P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2566) หน้า [114-122]

ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงต่อเซลล์มะเร็งตับ

Anti-proliferative and Cytotoxic Effects of Red Jasmine Rice Bran Extract on Hepatocellular Carcinoma

ณัฐวรรณ เถาลิโป้, พินทุสร หาญสกุล*

สาขาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

Nattawan Thaolipo, Pintusorn Hansakul*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 26 January 2023; Received in revised 9 February 2023; Accepted 17 February 2023

บทคัดย่อ

มะเร็งตับเป็นหนึ่งในสาเหตุอันดับต้นๆ ของการเสียชีวิตของประชากรไทย มีรายงานวิจัยก่อนหน้าได้กล่าวถึงบทบาทของกลุ่มสารธรรมชาติที่พบในพืชสมุนไพรและพืชอาหารอย่าง สารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษามะเร็ง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรำของข้าวสีแดงสายพันธุ์ไทยที่ชื่อ หอมมะลิแดง และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ความเป็นพิษที่เฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงด้วย 40% เอทานอลมีสารกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง (>100 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ความเป็นพิษที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 138.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ BNL CL2 ไม่พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมมะลิแดงมีฤทธิ์ความเป็นพิษ ด้วยค่า IC_{50} ที่สูงกว่าคือ 280.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ความเป็นพิษที่เฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นี้มีลักษณะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดและเวลาบ่มสารที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดง; เซลล์มะเร็งตับ; ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์; ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์; ฟีนอลิก; ฟลาโวนอยด์

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** hansakula@yahoo.com

doi: 10.14456/tstj.2023.10

Abstract

Liver cancer is one of the leading causes of Thai mortality. Previous studies have revealed that phenolics and flavonoids naturally found in medicinal herbs and dietary plants play an important role in cancer prevention and treatment. The study aimed to quantify the total phenolic and flavonoid contents in bran extract of a red jasmine rice variety, namely red jasmine, and to assess their anti-proliferative effect on liver cancer cells. The results showed that red jasmine bran extracted with 40% ethanol contained high total contents of phenolics and flavonoids (>100 mg/g extract). In addition, the extract exerted anti-proliferative and cytotoxic effects selectively on the HepG2 liver cancer cell line with an IC_{50} of 138.06 µg/mL. In contrast, this extract was not toxic to the BNL CL2 normal liver cell line with a higher IC_{50} of 280.39 µg/mL. These selective anti-proliferative and cytotoxic effects of red jasmine bran extract on HepG2 cells increased in a dose and time-dependent manner.

Keywords: Red jasmine rice bran extract; Hepatocellular carcinoma; Anti-proliferative effect; Cytotoxic effect; Phenolic; flavonoid

1. บทนำ

ข้อมูลการสำรวจการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ทั่วโลกทั้งสิ้น 36 ชนิดขององค์การอนามัยโลก ในปี พ.ศ. 2563 ระบุว่ามะเร็งตับเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงสุดเป็นอันดับที่ 6 และมีอัตราการตายของผู้ป่วยสูงสุดเป็นอันดับที่ 3 [1] ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของมะเร็งตับและเป็นสาเหตุการตายสูงสุดเป็นอันดับ 1 ของมะเร็งทั้งหมด [2]

โรคมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นจะไม่มีแสดงอาการของโรค แต่จะแสดงอาการในระยะกลางหรือระยะสุดท้าย ซึ่งเซลล์มะเร็งได้ลุกลามและแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย ทำให้ไม่สามารถรักษาให้หายและนำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด [3] ดังนั้น แนวคิดที่จะใช้พืชสมุนไพรและพืชอาหารซึ่งเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในการป้องกันและต้านมะเร็ง ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยเพิ่มมากขึ้น [4] จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยพบว่า สารสกัดจากรำข้าวสี ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการสีข้าว ประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ [5-7]

อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยจำนวนเพียงเล็กน้อยที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าวสีแดงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยก่อนหน้า คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากรำข้าวสีแดงสายพันธุ์ไทยที่ชื่อว่าหอมมะลิแดง ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจ [8] และสามารถป้องกันความเสียหายของเซลล์ตับปกติที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [9] มีรายงานวิจัยว่าภาวะเครียดออกซิเดชั่นนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งตับได้ [10, 11] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในรำข้าวหอมมะลิแดง และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยใช้ Resazurin assay เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ BNL CL2

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดง

นำรำข้าวหอมมะลิแดง จาก อ. ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ปริมาณ 10 กิโลกรัม มาสกัดสารด้วยสารละลายเอทานอล 40% v/v ในน้ำ อัตราส่วนระหว่างรำข้าวและตัวทำละลาย คือ 1:1.5 หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน คนสม่ำเสมอและเก็บสารละลายด้วยผ้าขาวบาง นำกากมาหมักซ้ำด้วย 40% เอทานอล อีก 2 รอบ นำสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ได้ทั้งหมดมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไประเหยเอาแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) หลังจากนั้น นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งต่อ ด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ (vacuum freeze dryer) และเก็บรักษาผงสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดง

2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยการเติมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วจึงเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 525 ไมโครลิตรและ 7.5% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 525 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วบ่มสารที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด)

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงโดยใช้วิธี aluminium chloride colorimetric โดยการเติมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วจึงเติม 5% (w/v) โซเดียมไนเตรท ปริมาตร 75 ไมโครลิตร และ 10% (w/v) อะลูมินัมคลอไรด์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วบ่มสารที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วบ่มสารที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงในรูปมิลลิกรัมสมมูลของคาร์เทชิน (มิลลิกรัมแคทเทคินต่อกรัมของสารสกัด)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ BNL CL2 โดย Resazurin assay

