

สารสกัดเอทานอลจากรำข้าวเหนียวแดง (*Oryza sativa* L.) ลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์มะเร็งตับ HuH-7

อัฐพันธ์ หมอช้าง¹, Shilu Malakar², ภัสราวดี เผ่าจินดา¹,
ณรงค์ศักดิ์ มั่นคง³, เกวลิน วงศ์โกล^{1*}

¹สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

²หน่วยอนุเวชศาสตร์ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา

*Corresponding author email: kelvalin.vo@bsru.ac.th

ได้รับบทความ: 21 ธันวาคม 2565

ได้รับบทความแก้ไข: 15 มีนาคม 2566

ยอมรับตีพิมพ์: 30 มีนาคม 2566

บทคัดย่อ

Oxidative stress เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังที่สำคัญหลายชนิด ข้าวเหนียวแดง (*Oryza sativa* L.) เป็นพันธุ์ข้าวมีสีที่ปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย การศึกษาก่อนหน้าพบว่าสารสกัดจากรำข้าวเหนียวแดง (Red rice bran extract; RRBE) ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร RRBE ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์ทดลอง ผลการศึกษาพบว่าสาร RRBE เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ HuH-7 ที่เกิดภาวะ oxidative stress จากการเติมสาร H_2O_2 นอกจากนั้นยังลดการสร้างสารอนุมูลอิสระ ROS ในขณะเดียวกันก็เพิ่มการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายในเซลล์ ผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่าสาร RRBE ออกฤทธิ์ช่วยให้เซลล์ต่อต้านภาวะ oxidative stress และเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพัฒนาให้เป็นยาหรืออาหารเสริมที่มีส่วนในการรักษาโรคได้

คำสำคัญ: รำข้าวเหนียวแดง / Oxidative stress / ROS / Glutathione

Ethanollic extract of bran of red sticky rice (*Oryza sativa* L.) attenuates cellular oxidative stress in human hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7 cells)

Atthapan Morchang¹, Shilu Malakar², Patsarawadee Paojinda¹,
Narongsuk Munkong³, Kevalin Vongthoung^{1*}

¹Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

²Department of Molecular Medicine, Research Department,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok

³Department of Pathology, School of Medicine, University of Phayao, Phayao

*Corresponding author email: kevalin.vo@bsru.ac.th

Received: 21 December 2022

Revised: 15 March 2023

Accepted: 30 March 2023

Abstract

Oxidative stress is an imbalance event between free radical accumulation and antioxidant levels within the cells. It is the major cause of several chronic diseases. Red sticky rice is the pigmented rice, which being commonly cultivated and consumed in Thailand. Our previous study demonstrated that an extract from red sticky rice bran (RRBE) contains plenty of antioxidant substances. Thus, this research aimed to investigate the effect of RRBE against oxidative stress within the cells. The results showed that RRBE increased the cell survival rate of HuH-7 cells upon insulted with oxidative stress inducer, H₂O₂. Moreover, RRBE decreased the ROS production while increased glutathione production within the cells. Altogether, our results demonstrated the effect of RRBE against cellular oxidative stress proven its potential use as antioxidant supplement.

Keywords: Red sticky rice bran extract / Oxidative stress / ROS /
Glutathione

บทนำ

โรคเรื้อรังที่ไม่ติดต่อ (Non-communicable diseases; NCDs) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบัน โรคเหล่านี้ไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิต แต่ยังส่งผลกระทบโดยรวมต่อเศรษฐกิจ สังคม และทรัพยากรมนุษย์ของประเทศ โรค NCDs ที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ เป็นต้น [1] ผู้ป่วยโรคเหล่านี้จะมีอาการเรื้อรัง บางชนิดรักษาไม่หาย และต้องเข้าโรงพยาบาล เพื่อรับยาเป็นประจำ ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย อีกทั้งยังอาจก่อให้เกิดการอาการที่ไม่พึงประสงค์ หรือการดื้อยาที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการรักษา [2]

