการในการป้องกันและรักษามะเร็งลำไส้อย่างกว้างขวาง วิธีการใหม่ๆ ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีซึ่งมีเหตุจากผลข้างเคียงหรือสารเคมีสะสมในร่างกาย ดังนั้นสมุนไพรหรือสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกอันดับต้นๆ ในการศึกษาว่ามีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้อย่างไรบ้าง ดังเช่นผลิตภัณฑ์จากองุ่นผสมกับถั่ว (Lusso *et al.*, 2004) ผลิตภัณฑ์ชื่อ resveratrol สารสกัดจากองุ่นและไวน์ (Schneider *et al.*, 2000) ผลิตภัณฑ์จากแอปเปิ้ล (McCann *et al.*, 2007) ผลิตภัณฑ์จากถั่ว (Bawadi *et al.*, 2005) หรือสมุนไพร (Russo *et al.*, 2005) เป็นต้น

โปรไบโอติกแบคทีเรีย และหรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประโยชน์และได้การประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางนั้นก็มีการศึกษาผลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้เช่นเดียวกัน เนื่องจากโปรไบโอติกนั้น หากเราบริโภคแล้วก็จะอยู่ในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นแหล่งที่เกิดมะเร็งลำไส้ นั่นเอง และที่สำคัญโปรไบโอติก เหล่านี้ไม่มีพิษเช่นเดียวกันกับสมุนไพร จากการศึกษานี้ของ Salminen *et al.* (1998); Zabala *et al.* (2001) ได้รายงานถึงผลของ แลคติกแอคซิคแบคทีเรียว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ นอกจากนั้น โปรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus polyfermenticus* SCD ก็สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้เช่นเดียวกัน (Lee *et al.*, 2007) ถึงแม้จะมีรายงานว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ แต่ก็มีน้อยชนิดมาก เช่นพบเฉพาะ HN1 และ HA8 เท่านั้นที่ทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อที่ทดสอบจำนวน 20 ไอโซเลต (Zabala *et al.*, 2001) และนอกจากนั้นกลไกของโปรไบโอติกที่มีผลต่อโรคมะเร็งลำไส้ นั้นก็ยังไม่ชัดเจน แต่สามารถสรุปถึงกลไกในการยับยั้งมะเร็งลำไส้ในเบื้องต้นได้ดังนี้ การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ การเปลี่ยนแปลงขบวนการสรีระหรือเคมีในลำไส้ การจับหรือทำลายสารก่อมะเร็งในลำไส้ และการ

ผลิตสารต่อต้านการสังสารก่อมะเร็ง (Hirayama and Rafter, 2000; Wollowski *et al.*, 2001; Rafter, 2003; 2004) เป็นต้น

ด้วยข้อดีหลายประการของโปรไบโอติกแบคทีเรียในการป้องกันและหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามศึกษาผลของโปรไบโอติกและหรือกลไกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์หรือโรคมะเร็งลำไส้กันต่อไปอย่างแน่วแน่ ทั้งนี้เพื่อนำผลที่ได้มาป้องกันและหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ให้กับประชาชนในประเทศไทยของพวกเราในขั้นตอนสุดท้าย



อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1. ตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก

1.1.1. ตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกที่มีอายุอยู่ระหว่าง 1-14 วัน จากโรงพยาบาลแม่และเด็ก จังหวัด เชียงใหม่ จำนวน 17 ตัวอย่าง

1.2. เซลล์ต้นตอของเซลล์มะเร็งลำไส้

2.1.1. เซลล์ Caco-2 (CLS, Germany)

1.3. แบคทีเรียก่อโรคที่นำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ

1.3.1. *Escherichia coli* TISTR 780

1.3.2. *Salmonella typhimurium* TISTR 292

1.3.3. *Staphylococcus aureus* TISTR 118

1.3.4. *Salmonella enteritidis* DMST 15676

1.3.5. *Bacillus cereus* TISTR 121

1.3.6. *Listeria monocytogenes* DMST 1783

1.3.7. *Vibrio cholera* DMST 2873

1.3.8. *Helicobacter pylori* DMST 20165

1.4. อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1.4.1. อาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco™)

1.5. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.5.1. อาหารแข็งสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS) (Criterion, USA)

1.5.2. อาหารเหลวสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (Criterion, USA)

- 1.5.3. อาหารแข็งสูตร Brain heart infusion (BHI) (Scharlau, Spain)
- 1.5.4. อาหารกึ่งเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)
- 1.5.5. อาหารเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)

1.6. สารเคมี

- 1.6.1. Sodium chloride (NaCl) (Merk, Germany)
- 1.6.2. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merk, Germany)
- 1.6.3. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) (Ajax Finechem, Austraria)
- 1.6.4. Emulsion oil (Merk, Germany)
- 1.6.5. Bile salt (Sigma, USA)
- 1.6.6. Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)
- 1.6.7. Trysin EDTA (Hyclone, USA)
- 1.6.8. Absolute ethanol (Merk, Germany)
- 1.6.9. Glycerol (Merk, Germany)
- 1.6.10. Hydrochloric acid (Merk, Germany)
- 1.6.11. Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merk, Germany)
- 1.6.12. Sodium hydroxide (Merk, Germany)
- 1.6.13. Fetal calf serum (Hyclone, USA)
1. 6.14. Non-essential amino acid (Hyclone, USA)
- 1.6.15. Triton-X 100 (Merk, Germany)
- 1.6.16. ยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml and 10,000 $\mu\text{g/ml}$) (Hyclone, USA)
- 1.6.17. ชุดย้อมแกรม (gram's stain set) (Bio-Medical Laboratory, Thailand)
- 1.6.18. ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Mobio DNA extraction kit)
- 1.6.19. Master mix (Promega, USA)
- 27F (forward primer) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
- 520R (reverse primer) 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3'

- 1.6.20. ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPREC™-PCR, Japan)
- 1.6.21. Loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
- 1.6.22. O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
- 1.6.23. เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)
- 1.6.24. Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 1.6.25. พงู้นอะกาโรส

1.7. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.7.1. สเตปโครโฟโตมิเตอร์
- 1.7.2. เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 1.7.3. เครื่องเย้า
- 1.7.4. เครื่องพีซีอาร์ (PCR Sprint Thermal Cycler, ยี่ห้อ Thermal hybrid รุ่น Sprint)
- 1.7.5. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Digital Balance, ยี่ห้อ OHAUS)
- 1.7.6. ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Memmert, Germany)
- 1.7.7. ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ, Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)
- 1.7.8. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator, ยี่ห้อ Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)
- 1.7.9. ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115 (E2), USA)
- 1.7.10. ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240 (E2), USA)
- 1.7.11. ตู้เป่าเชื้อ (Horizontal type laminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)
- 1.7.12. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)
- 1.7.13. ตู้ฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
- 1.7.14. กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500)
- 1.7.15. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope, Olympus, ULWCD 0.30)
- 1.7.16. พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)

1.7.17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath/Unstirred digital bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechnik GMBH รุ่น TW12)

1.7.18. ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)

1.7.19. ไมโครปิเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร

1.7.20. Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)

1.7.21. ห่วงถ่วงเชือก (loop)

1.7.22. ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.23. Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร

1.7.24. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)

1.8. ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์และภาชนะอื่น

1.8.1. ขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.8.2. ถาดหลุม 24 หลุม

1.8.3. ถาดหลุม 96 หลุม

1.8.4. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

1.8.5. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร

1.8.6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

1.8.7. ปีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.8.8. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2. วิธีการวิจัย

2.1. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย

2.1.1. การคัดแยกและเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระของเด็กทารกที่มีสุขภาพดี ซึ่งมีอายุอยู่ระหว่าง 1-14 วัน จากโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ 17 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนการแยกเริ่มจากการนำอุจจาระเด็กทารกที่ถูกเก็บในหลอดทดลองที่ทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำ 1 กรัมมาทำการเจือจางในน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็นลำดับขั้น (serial dilution) แล้วนำ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) บนอาหาร

แข็ง MRS agar บ่ม 48 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจะทำการเลือกส้อมเอกลักษณ์โคโลนีที่แตกต่างกันจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อจานละ 5 โคโลนี มาทำให้บริสุทธิ์โดยการจีด (streak) บนอาหารแข็ง MRS agar จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย้อมแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรมและศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคัดเลือกลักษณะแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลม จากการคัดแยกเชื้อในขั้นตอนนี้สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต ทำการเก็บเชื้อที่แยกได้ใน กลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบขั้นต่อไป

2.1.2. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

นำทั้ง 81 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้มาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Helicobacter pylori* DMST 20165, *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella enteritidis* DMST 15676, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TIRTS 118, *Listeria monocytogenes* DMST 1783 และ *Vibrio cholera* DMST 5655 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคในอาหารเหลวสูตร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการทดสอบโดยเทอาหารแข็งสูตร MRS ลงไปในเพลท 10 มิลลิลิตร จากนั้นเททับด้วยอาหารวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร BHI ที่มีความเข้มข้นเชื้อก่อโรค 10^5 CFU/ml จากนั้นทำการเจาะหลุมบนอาหารด้วยเครื่องเจาะจุกไม้คอร์ก (cork borer) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบลงไปในหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และอาหารเหลวสูตร MRS เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกวงใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อก่อโรค การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.1.3. ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการต้านทานยาปฏิชีวนะ

โดยการนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษ การศึกษาการสลายเม็ดเลือดแดงจะทำการทดสอบโดยการนำเชื้อทดสอบขีดลงบนอาหาร columbia blood agar (Sigma) ที่มีการเติมเลือดมนุษย์ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใส

รอบๆ รอยขีด ผลการย่อยสลายเมื่อดูดแดงจะมีหลายลักษณะ อาทิเช่นแบบ β - hemolysis เป็นบริเวณใสรอบโคโลนี การเกิด α - hemolysis เป็นบริเวณสีเขียวรอบโคโลนี การเกิด γ - hemolysis ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี คือไม่มีการย่อยสลายเมื่อดูดแดง การทดสอบการย่อยสลายของเมื่อดูดแดงจะทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disc diffusion โดยการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเกลี่ยหาเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร MRS agar นำ antibiotic disc (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) วางบนอาหารที่เกลี่ยหาเชื้อที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ antibiotic disc กลุ่มของยาปฏิชีวนะที่ใช้คือ chloramphenicol (30 μ g), ampicillin (10 μ g), erythromycin (15 μ g), tetracycline (30 μ g) และ kanamycin (30 μ g) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.1.4. ศึกษาการทนต่อกรดและเกลือ

การทดสอบการทนต่อกรดและเกลือ นั้น เป็นการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ทดสอบว่าจะมีความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารหรือไม่ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารนั้นมีทั้งสภาวะที่เป็นกรดและเกลือ ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารตายลงได้ โดยการทดสอบการทนต่อกรดนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Pennacchia *et al.* (2004) โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร เติมนลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 2.5 ที่ปรับค่าพีเอชด้วย HCL 5 N ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 3 ชั่วโมง แล้วหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ 0 และ 3 ชั่วโมง โดยวิธีเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง MRS agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการทดสอบการทนต่อสภาวะของเกลือจะทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีการของ Gilliland *et al.* (1984) และ Pennacchia *et al.* (2004) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร เติมนในอาหาร MRS broth ที่มีการเติมเกลือ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ 0 และ 24 ชั่วโมง โดยวิธีเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง MRS agar โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2. การศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

2.2.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco™) ที่มี fetal calf serum 10 เปอร์เซ็นต์ (Hyclone, Logan, Utah, USA) โดยทำการ inactivated ที่ 56°C นาน 30 นาที ยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) 1% และ non-essential amino acid (Hyclone) 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะเติบโตเต็มที่ จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยวิธีการที่ใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA ย่อยเซลล์ให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ ทำการเติมลงในภาชนะหลอดขนาด 24 หรือ 96 หลุม เพื่อทำการทดสอบขั้นตอนต่อไป

2.2.2. การเตรียมแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปแบบที่มีชีวิต (live whole cell, LWC) และสารเมตาบอไลต์ที่โปรไบโอติกแบคทีเรียผลิตขึ้นมา หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าน้ำที่ใช้เลี้ยงโปรไบโอติกแบคทีเรีย (cultured medium, CM หรือ supernatant)

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การแยก LWC และ CM โดยทำการนำเอาอาหารที่มีแบคทีเรียที่เจริญอยู่มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใสที่มีสารเมตาบอไลต์ (supernatant) ของแบคทีเรียออกมา นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ที่มีขนาดรูกรองประมาณ 0.2 ไมโครเมตร เก็บในหลอดเก็บขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการทดสอบต่อไป

2.2.3. การยับยั้งการเจริญเซลล์ของมะเร็งลำไส้

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบด้วยวิธี MTT และวิธี Trypan blue exclusion โดยทำการทดลองตามวิธีของ Thirabunyanon *et al.* (2009) ในการทดสอบด้วยวิธี MTT ซึ่งใช้สาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT, Sigma) ในการทดสอบ โดยเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คูณเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่ม

คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม CM ของแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้น ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยใช้วิธี MTT assay เริ่มจากการล้างเซลล์ที่มี CM ของแบคทีเรีย ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO ในปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ที่ทิ้งไว้นาน 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595nm ซึ่งใช้ กลุ่มควบคุมคือ MRS broth โดยกลุ่มควบคุมให้ผลการเจริญของเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเซลล์} = (\text{sample O.D} / \text{control O.D}) \times 100$$

sample O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

control O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี Trypan blue exclusion โดยทำการเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในภาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม CM ของแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้น หรือแบคทีเรียที่มีชีวิต (LWC) ที่เตรียมได้จากข้างต้น ในภาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยการเติมสีย้อม trypan blue จากนั้นนำไปหยอดลงใน Neubauer haemocytometer เพื่อนำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์} = (\text{เซลล์ที่รอดชีวิต} / \text{เซลล์ทั้งหมด}) \times 100$$

2.3. การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนขงยีน 16S rRNA

จากการคัดเลือกแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโปรไบโอติก แบคทีเรียจึงนำมาจำแนกเชื้อในส่วนขงยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Thirabunyanon *et al.* (2009) โดยทำการสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด Mobio DNA extraction kit จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ คือ 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3') (Operon, Cologne, Germany) ในการเพิ่มปริมาณในส่วนขง 16S rRNA แต่ละปฏิกิริยามีทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย MasterMix (Eppendorf, New York, USA) 25 ไมโครลิตร ไพเมอร์ 27F 2 ไมโครลิตร ไพเมอร์ 520R 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 17 ไมโครลิตร และ ตัวอย่างขง genomic DNA 4 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง PCR (Sprint Thermal Cycler) โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 25 รอบขง 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที สุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลจากการทำ PCR 5 ไมโครลิตร โดยผสมกับ loading dye (Fermentas, Maryland, USA) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบขนาดขง DNA ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แล้วนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) จากนั้นนำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วย UV illumination จากนั้นทำการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC-PCR ทำการหาลำดับเบสขงยีนในส่วน 16S rRNA โดยบริษัท First Base Laboratories Company ประเทศมาเลเซีย นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ขง The National Center for Biotechnology Information; NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.4. การยัดเกาะขงโปรไบโอติกแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้

2.4.1. การเตรียมเซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งลำไส้ที่จะนำไปใช้ได้ต้องปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรค และเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มที่โดยดูจากเซลล์จะยัดเกาะบริเวณพื้นที่ด้านล่างขงขวดเลี้ยงเซลล์เป็นชั้นเดียว จากนั้นนำ Trypsin EDTA จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเทบนเซลล์แล้วกระจายให้ทั่วเซลล์ เพื่อย่อยเซลล์ที่ติดขวดให้แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์ไปล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ไปตรวจนับจำนวน โดยการ