พยาธิสภาพหลักของโรคกลุ่ม NCDs เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (free radical) ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งประกอบไปด้วย superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals ($\cdot OH$), และ singlet oxygen (1O_2) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน, การทำลายเชื้อจุลินทรีย์, สารแปลกปลอม หรือสารพิษภายในเซลล์ หากเซลล์มีการผลิต ROS ปริมาณมากผิดปกติ จะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีอยู่ ไม่สามารถกำจัด ROS ออกจากเซลล์ได้ ROS ถือว่าเป็นสารที่เป็นพิษและมีความไวสูง สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ ส่งผลทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์, ออร์แกเนลล์, สารพันธุกรรม DNA, กระบวนการเมตาบอลิซึม, การส่งสัญญาณผ่านในเซลล์ และการดำรงของสมดุลร่างกาย (homeostasis) ถูกทำลาย และเซลล์ในร่างกายทำงานผิดปกติ จนเกิดพยาธิสภาพกับเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ [3] [4] ในทำนองเดียวกันหากเซลล์มีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในปริมาณน้อยผิดปกติก็ทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลนี้ได้ สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ที่สำคัญ คือ สารกลูตาไธโอน (glutathione) ซึ่งถูกสังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโนไกลซีน (glycine), ซิสเทอีน (cysteine) และกลูตามิก แอซิด (glutamic acid) กลูตาไธโอนที่อยู่ในรูปแบบรีดิวซ์ จะหักล้างฤทธิ์ของ ROS โดยใช้หมู่ไฮโดรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก ROS ซึ่งกระบวนการนี้ส่วนมากเกิดขึ้นในตับ ทำให้ตับเป็นอวัยวะสำคัญในการกำจัด ROS หากตับถูกทำลายจะทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคที่เกิดจาก oxidative stress สูง นอกจากนั้นกลูตาไธโอนยังทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษอื่น ๆ ในร่างกายโดยผ่านวิถี cytochrome p450 pathway ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่เกิดขึ้นในตับเช่นเดียวกัน [5]

ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในแง่การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด พบว่าสามารถประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจาก oxidative stress ได้ ซึ่งมีข้อดีในแง่ความไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ลดอาการข้างเคียง และ

ป้องกันการติดต่อยาแผนปัจจุบัน รวมไปถึงความสะอาดต่อการผลิต การเข้าถึงความประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษา ซึ่งส่งผลโดยตรงในการเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และก่อให้เกิดแนวความคิดในการรับประทานอาหารให้เป็นยาในปัจจุบัน [6] [7]

ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว และข้าวมีสี (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่มีการปลูกและบริโภคเป็นหลักทั่วทั้งประเทศไทย ในปัจจุบันข้าวมีสี (pigmented rice) เช่นข้าวแดง ข้าวดำ ข้าวน้ำตาล ข้าวม่วง ถูกนิยมนำมาบริโภคอย่างกว้างขวางด้วยเหตุผลทางโภชนาการที่บ่งชี้ว่า ข้าวมีสีประกอบไปด้วยน้ำตาลที่น้อยกว่า แต่ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ, โยอาหาร, และสารอาหารที่มีคุณค่าสูงโดยเฉพาะในส่วนรำข้าว (rice bran) มากกว่าข้าวขาวทั่วไป ทำให้ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ลดระดับไขมันในเลือด, เพิ่ม glucose uptake, ต้านภาวะ insulin resistance, ลดกระบวนการ adipogenesis และต้านการอักเสบ ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการป้องกันและต่อต้านโรคหลอดเลือดหัวใจ, โรคความดันสูง, โรคอ้วน, และโรคเบาหวาน [8] ข้าวเหนียวแดง (*Oryza sativa* L.) เป็นข้าวเหนียวที่ปลูกและบริโภคในหลายจังหวัดในประเทศไทย เช่นจังหวัดพะเยา การทดลองก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากรำข้าวเหนียวแดง (red sticky rice bran extract; RRBE) ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ในปริมาณสูง [9] ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้สาร RRBE ให้เป็นอาหารเสริมที่มีส่วนในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นจากภาวะ oxidative stress ได้

สมมุติฐานของการวิจัยนี้คือ สาร RRBE สามารถลดภาวะ oxidative stress ซึ่งทำการทดลองโดยใช้เซลล์มะเร็งตับ HuH-7 บ่มกับสาร RRBE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงบ่มเซลล์ร่วมกับสาร H_2O_2 เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress หลังจากนั้น ผลของสาร RRBE ต่อภาวะ oxidative stress ถูกศึกษาโดยวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์, ปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS และ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์บ่งชี้ฤทธิ์ต้านภาวะ oxidative stress ของสาร RRBE สามารถนำไปต่อยอดการพัฒนาสารสกัดจากรำข้าวเหนียวแดงสำหรับป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นจากภาวะ oxidative stress อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในท้องถิ่นเช่นเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

1. สารสกัดจากรำข้าวเหนียวแดง (RRBE) และสารอื่น ๆ

สารสกัดจากรำข้าวเหนียวแดง (RRBE) ด้วย 50% ethanol ได้รับอนุเคราะห์จาก อ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ มั่นคง ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา รายละเอียดขั้นตอนการเก็บตัวอย่างข้าวเหนียวแดงและวิธีการสกัดสารแสดงใน