ย้อมด้วยสี Trypan blue แล้วนับด้วย Haemocytometer แล้วทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

2.4.2. การเตรียมโปรไบโอติกแบคทีเรีย ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS เช่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจะนำแบคทีเรียมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.50 A นำแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที แล้วล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง โดยปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร DMEM เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.4.3. การยึดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้ การหาอัตราการยึดเกาะของแบคทีเรียโดยทำตามวิธีการของ Gagnon *et al.* (2004) และ Maragkoudakis *et al.* (2006) โดยการนำเซลล์เซลล์มะเร็งลำไส้ ที่เตรียมไว้ไปหยอดลงในถาดหลุมขนาด 24 หลุม ให้มีปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำการเปลี่ยนอาหารทุก 48 ชั่วโมง ซึ่งจะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เพื่อให้เซลล์โตและยึดเกาะที่ก้นหลุมของถาดหลุม ทำการเปลี่ยนด้วยอาหาร Non-supplemented DMEM ก่อนนำมาวิเคราะห์การยึดเกาะเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดเอาอาหารออก แล้วล้างเซลล์ที่อยู่ก้นหลุมด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 รอบ จึงเติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไป 0.5 มิลลิลิตรในแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้นทำการเติม 0.1% Trion X-100 ในอาหาร DMEM บ่มต่ออีกนาน 5 นาที ทำการนับแบคทีเรียที่มีชีวิตและยึดเกาะเซลล์มะเร็งลำไส้ ด้วยอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ อัตราการยึดเกาะเซลล์มะเร็งลำไส้ของ โปรไบโอติกแบคทีเรีย จะแสดงโดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและแบคทีเรียที่ยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้

2.5. การศึกษาการผลิตกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid; SCFA)

การวิเคราะห์การผลิต SCFA โดยการดัดแปลงจากวิธีการของ Hussain *et al.* (2009) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารเหลวสูตร MRS ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำที่เลี้ยงเซลล์ (supernatant) 10 มิลลิลิตร ในแต่ละตัวอย่างเติมโซเดียมคลอไรด์ 4 กรัม จากนั้นเติมกรด

ซัลฟิวริกความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ 1 มิลลิลิตรของของเหลวในชั้นไดเอทิลอีเทอร์เก็บไว้ในหลอด screw-cap flask

การวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้นที่โปรไบโอติกผลิตได้ จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph; CG (Agilent 6890 series) detector คือ mass spectrometer; MS. (Agilent 5973 series, Palo Alto, CA, USA) โดยใช้ AT-WAX column ยาว 30 เมตร × กว้าง 0.25 มิลลิเมตร × หนา 0.25 ไมโครเมตร (Alltech associates, Deerfield, IL, USA) โดยขั้นตอนการวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้นที่สกัดมาระเหยที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้เข้ากัน นำ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยไดคลอโรมีเทน 970 ไมโครลิตร กรดอะซิติก 10 ไมโครลิตร กรดบิวทริก 10 ไมโครลิตร และกรดโพธิโอนิก 10 ไมโครลิตร ทำให้เข้ากัน จากนั้นนำ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ GC-MS ด้วย split mode ในอัตรา 20 ต่อ 1 โดยสภาวะในการวิเคราะห์กรดไขมันดังนี้ อุณหภูมิ oven เริ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ใช้นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้น 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส โดยมีก๊าซฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราการไหลเป็น 36 เซนติเมตรต่อวินาที และค่า Electron Ionization (EI) ให้พลังงานแก่อิเล็กตรอน คือ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ (eV) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างใช้เวลาทั้งหมด 27.67 นาที จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ฉีดได้ขึ้นมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ SCFA ที่แบคทีเรียโปรไบโอติกผลิตได้

2.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17.0) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ลักษณะรูปร่างสีฐานของแบคทีเรีย

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลของเด็กทารกที่มีสุขภาพดีในครั้งนี้ โดยการเก็บตัวอย่างมูลทารกในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 17 ตัวอย่าง ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกนั้น สามารถคัดแยกได้จำนวน 81 ไอโซเลต โดยคัดเลือกเอาลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลมเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค

จากการนำทั้ง 81 ไอโซเลตมาศึกษาผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าผลการทดสอบของวงใสหรือบริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลตที่ทำการทดสอบ จากการศึกษาพบว่ามีเพียง 15 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งจะนำทั้ง 15 ไอโซเลต นี้ไปทดสอบในขั้นต่อไป นอกจากนี้พบ 2 ไอโซเลต คือ FP25 และ FP35 มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีที่สุด (ตารางที่ 1)

3. ผลของกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการต้านทานยาปฏิชีวนะ

การทดลองการเป็นอันตรายต่อเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ โดยได้นำแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต มาทำการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้งแบบ β และ α -haemolysis แต่ให้การแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นแบบชนิดแกมมา (γ -hemolysis) คือไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (ตารางที่ 2)

การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะทั้ง 15 ไอโซเลตมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, chloramphenicol, erythromycin และ tetracycline และนอกเหนือจากที่กล่าวของยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบบางไอโซเลตก็มีทั้งการไวและต้านทานยาปฏิชีวนะชนิดนั้นๆ เช่น ไอโซเลตที่ FP14, FP47, FP52, FP66, FP70 และ FP78 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด kanamycin ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลตที่ FP3, FP12, FP15, FP25, FP35, FP51 และ FP75 ที่มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิด kanamycin (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลทหารต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์ (Mean $\pm$ SE, n = 3)

แบคทีเรีย	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi-murium</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. cholera</i>
FP3	14.7 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	18.3 $\pm$ 1.2	20.0 $\pm$ 0.6	19.7 $\pm$ 0.9
FP12	14.7 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.6	20.3 $\pm$ 1.5	16.3 $\pm$ 1.5	19.3 $\pm$ 2.7	22.0 $\pm$ 1.5
FP14	14.0 $\pm$ 1.0	13.7 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.6	22.0 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 1.0	20.3 $\pm$ 4.2	22.7 $\pm$ 1.5
FP15	13.3 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 1.7	11.0 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.6	22.3 $\pm$ 1.2	19.7 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 2.7	21.0 $\pm$ 4.0
FP25	15.7 $\pm$ 0.3	18.7 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 0.3	16.7 $\pm$ 0.3	24.7 $\pm$ 0.3	20.3 $\pm$ 0.3	24.0 $\pm$ 0.6	19.3 $\pm$ 0.3
FP35	15.0 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 0.6	18.0 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 0.3	23.7 $\pm$ 0.3	20.0 $\pm$ 0.6	22.7 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 0.3
FP47	15.00 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 1.0	17.7 $\pm$ 1.5	20.3 $\pm$ 0.9	23.0 $\pm$ 0.6
FP51	13.7 $\pm$ 0.9	18.0 $\pm$ 1.0	15.0 $\pm$ 0.0	11.7 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 0.9	17.7 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 1.2
FP52	12.0 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	22.0 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 0.7	18.7 $\pm$ 3.2
FP60	11.7 $\pm$ 0.3	18.0 $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 0.0	14.7 $\pm$ 1.2	23.7 $\pm$ 0.9	16.7 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.0	22.3 $\pm$ 0.3
FP64	13.0 $\pm$ 0.0	13.3 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 1.2	17.3 $\pm$ 1.2	17.0 $\pm$ 2.1	18.3 $\pm$ 0.9
FP66	13.0 $\pm$ 0.0	21.0 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 0.0	11.7 $\pm$ 0.3	19.0 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 1.0	11.7 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 2.4
FP70	13.0 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 0.0	20.7 $\pm$ 1.3	14.0 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 0.0	20.3 $\pm$ 3.7
FP75	12.3 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 2.3	14.7 $\pm$ 0.3	16.0 $\pm$ 1.5	21.7 $\pm$ 0.9	19.0 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 1.5	23.3 $\pm$ 0.7
FP78	12.3 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3	21.0 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3	16.3 $\pm$ 2.0

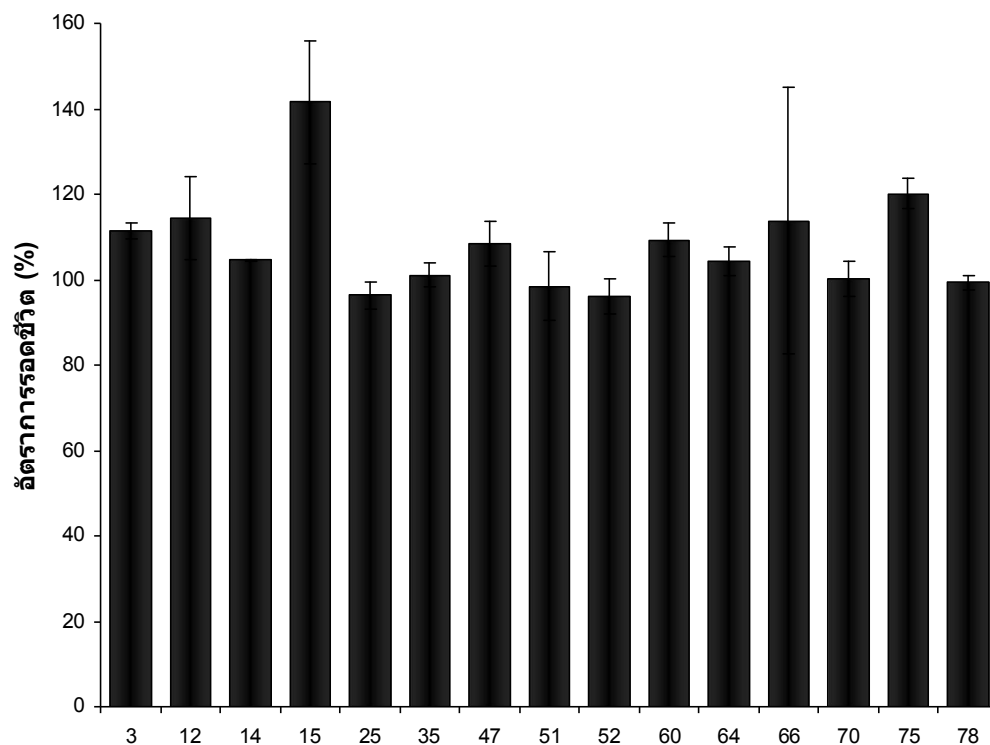
4. ผลการทนของแบคทีเรียต่อกรดและเกลือน้ำดี

จากผลการทดสอบการทนอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าทั้ง 15 ไอโซเลต มีความสามารถทนอยู่ได้ในแบบจำลองในระบบทางเดินอาหารได้ดี (ภาพที่ 1 และ ภาพที่ 2) ความสามารถในการทนต่อกรดที่พีเอช 2.5 พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการทนและการอยู่รอดได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดดังกล่าว (ภาพที่ 1) เช่นเดียวกับความสามารถในการทนและการอยู่รอดได้ดีในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 2) โดยการอยู่รอดในสภาวะจำลองเหล่านี้สามารถที่จะคาดคะเนถึงการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารได้ดี

ตารางที่ 2 ผลของแบคทีเรียทดสอบต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการต้านยาปฏิชีวนะ

	haemolysis	ยาปฏิชีวนะ				
		Chloramphenicol	Ampicillin	Erythromycin	Tetramycin	Kanamycin
		30 µg	10 µg	15 µg	30 µg	30 µg
FP3	γ	S	S	S	S	R
FP12	γ	S	S	S	S	R
FP14	γ	S	S	S	S	S
FP15	γ	S	S	S	S	R
FP25	γ	S	S	S	S	R
FP35	γ	S	S	S	S	R
FP47	γ	S	S	S	S	S
FP51	γ	S	S	S	S	R
FP52	γ	S	S	S	S	S
FP60	γ	S	S	S	S	S
FP64	γ	S	S	S	S	S
FP66	γ	S	S	S	S	S
FP70	γ	S	S	S	S	S
FP75	γ	S	S	S	S	R
FP78	γ	S	S	S	S	S

หมายเหตุ γ คือ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ γ-haemolysis
 S คือ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ
 R คือ มีความต้านทานยาปฏิชีวนะ



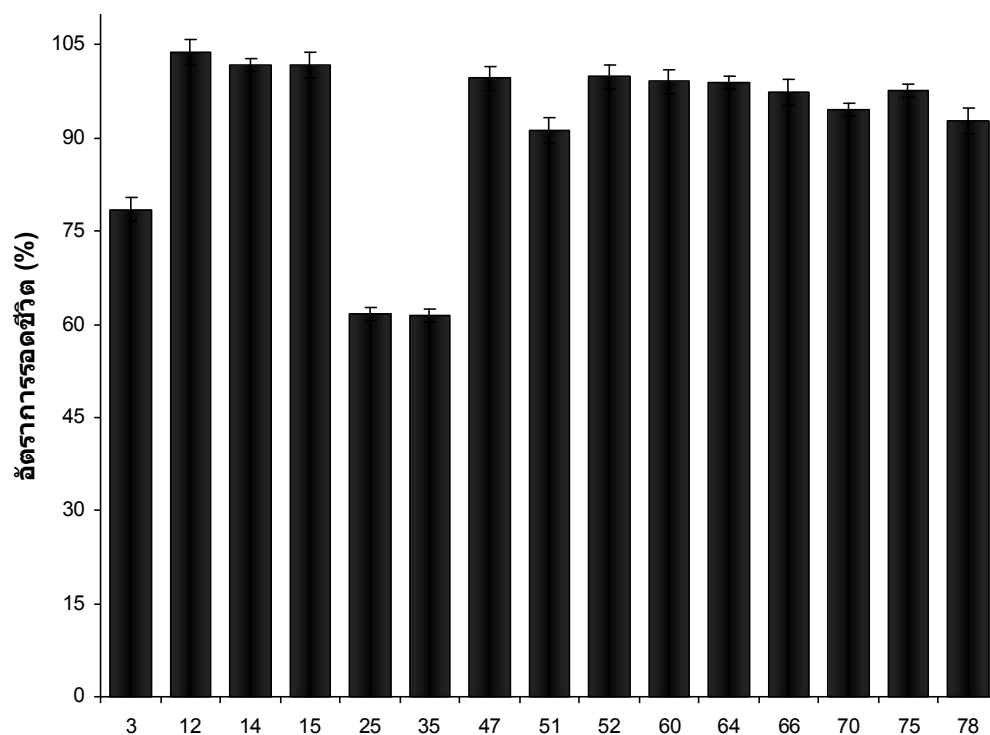
ภาพที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง (Mean $\pm$ SE, n = 3)

5. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ทั้งในส่วนของ CM และ LWC ผลการทดสอบ CM ด้วยวิธีการ MTT พบว่าทั้ง 15 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวพบว่ามีแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ก็คือ ไอโซเลต FP35, FP25, FP3 และ FP51 สามารถยับยั้งมะเร็งลำไส้ได้ 35.3, 25.3, 23.2 และ 17.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ผลที่ได้จะสอดคล้องจากการทดสอบ CM ด้วยวิธี trypan blue exclusion และผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของทั้ง 4 ไอโซเลตดังกล่าว มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P < 0.01$) (ภาพที่ 4)

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในส่วนของ LWC พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าอย่างมี