เอกสารอ้างอิง [9] N-acetylcysteine (NAC) (Cat.No.1C 57/49, Temmler Pharma GmbH, Germany) ใช้เป็นสาร positive control ในการทดลอง เนื่องจากเป็น known antioxidant ที่มีการศึกษาคุณสมบัติมาแล้ว [10] สาร RRBE ถูกละลายใน 100% DMSO, สาร NAC ถูกละลายใน sterile distilled water และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นจึงเก็บในตู้แช่เย็น -20°C ในภาวะปราศจากแสง 30% v/v (970 mM) hydrogen peroxide (H_2O_2) (ศิริบัญชา, ประเทศไทย) ใช้เป็นสารกระตุ้นการเกิด oxidative stress เก็บในตู้แช่เย็น 4°C ในภาวะปราศจากแสง

2. เซลล์เพาะเลี้ยง HuH-7 (JCRB0403, Japanese Collection of Research Biosources Cell Bank)

เป็น adherent cell ชนิด hepatocellular carcinoma ของมนุษย์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นพ.ถาวรชัย ลิ้มจินดาพร หน่วยอณูเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, USA) ซึ่งเติม 10% heat inactivated fetal bovine serum, 1% (v/v) penicillin (100 U/mL) และ streptomycin (100 mg/mL) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 , และความชื้นอยู่ระหว่าง 80-90% เซลล์จะถูกเลี้ยงและขยายด้วยวิธี trypsinization มาตรฐาน และนับเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue ก่อนทำการทดลอง

3. การทดสอบอัตราการอยู่รอดของเซลล์

เลี้ยง HuH-7 cells ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสาร RRBE หรือ NAC ที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยมี 1% v/v DMSO เป็นตัวทำละลายควบคุมการทดลอง เซลล์จะถูกเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจะถูกดูดออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 mM H_2O_2 ปริมาตรสุทธิ 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ และเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการอยู่รอดของเซลล์จะถูกทดสอบด้วย PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Cat.No. A13261, Thermo Fisher Scientific, USA) โดยเติมสาร PrestoBlue™ ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงวัดค่า fluorescent intensity ที่ 560_{Ex}/590_{Em} nm โดยใช้เครื่อง Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยค่าที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ คิดเป็นอัตราการอยู่รอดของเซลล์ 100% และใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารต่าง ๆ

4. การวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์

เลี้ยง HuH-7 cells ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate และทำการทดลองดังที่กล่าวไว้ หลังจากนั้น ปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์จะถูกทดสอบด้วย CellROX™ Green Reagent (Cat.No. C10444, Thermo Fisher Scientific, USA) โดยเติมน้ำยา 5 mM CellROX Green หลุมละ 2 μ l และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงวัดค่า fluorescent intensity ที่ 485_{Ex}/520_{Em} nm โดยใช้เครื่อง multimode microplate reader ค่าที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ คิดเป็นปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ 100% และใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารต่าง ๆ

5. การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายในเซลล์

เลี้ยง HuH-7 cells ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 well plate และทำการทดลองดังที่กล่าวไว้ หลังจากนั้น ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายในเซลล์จะถูกทดสอบโดยเติมน้ำยา GSH-Glo™ (Promega, USA) 50 μ l ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำยาตรวจวัด luciferin 100 μ l ต่อหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงวัดค่าการเปล่งแสง luminescence โดยใช้เครื่อง multimode microplate reader ค่าที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ คิดเป็นปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายในเซลล์ 100% และใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารต่าง ๆ

7. การรวบรวมผลและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

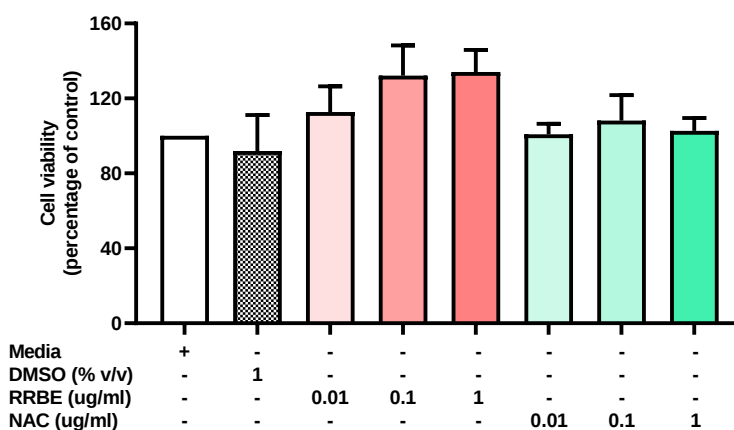
การทดลองทุกการทดลองถูกทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งโดยเป็นอิสระต่อกัน (three-independent experiments) และในแต่ละครั้งของการทดลองจะมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง (triplicate) ค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ของการทดลองแต่ละครั้ง สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลคือ one-way ANOVA โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง (เซลล์ที่ได้รับสารต่าง ๆ) และกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ) และมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความเป็นพิษของสาร RRBE และ NAC ต่อ HuH-7 cells

ความเข้มข้นของสาร RRBE และ NAC ที่ใช้ในการทดลอง ได้ถูกทดสอบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นั่นคือทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 80% พบว่าสาร RRBE ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μ g/ml ทำให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดเท่ากับ $112.7 \pm 3.20\%$, $132.3 \pm 9.30\%$ และ $134.10 \pm 6.83\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (ภาพที่ 1) เช่นเดียวกันกับสาร NAC ซึ่งเป็น known antioxidant ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1

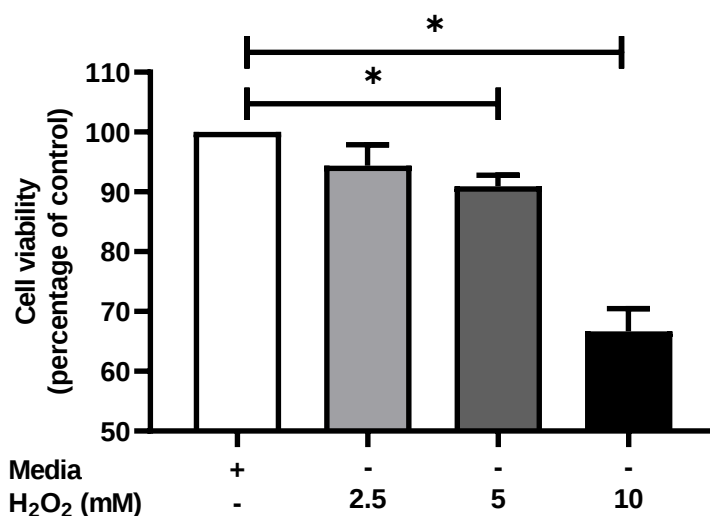
μg/ml ทำให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดเท่ากับ $100.9 \pm 1.31\%$, $109.1 \pm 3.15\%$ และ $102.7 \pm 1.59\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ



ภาพที่ 1 อัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ และ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร RRBE และ NAC ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบผลของสาร H_2O_2 ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และลดอัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells

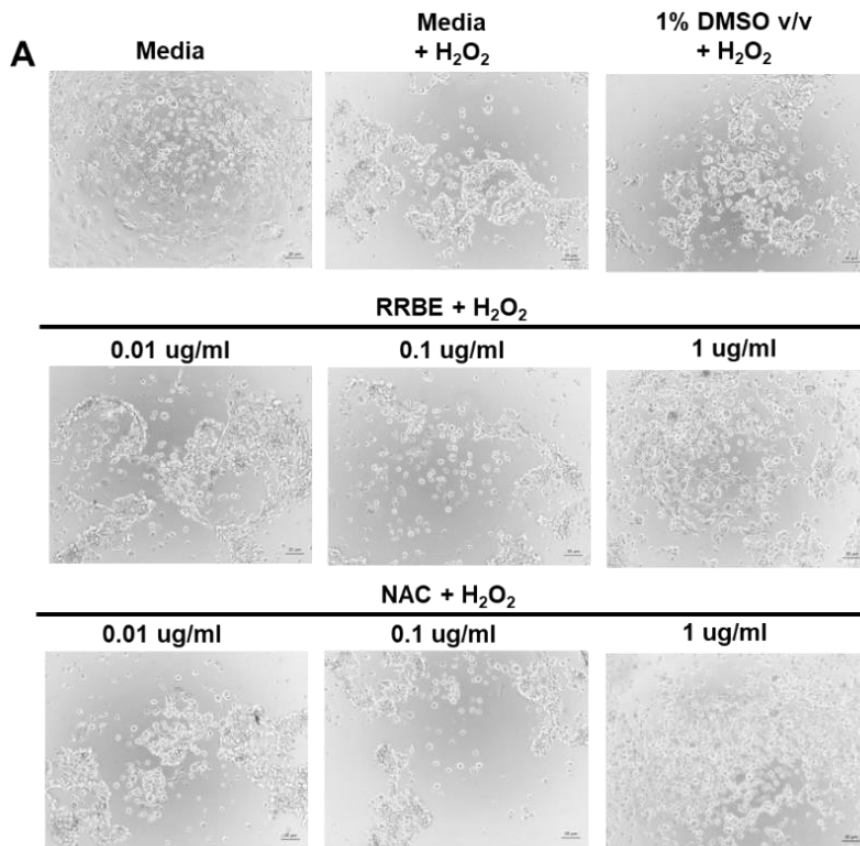
สาร H_2O_2 ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM เมื่อบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือ $94.37 \pm 0.81\%$, $90.91 \pm 0.43\%$ และ $66.66 \pm 0.89\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ดังนั้นสาร H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM จึงถูกเลือกใช้ในการทดลองถัดไป เนื่องจากทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเหลือน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ