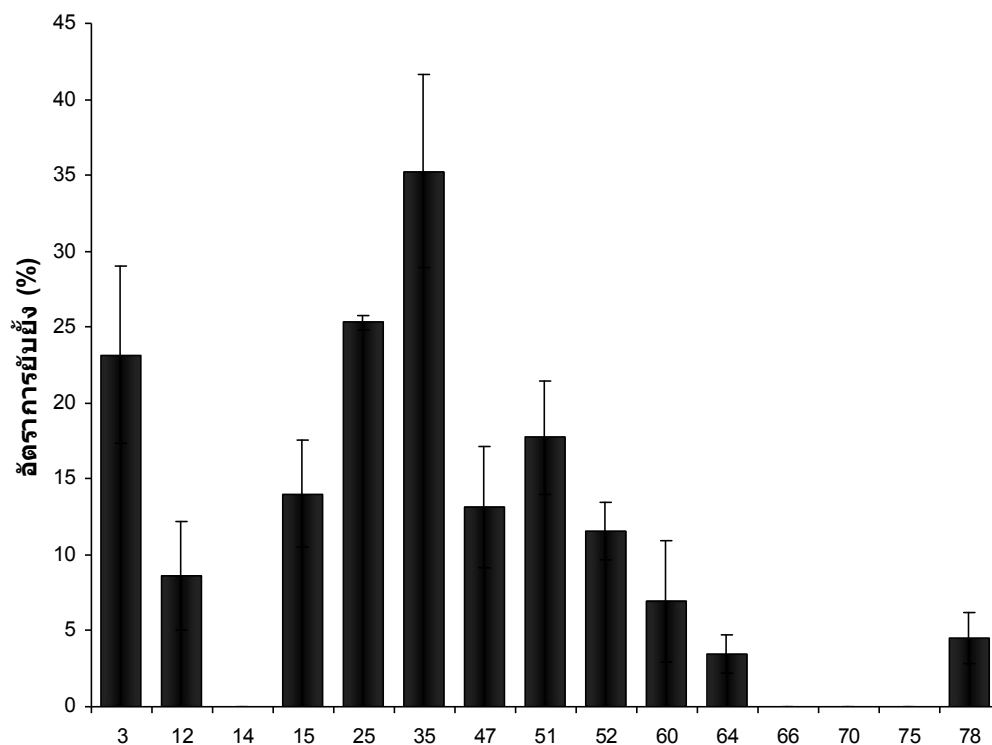
นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 5) ซึ่งผลการทดสอบพบว่า มีอัตราการยับยั้งการเจริญอยู่ในช่วง 20.5 ถึง 33.7 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทนต่อเกลือน้ำดีที่ 0.3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง (Mean $\pm$ SE, n = 3)

6. การจัดจำแนกโปรไบโอติกแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

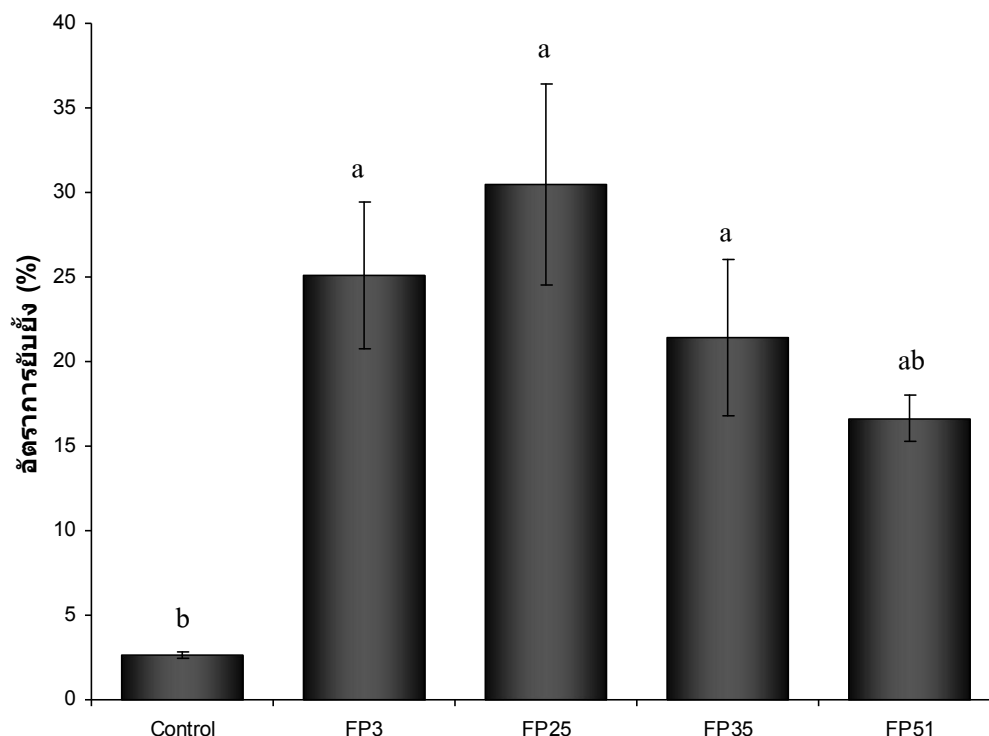
จากการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ 4 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี จึงนำแบคทีเรียเหล่านี้มาจำแนกชนิดโดยการการนำและเปรียบเทียบชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ผลที่ได้พบว่าไอโซเลต FP3 มีความคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 100 เปอร์เซ็นต์ (accession no: EU082192.1) ไอโซเลต FP25 และ FP35 มีความคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus salivarius* 99.8 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (accession no: EU559602.1) ตามลำดับ และไอโซเลต FP51 มีความคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* 99.8 เปอร์เซ็นต์ (accession no: AB362603.1)



ภาพที่ 3 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก โดยใช้วิธีการแบบ MTT (Mean $\pm$ SE, n = 3)

7. ประสิทธิภาพการยึดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้

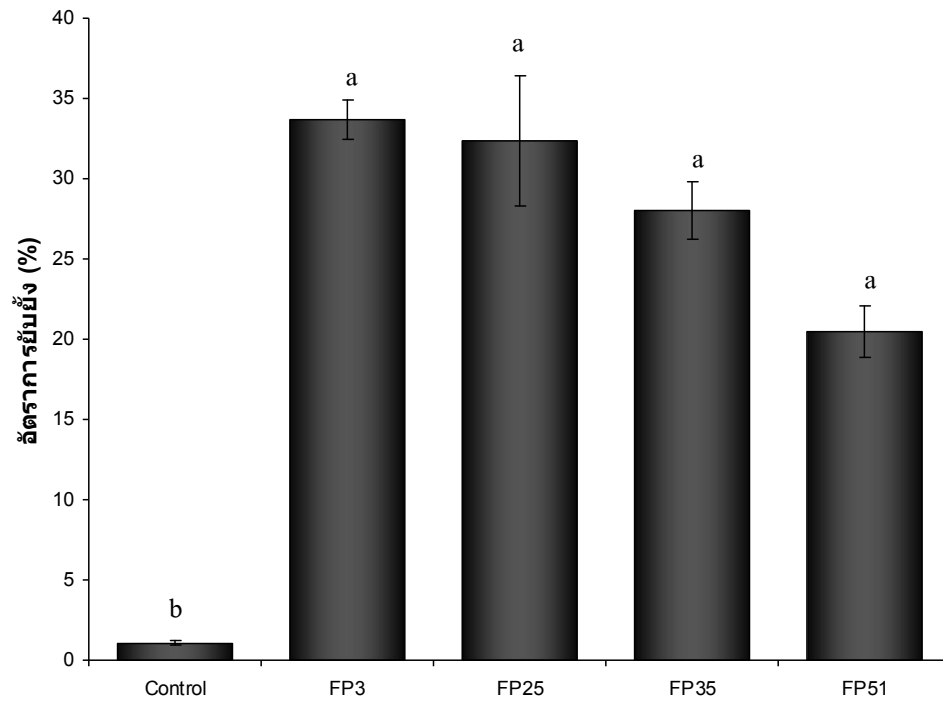
ประสิทธิภาพการยึดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้ (ภาพที่ 6) ผลการทดลองพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความสามารถสูงในการยึดเกาะต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะประมาณ 5 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการยึดเกาะสูงสุดคือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP35, *L. salivarius* FP25 และ *E. faecium* FP51 ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