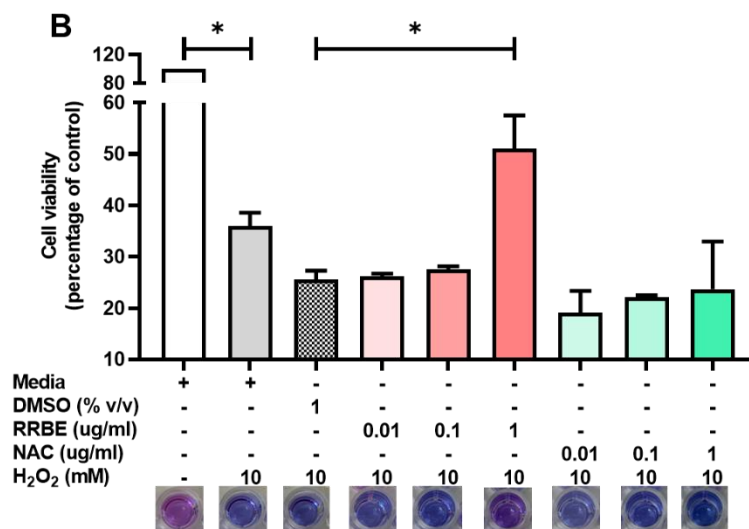
ภาพที่ 2 อัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ และ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร H₂O₂ ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA)

3. สาร RRBE เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress

ผลการทดลองพบว่าสาร RRBE ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเพียงสถานะเดียวที่สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress จากการเติมสาร H₂O₂ ได้ โดยลักษณะรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตายที่มีขนาดเล็ก ไม่วาว ขอบไม่เรียบ และมีรูปร่างกลมหลุดออกจากถาดเลี้ยงเซลล์ กลับมาเป็น adherent cells ปกติ ที่เกาะกับถาดเลี้ยงเซลล์ มีการแผ่ และขอบเซลล์ชัดเจน (ภาพที่ 3A) ซึ่งสอดคล้องกับผลปฏิกิริยาจาก PrestoBlue™ Cell Viability Reagent แปลผลอัตราการอยู่รอดของเซลล์ จาก $25.52 \pm 1.77\%$ ในกลุ่มควบคุม (1% v/v DMSO) เพิ่มขึ้นเป็น $51.09 \pm 6.41\%$ ในกลุ่มที่ได้รับ RRBE ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 3B) ในการทดลองนี้ NAC ซึ่งเป็นสาร known antioxidant ไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress (ภาพที่ 3A และ 3B)



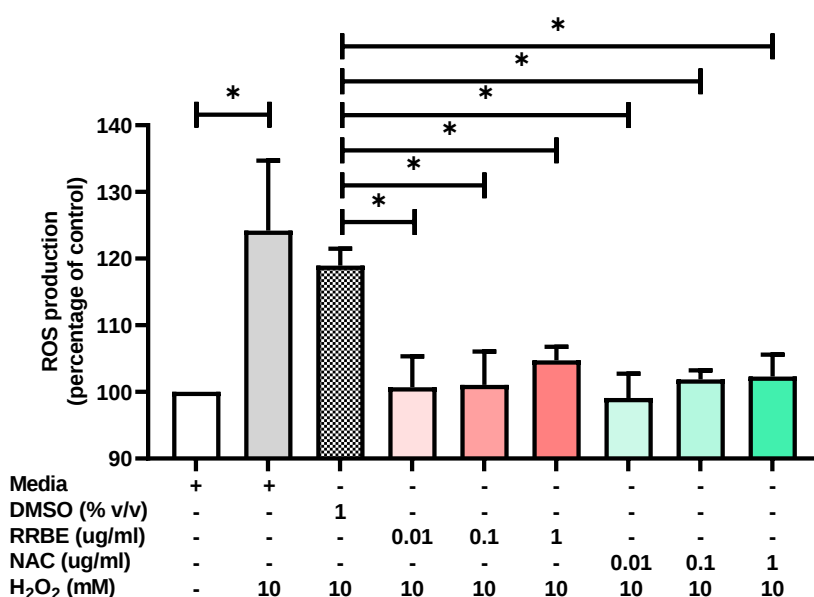
ภาพที่ 3A รูปร่างของ HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ และ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร RRBE และ NAC ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 µg/ml ก่อนจะถูกกระตุ้นให้เกิด oxidative stress โดยการเติมสาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM ถ่ายรูปเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Primo Star Carl Zeiss) กำลังขยาย 100 เท่า scale bar = 20 micrometer