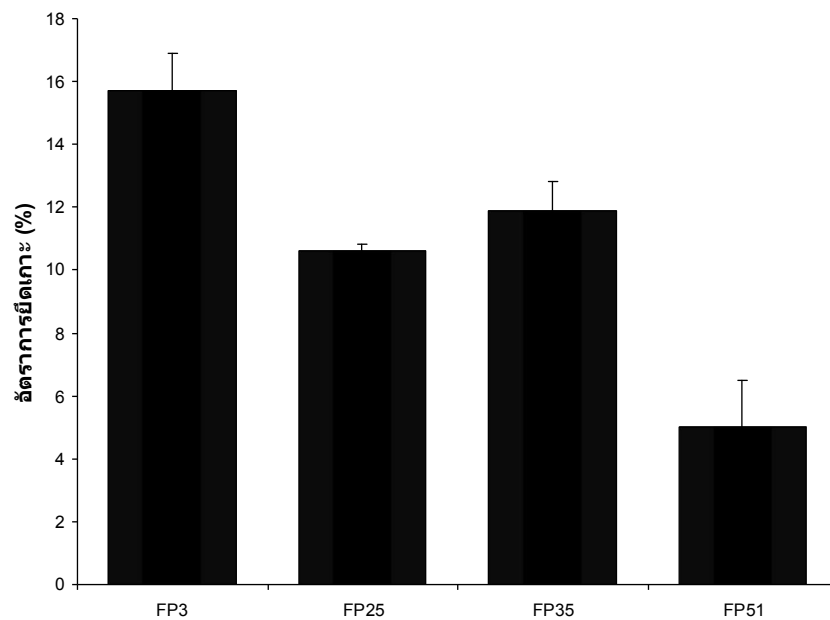
ภาพที่ 4 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก โดยใช้ลักษณะแบคทีเรียแบบ CM โดยวิธีการทดสอบแบบ Trypan blue (Mean $\pm$ SE, n = 3)

8. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียในการผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA)

กรดไขมันสายสั้นที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ เช่น acetic acid, propionic acid และ butyric acid ผลจากการทดลองพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่โปรไบโอติกแบคทีเรีย *E. faecium* FP51 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด acetic acid เท่านั้น ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 สามารถผลิต acetic acid ได้ในช่วงปริมาณ 2 – 3 ppm (ภาพที่ 7) และสามารถผลิต propionic acid ได้ในช่วงปริมาณ 1.5 – 2 ppm (ภาพที่ 8) ในขณะที่ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด butyric acid นั้นพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย *L. salivarius* FP35 สามารถผลิตได้มากที่สุดปริมาณ 2 ppm (ภาพที่ 9)



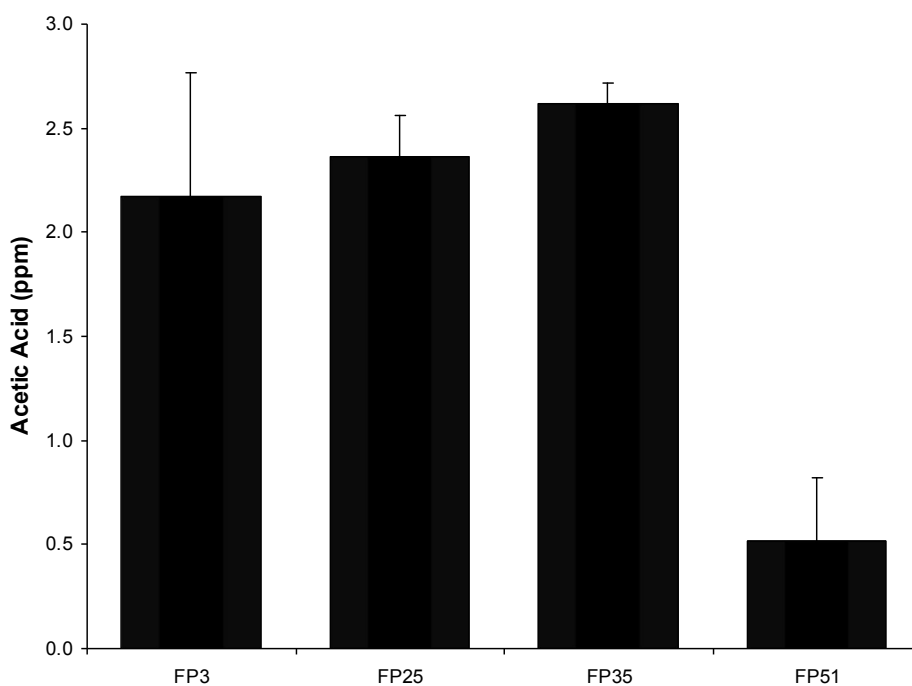
ภาพที่ 5 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก โดยใช้ลักษณะแบคทีเรียแบบ LWC โดยวิธีการทดสอบแบบ Trypan blue (Mean $\pm$ SE, n = 3)



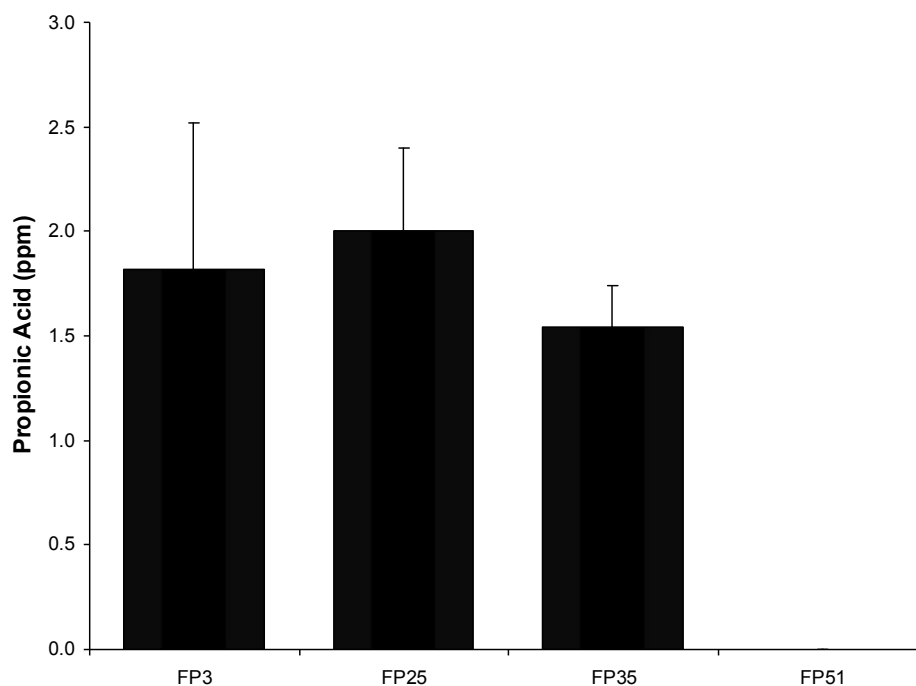
ภาพที่ 6 อัตราการยืดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารกกับเซลล์มะเร็งลำไส้ (Mean $\pm$ SE, n = 3)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีมากมายหลายสายพันธุ์ โดยที่จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบางสายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ซึ่งสามารถทำหน้าที่ในสภาพแวดล้อมของระบบทางเดินอาหารในมนุษย์เราได้ดีด้วยตัวเอง ดังนั้นแบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้จะสามารถแสดงบทบาทรวมไปถึงโรคมะเร็งลำไส้ด้วย ซึ่งอาจจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือบำบัดมะเร็งลำไส้ได้ ดังนั้นแหล่งที่มาของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้กับมนุษย์เรานั้นก็มีความสำคัญ ด้วยเหตุดังกล่าวการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารนั้น คาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดและป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารรวมไปถึงโรคมะเร็งลำไส้ได้เป็นอย่างดี