ภาพที่ 3B ปฏิกริยาจาก PrestoBlue™ Cell Viability Reagent และอัตราการอยู่รอดของ HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ และ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร RRBE และ NAC ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 µg/ml ก่อนจะถูกกระตุ้นให้เกิด oxidative stress โดยการเติมสาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA)

4. สาร RRBE ลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS ภายใน HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress

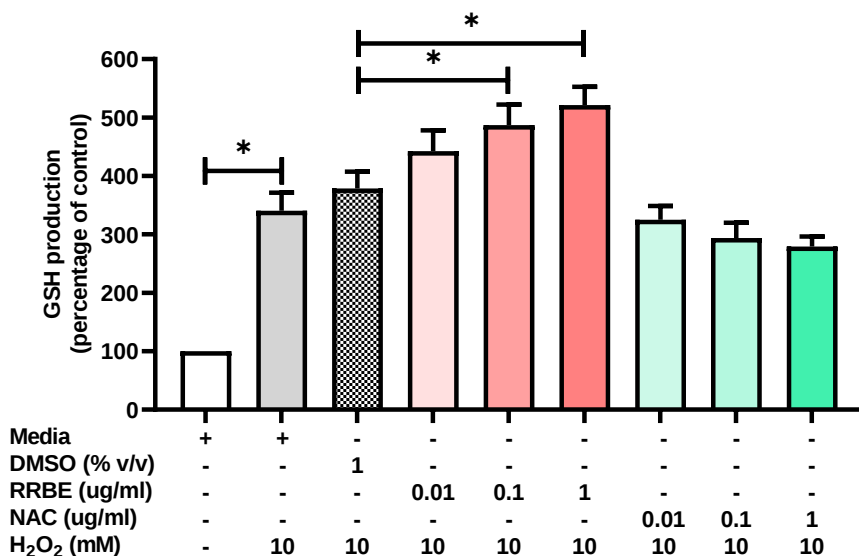
สาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM กระตุ้นให้ HuH-7 cell สร้าง ROS เพิ่มขึ้นจาก 100% เป็น $118.9 \pm 5.06\%$ (ภาพที่ 4) ในขณะที่ สาร RRBE ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 µg/ml ลดการสร้าง ROS ภายในเซลล์เหลือ $100.70 \pm 9.28\%$, $101.00 \pm 10.04\%$ และ $104.70 \pm 4.70\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เช่นเดียวกัน NAC ซึ่งเป็นสาร known antioxidant ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 µg/ml ลดการสร้าง ROS ภายในเซลล์เหลือ $99.99 \pm 3.65\%$, $101.89 \pm 1.33\%$ และ $102.32 \pm 3.27\%$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS ภายใน HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ และเซลล์ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร RRBE และ NAC ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนจะถูกกระตุ้นให้เกิด oxidative stress โดยการเติมสาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA)

5. สาร RRBE เพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายใน HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress

สาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM กระตุ้นให้ HuH-7 cell สร้าง glutathione เพิ่มขึ้นจาก 100% เป็น $378.60 \pm 16.57\%$ (ภาพที่ 5) ในขณะที่ สาร RRBE ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ เพิ่มการสร้าง glutathione ภายในเซลล์ขึ้น $442.50 \pm 20.45\%$, $486.90 \pm 20.37\%$ และ $521.40 \pm 18.13\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ในการทดลองนี้ NAC ซึ่งเป็นสาร known antioxidant ไม่มีผลต่อปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายใน HuH-7 cells ที่เกิดภาวะ oxidative stress ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายใน HuH-7 cells ที่ไม่ได้รับสารใดๆ และ HuH-7 cells ที่ได้รับสาร RRBE และ NAC ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนจะถูกกระตุ้นให้เกิด oxidative stress โดยการเติมสาร H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA)

วิจารณ์

ตัวอย่างข้าวเหนียวแดง และสาร RBBE ที่สกัดด้วยเอทานอล เป็นตัวอย่างและสารเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ [9] โดยมีการพิสูจน์และจำแนกอนุกรมวิธานในห้องปฏิบัติการศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพะเยา จังหวัดพะเยา ซึ่งข้าวเหนียวแดงจัดอยู่ในวงศ์ *Oryza* สกุล *Sativa* เช่นเดียวกับข้าวขาว ชนิดข้าวเจ้าและข้าวเหนียวทั่วไป [11]