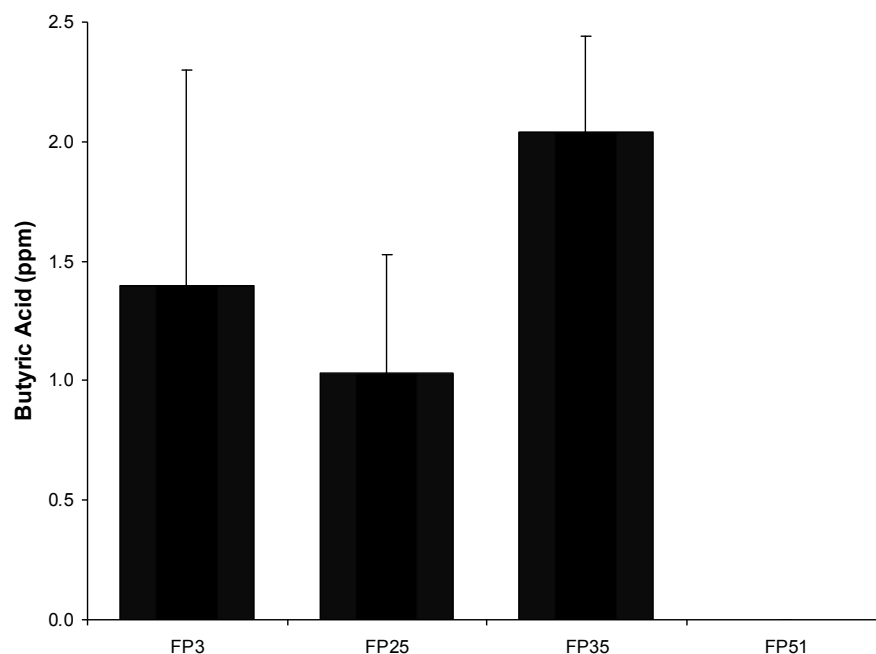
ภาพที่ 7 ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด acetic acid ของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก (Mean $\pm$ SE, n = 3)



ภาพที่ 8 ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด propionic acid ของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก (Mean $\pm$ SE, n = 3)

โรคมะเร็งลำไส้เป็นสาเหตุการตายที่สูงเป็นลำดับต้นๆ ของสาเหตุการตายที่เกิดจากโรคมะเร็งทุกชนิด สาเหตุของโรคมะเร็งลำไส้เกิดจากพฤติกรรมรับประทานอาหารที่ไม่ถูกหลักโภชนาการ อาทิเช่น การรับประทานอาหารประเภทไขมันสูง และหรือมีการรับประทานอาหารที่มีกากใยน้อย ปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ (Commane *et al.*, 2005) ทางเลือกหนึ่งสำหรับการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ในปัจจุบันก็คือ การใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตและหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญเช่นเดียวกัน การป้องกันและหรือการบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ในทางชีวภาพ (biotherapy) โดยการเลือกใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียในยุคปัจจุบันนี้พบว่าการให้ความสนใจและให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารมีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพต่างๆ ที่เกิดขึ้น เช่น ก่อให้เกิดโรคต่างๆ หรือทำให้สุขภาพมีความสมบูรณ์ที่ดี อย่างเช่น โปรไบโอติกแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารนั้น ก็มีความสำคัญและสามารถปรับตัวได้ดี จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ (Thirabunyanon *et al.*, 2009) ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาการศึกษาวิจัยต่อเนื่องให้เพิ่มมากขึ้น ผู้วิจัยจึงศึกษาโดยการคัดเลือกแบคทีเรียจากมูลทารกในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผลจากการทดลองนี้สามารถคัดเลือก

แบคทีเรียกรดแลกติกได้จากมูลทารกรวม 81 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะถูกนำไปคัดเลือกคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกและสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 9 ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด butyric acid ของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมูลทารก (Mean $\pm$ SE, n = 3)

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็น โปรไบโอติกแบคทีเรีย จากเริ่มต้นแบคทีเรีย 81 ไอโซเลต มีเพียง 15 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 8 สายพันธุ์ โดยเชื้อก่อโรสดังกล่าวนี้นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าจะมีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์หลายๆ ชนิดที่เป็นอันตราย ตัวอย่างเช่น β -glucuronidase, nitroreductase, azoreductase, 7- α -dehydroxylase และ cholesterol dehydrogenase ซึ่งมีผลทำให้เกิดมะเร็งลำไส้ได้ เช่นเดียวกับเชื้อก่อโรค *E. coli* และ *H. pylori* ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ (Shmueli *et al.*, 2001; Travaglione *et al.*, 2008) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียนั้นเกิดจากการผลิตสารต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ เป็นต้น การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคจากกิจกรรมของโปรไบโอติกแบคทีเรีย กรดแลกติกนั้น อาจจะเป็นการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ในระยะเริ่มต้นได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากโปรไบโอติกแบคทีเรียนั้น จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อมนุษย์เป็นสำคัญ โดยที่แบคทีเรีย

เหล่านี้จะต้องไม่เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้นั้นไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทำให้ทราบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ไม่เป็นพิษ และเหมาะสมที่จะนำมาพิจารณาคัดเลือกเพื่อให้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย (Maragkoudakis *et al.*, 2009) และนำแบคทีเรียทั้งหมดเหล่านี้ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ก่อนที่โปรไบโอติกแบคทีเรียจะทำหน้าที่ในระบบทางเดินอาหารนั้น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจะต้องมีความสามารถในการอยู่รอดได้ดี เมื่อผ่านทั้งบริเวณกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาพเป็นกรดและบริเวณลำไส้เล็กที่มีสภาพของกลีออน้ำดีปะปนอยู่ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต มีความสามารถในการอยู่รอดจากการจำลองระบบทางเดินอาหารที่มีทั้งปัจจัยทั้งจากการเป็นกรดและมีกลีออน้ำดี โดยสามารถอยู่รอดได้ทั้งในสถานะที่เป็นกรดที่ค่าพีเอช 2.5 และสถานะที่มีกลีออน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียที่ทนอยู่ได้สูงในสถานะที่เป็นทั้งกรดและกลีออน้ำดีที่พบในโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากมนุษย์ (จากมูล) เช่น *L. fermentum* ACA-DC 179 (Zoumpopoulou *et al.*, 2008), *L. rhamnosus* IMC 501, *L. paracasei* 502 (Verdenelli *et al.*, 2009) และ *L. plantarum* CS23 (Gaudana *et al.*, 2010) ทั้งนี้การทนอยู่ได้ในสภาวะดังกล่าวนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับโปรไบโอติกแบคทีเรีย ที่ต้องอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารและทำหน้าที่ในการป้องกันและรักษามะเร็งลำไส้ ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณลำไส้ของมนุษย์เราเช่นเดียวกัน

การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ นั้น ถือว่าเป็นกระบวนการที่สำคัญมากในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ กระบวนการบำบัดทางชีวภาพด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้แตกต่างกัน ทั้งนี้มีเพียงแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือสายพันธุ์ *P. pentosaceus* (FP3), *L. salivarius* (FP25 และ FP35) และ *E. faecium* (FP51) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ ทั้งนี้ไม่ว่าจะเป็นการใช้ CM และ LWC ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Ewaschuk *et al.* (2006) ที่พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติก VSL3 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thirabunyanon *et al.* (2009) ที่ได้รายงานหาโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* RM11 และ *L. fermentum* RM28 ซึ่งคัดเลือกมาจากนมหมักสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี

ประสิทธิภาพการยึดเกาะของโปรไบโอติกแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้ นั้น อาจจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ ทั้งนี้เพราะว่าเมื่อโปรไบโอติกแบคทีเรียยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้แล้วจะไปกระตุ้นกลไกต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ เช่นการหลั่งกรดไขมันสายสั้นออกมาและส่งตรงถึงเซลล์มะเร็งลำไส้ได้อย่างง่าย

และทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เป็นอย่างดี Thirabunyanon *et al.* (2009) ได้รายงานความสอดคล้องกัน กล่าวคือ โปรไบโอติกแบคทีเรียที่ยึดเกาะเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีเช่นเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 สามารถยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี ในขณะที่ *E. faecium* FP51 ยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ไม่ดีเท่ากับโปรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งนี้ก็สอดคล้องกับอัตราการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ที่พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่า *E. faecium* FP51

การผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA) ของแบคทีเรียเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Jan *et al.*, 2002) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ก็พบความสอดคล้องกันระหว่างสัดส่วนปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นกับอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ กล่าวคือโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากนั้น ก็สามารถผลิตหรือหลั่งกรดไขมันสายสั้นออกมามากเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 มีความสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นมากกว่า *E. faecium* FP51 เช่นเดียวกันกับอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่สอดคล้องกันกับปริมาณการผลิตกรดไขมันของโปรไบโอติกแบคทีเรีย

การวิจัยครั้งนี้อาจจะสรุปได้ว่า การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากมูลทหารทั้ง 4 สายพันธุ์ *P. pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25, *L. salivarius* FP35 และ *E. faecium* FP51 มีกลไกมาจากการผลิตหรือการกระตุ้นโดยกรดไขมันสายสั้นในกลุ่ม acetic, propionic และ butyric

สรุปผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากมูลทหารที่มีสุขภาพดี มีอายุอยู่ในช่วง 1 – 14 วัน จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่า สามารถรวบรวมแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปร่างเป็นทั้งแบบท่อนหรือแบบกลมได้จำนวน 81 ไอโซเลต

2. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต อาทิเช่นคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 ชนิด การไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและเกลือแร่ พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 15 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียที่ดี

3. การศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยวิธีการแบบ MTT และ Trypan blue exclusion พบว่ามีโปรไบโอติกแบคทีเรียเพียง 4 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีประมาณ 17 – 35%

4. การจำแนกสายพันธุ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบลำดับ 16S rRNA ผลจากการตรวจสอบสายพันธุ์และทำการตั้งชื่อโปรไบโอติกแบคทีเรีย ทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *Pediococcus pentosaceus* FP3, *Lactobacillus salivarius* FP35, *Lactobacillus salivarius* FP25 และ *Enterococcus faecium* FP51

5. การศึกษากลไกของโปรไบโอติกแบคทีเรียต่อการยับยั้ง หรือผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเข้ายึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้และผลิตหรือหลั่งกรดไขมันสายสั้นในกลุ่ม acetic, propionic และ butyric โดยไปกระตุ้นทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ตาย

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ รวมทั้งได้ทราบเกี่ยวกับกลไกของโปรไบโอติกแบคทีเรียเหล่านี้ต่อการยับยั้งการเจริญและหรือการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้

เอกสารอ้างอิง

- Bawadi, H.A., R.R. Bansode, A. Treppey, R.E. Truax and J.N. Losso. 2005. Inhibition of Caco-2 colon, MCF-1 and HS578T breast, and DU 145 prostatic cancer cell proliferation by water- soluble black bean condensed tannins. **Cancer letter**. 218 (2): 153-162.
- Bingham, S.A. 1999. High-meat diets and cancer risk. **Proc. Nutr. Soc.** 58 (2): 243-248.
- Ewaschuk, J.B., J.W. Walker, H. Diaz and Madsen K.L. 2006. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. **J. Nutr.** 136 (6): 1483-1487.
- Commene, D., R. Hughes, C. Shortt and I. Rowland. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutat. Res.** 591 (1-2): 276-289.
- Fearon, E.R. and B.A. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. 61 (5): 759 – 767.
- Gagnon, M., E.E. Kheadr, G.E. Blay and I. Fliss. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **Int. J. Food Microbiol.** 92 (1): 69–78.
- Gaudana, S.B., A.S. Dhanani and T. Bagchi. 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. **Br. J. Nutr.** 103 (11): 1620-1628.
- Gilliland, S.E., T.E. Staley and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **J. Dairy Sci.** 67 (12): 3045-3051.
- Guarner, F. and J-R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. **Lancet**. 361 (9356): 512-519.
- Hirayama, K and J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect.** 2 (6): 681-686.
- Hussain, M.A., D.A. Rouch and M. L. Britz. 2009. Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. **Int. Dairy J.** 19: 12–21.
- Jan, G., A.S. Belzacq, D. Haouzi , A. Rouault , D. Métivier, G. Kroemer and C. Brenner . 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. **Cell Death Differ.** 9 (2): 179-88.

- Lee, N.K., J.S. Park, E. Park and H.D. Paik. 2007. Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polymycticus* SCD in the large intestine. **Lett. Appl. Microbiol.** 44 (3): 274-278.
- Losso, J.N., R.R. Bansode, A. Trappey, H.A. Bawadi and R. Truax. 2004. In vitro anti proloferative activities of ellagic acid. **J. Nutr. Biochem.** 15 (11): 672-678.
- Maragkoudakis, P.A., G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot and E. Tsakalidou. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **Int. Dairy J.** 16: 189-199.
- Maragkoudakis, P.A., K.C. Mountzouris, D. Psyrras, S. Cremonese, J. Fischer, M.D. Cantor and E. Tsakalidou. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **Int. J. Food Microbiol.** 130 (1-2): 219-226.
- McCann, M.J., C.I.R. Gill, G.O' Brien, J.R. Rao, W.C. McRoberts, P. Hughes, R. McEntee and I.R. Rowland. 2007. Anti – cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. **Food chem. toxicol.** 45 (7): 1224-1230.
- Pennacchia, C., D. Ercolini, G. Blaiotta, O. Pepe, G. Mauriello and F. Villani. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Sci.** 67: 309-317.
- Rafter, J. 2003. Probiotics and colon cancer. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.** 17 (5): 849–859.
- Rafter, J. 2004. The effect of probiotic on colon cancer development. **Nutr. Res. Rev.** 17 (2): 277-284.
- Russo, A., V. Cardile, L. Lombardo, L. Vanella, A. Vanella and J.A. Garbarino. 2005. Antioxidant activity and antiproloferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* sweet roots in human tumor cell line. **J. Ethnopharmacol.** 100 (3): 323-332.
- Thirabunyanon, M., P. Boonprasom and P. Niamsup. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. **Biotechnol. Lett.** 31 (4): 571-576.

- Travaglione, S., A. Fabbri and C. Fiorentini. 2008. The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: A risk factor for human cancer development?. **Infect. Agent. Cancer.** 3: 4.
- Salminen, S., C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H Cummings, A. Franck and G.R. Gibson. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.** 1: S147-S171.
- Schneider, Y., F Vincent, B. Duranton, L. Badolo, F. Gosse, C. Bermann, N Seiler and F. Raul. 2000. Anti – proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cell. **Cancer letter.** 158 (1): 85-91.
- Shmuely, H., D. Passaro, A. Figer, Y. Niv, S. Pitlik, Z. Samra, R. Koren and J. Yahav. 2001. Relationship between *Helicobacter pylori* CagA status and colorectal cancer. **Am. J. Gastroenterol.** 96 (12): 3406-3410.
- Verdenelli, M.C., F. Ghelfi, S. Silvi, C. Orpianesi, C. Cecchini and A Cresci. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. **Eur. J. Nutr.** 48 (6): 355-363.
- Wollowski, I., G. L. Rechkemmer and B. pool Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotic in colon cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** 73 (2): 451s-455s.
- Zabala, A., M.R. Martin, A.I. Haza, L. Fernandez, Rodriguez and P. Morales. 2001. Anti-proliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. **Lett. Appl. Microbiol.** 32 (4): 287-292.
- Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Granette, B. Pot and E. Tsakalidou. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **Int. J. Food Microbiol.** 121 (1): 18-26.