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเบาหวานระหว่างพันธุ์ข้าวมีสีหลายชนิดพบว่าข้าวแดงออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด [11] สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มวิจัยซึ่งพบว่าสาร RBBE ประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ phenolic ปริมาณ 51.9 ± 1.73 mg GAE/g, flavonoid ปริมาณ 22.94 ± 2.62 mg Catechin/g และ proanthocyanidins ปริมาณ 6.52 ± 0.90 mg Catechin/g (9) ซึ่งสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ลดการสร้างสารอนุมูลอิสระ ROS และเพิ่มการสร้าง glutathione ในเซลล์ [12]

จากผลการศึกษาพบว่าสาร RRBE ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS และเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione (ภาพที่ 4 และ 5) แต่ไม่เพิ่มอัตราการรอดของเซลล์ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (ภาพที่ 3) ทั้งนี้อาจเป็นความเข้มข้นยังไม่เพียงพอที่จะปรับเปลี่ยนระดับ ROS และ glutathione ในเซลล์ให้กลับมาสู่ภาวะสมดุลได้ นอกจากนั้นยังต้องศึกษาผลของ RRBE ต่อ โมเลกุลอื่น ๆ เช่นระดับของ malondialdehyde ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิด lipid peroxidase หรือ ระดับของเอนไซม์ super oxide dismutase ซึ่งเป็น antioxidant enzyme ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง เพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์เพิ่มเติม เป็นที่น่าสนใจว่าสาร RRBE ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง เพิ่มอัตราการรอดของเซลล์ (ภาพที่ 3) ประกอบกับความเข้มข้นนี้ไม่ส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 1) ดังนั้นสาร RRBE ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและใช้ในการทดลองต่อไป

สาร NAC ซึ่งเป็น known antioxidant ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1 $\mu\text{g/ml}$ ลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ ROS แต่ไม่เพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione จึงส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้ ดังนั้นควรเพิ่มความเข้มข้นของ NAC ให้มากขึ้นหรือเพิ่มสารอื่นเช่น vitamin C, vitamin E และ coenzyme Q ซึ่งสามารถออกฤทธิ์เป็น positive control ที่เหมาะสมในการแปลผลการทดลอง

การศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของกลุ่มวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า RRBE ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ, RAW 246.7 cells และยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ต่อโปรตีน STING ส่งผลลดการอักเสบที่เกิดจากกระตุ้นด้วยสาร DMXAA แสดงให้เห็นด้วยการลดลงของการแสดงออกของยีนไซโตไคน์หลายชนิด ได้แก่ *IFN- α* , *IFN- γ* , *Mx1*, *CXCL10*, *IRF3*, *IRF5*, *IRF7* และที่สำคัญคือ *NO* ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งในเซลล์ [9] นอกจากนั้นแล้ว สาร RRBE ยังได้ถูกนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหนูทดลองที่มีภาวะอ้วน พบว่า สาร RRBE ไม่เป็นพิษและไม่ส่งผลข้างเคียงใด ๆ ต่อหนู และออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดได้โดยต้านภาวะ insulin resistance ผ่านทางการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *INSR*, *IRS1*, *IRS2* และ *GLUT4* [13] ในทำนองเดียวกันก็สามารถต้านกระบวนการ adipogenesis และ inflammation โดยลดการแสดงออกของ NF- κ B p65 ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการสร้างไซโตไคน์หลายชนิดโดยเฉพาะชนิดที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบได้แก่ *MCP-1*, *TNF- α* และ *iNOS* ซึ่ง iNOS เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการสร้างอนุมูลอิสระ NO เช่นกัน [14]

มีการรายงานว่ สารสกัดจากรำข้าวมีสีชนิดต่าง ๆ สามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ Sirt1, NF- κ B, Nrf-2 และ HO-1 pathways (15-18) ซึ่ง pathway ทั้งหมดนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการรอดของเซลล์ โดยลดปริมาณอนุมูลอิสระ ROS และ

เพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ผ่านการควบคุม transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของสาร RRBE โดยผ่าน pathway เหล่านี้จึงควรมีการศึกษาต่อไป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่ให้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้น ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมหากต้องการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพเพื่อการจำหน่าย เช่น ทำการทดลองในสัตว์ทดลอง และทำการทดลองในกลุ่มผู้ป่วยเพื่อยืนยันผล อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิต, ราคา, ตลาด, กลุ่มลูกค้า ตลอดจนปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อความคุ้มค่า

สรุป

สาร RRBE มีฤทธิ์ต้านภาวะ oxidative stress ในเซลล์มะเร็งระดับ Huh-7 เพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยลดปริมาณสารอนุมูล ROS และเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ภายในเซลล์ ที่สุด สอดคล้องกับผลการศึกษาเบื้องต้นของกลุ่มวิจัยที่พบว่า สาร RRBE ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด การศึกษานี้ให้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้น สนับสนุนการต่อยอดพัฒนาสารสกัดจากข้าวเหนียวแดงให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีส่วนในการรักษาโรค

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ผู้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนภายใน เพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ นักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา รหัส 62 ได้แก่ นายบุญญพนธ์ บุญชู, นายณัฐนัย โสภ และนางสาวนันทยา หงส์ทอง ที่ได้ร่วมปฏิบัติงานวิจัยจนสำเร็จ ขอขอบคุณ รศ.ดร.นพ.ถาวรชัย ลัมจินดาพร และ ผศ.ดร.มูทิทา จุลกิจ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้อนุเคราะห์ให้วัสดุอุปกรณ์, สารเคมี และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Budreviciute A, Damiani S, Sabir DK, Onder K, Schuller-Goetzburg P, Plakys G, et al. Management and Prevention Strategies for Non-communicable Diseases (NCDs) and Their Risk Factors. Front Public Health. 2020;8:574111.

2. Rai SS, Syurina EV, Peters RMH, Putri AI, Zweekhorst MBM. Non-Communicable Diseases-Related Stigma: A Mixed-Methods Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep 12;17(18):6657.
3. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
4. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:715-48.
5. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004 Mar;134(3):489-92.
6. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul;4(8):118-26.
7. Omidifar N, Nili-Ahmadabadi A, Nakhostin-Ansari A, Lankarani KB, Moghadami M, Mousavi SM, et al. The modulatory potential of herbal antioxidants against oxidative stress and heavy metal pollution: plants against environmental oxidative stress. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Nov;28(44):61908-18.
8. Bhat FM, Sommano SR, Riar CS, Seesuriyachan P, Chaiyaso T, Prom-u-Thai C. Status of Bioactive Compounds from Bran of Pigmented Traditional Rice Varieties and Their Scope in Production of Medicinal Food with Nutraceutical Importance. 2020;10(11):1817.
9. Onsa-Ard A, Thongboontho R, Munkong N, Phromnoi K, Ontawong A, Pengnet S, et al. Anti-Inflammatory Effects of Red Rice Bran Extract Ameliorate Type I Interferon Production via STING Pathway. *Foods*. 2022 May 30;11(11):1622.
10. Tenorio M, Graciliano NG, Moura FA, Oliveira ACM, Goulart MOF. N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jun 16;10(6):967.
11. Surarit W. JC, Lerdvuthisopon N., Kongkham S., Hansakul P. Evaluation of antioxidant activities and phenolic subtype contents of ethanolic bran

- extracts of Thai pigmented rice varieties through chemical and cellular assays. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50(4):990-8.
12. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem*. 2002 Aug 28;50(18):5042-7.
 13. Munkong N, Thim-Uam A, Pengnet S, Hansakul P, Somparn N, Naowaboot J, et al. Effects of Red Rice Bran Extract on High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Prev Nutr Food Sci*. 2022 Jun 30;27(2):180-7.
 14. Munkong N, Lonan P, Mueangchang W, Yadyookai N, Kanjoo V, Yoosungnoen B. Red Rice Bran Extract Attenuates Adipogenesis and Inflammation on White Adipose Tissues in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Foods*. 2022 Jun 24;11(13):1865.
 15. Saji N, Francis N, Schwarz LJ, Blanchard CL, Santhakumar AB. Rice Bran Phenolic Extracts Modulate Insulin Secretion and Gene Expression Associated with beta-Cell Function. *Nutrients*. 2020 Jun 24;12(6):1889.
 16. Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Redox Homeostasis and Natural Dietary Compounds: Focusing on Antioxidants of Rice (*Oryza sativa* L.). *Nutrients*. 2018 Nov 1;10(11):1605.
 17. Li H, He H, Wang Z, Cai J, Sun B, Wu Q, et al. Rice protein suppresses ROS generation and stimulates antioxidant gene expression via Nrf2 activation in adult rats. *Gene*. 2016 Jul 10;585(2):256-64.
 18. Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF-kappaB pathways in Raw 264.7 macrophages. *Nutr Res Pract*. 2016 Jun;10(3):251-8.