เลี้ยงเซลล์ HepG2 ปริมาณ $1.2x10^6$ เซลล์ ใน 6-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimal Essential Medium (MEM) และเลี้ยงเซลล์ตับปกติ BNL CL2 ปริมาณ $2x10^6$ เซลล์ ใน 6-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลุมควบคุมและเติมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงความเข้มข้น 62.5 125 167 250 และ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในถาดเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเติมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงความเข้มข้น 62.5 125 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ตับปกติ BNL CL2 แล้วบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงทำการดูดเอาสารสกัดออกแล้วเติมสาร resazurin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในทุกหลุม บ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรส

เซนต์ด้วยเครื่องวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ พร้อมทั้งวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ตั้งต้นทั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL2 ในถาดเลี้ยงเซลล์ หลังจากที่เซลล์เกาะกับพื้นถาด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ที่บ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดง ตามสูตรด้านล่างนี้

$$\%\ \text{cell viability} = \frac{(\text{RFU}_{\text{treat}} - \text{RFU}_{\text{day0}})}{(\text{RFU}_{\text{control}} - \text{RFU}_{\text{day0}})} \times 100, \text{RFU}_{\text{treat}} \geq \text{RFU}_{\text{day0}}$$

หรือ

$$\frac{(\text{RFU}_{\text{treat}} - \text{RFU}_{\text{day0}})}{\text{RFU}_{\text{day0}}} \times 100, \text{RFU}_{\text{treat}} < \text{RFU}_{\text{day0}}$$

โดยที่ ; RFU_{treat} คือค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ที่บ่มกับสารสกัด
$RFU_{control}$ คือค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ในหลุมควบคุมที่ไม่ได้บ่มสารสกัด
RFU_{day0} คือค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ตั้งต้นที่ไม่ได้บ่มสารสกัด

2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดย Resazurin assay

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ปริมาณ $1.2x10^6$ เซลล์ ใน 6-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimal Essential Medium (MEM) จำนวน 3 ถาด แล้วใส่ในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลุมควบคุมและเติมสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงความเข้มข้น 62.5 125 167 250 และ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ แล้วแยกบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาของแต่ละถาดจึงเติม สาร resazurin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในทุกหลุมและบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่องวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานการรอดชีวิตของเซลล์ จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL2 โดย Resazurin assay ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (% cell viability)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดง

จากการทดลองพบว่าสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 200.05±7.26 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และมีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 110.00±7.64 มิลลิกรัมแคทเทคินต่อกรัมของสารสกัด ปริมาณสารทั้งสองกลุ่มที่ได้มีค่ามากกว่า 100 มิลลิกรัม

ต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งจัดว่าได้สารสำคัญในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดรำข้าวสี คณะผู้วิจัยพบว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ได้ มีค่าสูงกว่าหรือใกล้เคียงงานวิจัยจำนวนหนึ่ง [12-14]

3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ BNL CL2 โดย Resazurin assay

จากการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์ตับปกติ BNL CL2 หลังบ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดย Resazurin assay พบว่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ในหลุมควบคุมที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัด จะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสาร resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูตามการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Figure 1a) และเมื่อบ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ความเข้มข้น 62.5 125 167 250 และ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่บ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ความเข้มข้นต่ำ จะเกิดการเปลี่ยนสีของ resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูในระดับต่างๆ กัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์บางส่วนยังรอดชีวิต แต่เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่บ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ความเข้มข้นสูงระดับ 167 250 และ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นการเปลี่ยนสีน้ำเงินของ resazurin เป็นสีม่วงหรือไม่พบการเปลี่ยนสีน้ำเงินของ resazurin เลย แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงมากและมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น (Figure 1a) และเมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (Table 1) พบว่าสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มีค่าติดลบ) ซึ่งผลการทดลองนี้เกิดขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เพิ่มขึ้น

Table 1 The anti-proliferative and cytotoxic effects of red jasmine rice bran extract on HepG2 liver cancer cell line and BNL CL2 normal liver cell line.

	The percentages of viable cells (mean ± SD)	
Red jasmine rice bran extract concentrations (µg/mL)	HepG2 liver cancer cell line	BNL CL2 normal liver cell line
0	100 ± 0.00	100 ± 0.00
62.5	86.25 ± 4.50	89.90 ± 3.84
125	63.61 ± 6.23	77.39 ± 9.30
167	15.70 ± 4.09	-
250	-27.22 ± 6.62	54.60 ± 5.61
375	-57.52 ± 8.53	-
500	-	39.07 ±3.16

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในเซลล์ตับปกติ BNL CL2 (Figure 1b) หลังบ่มด้วยสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ความเข้มข้น 62.5 125 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ตับปกติ BNL CL2 ลดลงตามตามความเข้มข้นของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความเข้มข้นของสารสกัดนี้ที่ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ติดลบ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ตับปกติ BNL CL2 แต่ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับปกติ

การคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) พบว่าในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 สารสกัดข้าวหอมมะลิแดงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 138.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในเซลล์ตับปกติ BNL CL2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 280.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าเซลล์ตับปกติมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด ซึ่งเป็นสิ่งที่พบได้ และไม่พบว่ามีการตายของเซลล์ตับปกติ เมื่อคำนวณค่าความจำเพาะของสารสกัดที่มีต่อเซลล์มะเร็งตับเทียบกับเซลล์ตับปกติ (selectivity) พบว่าสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากกว่าเซลล์ตับปกติ BNL CL2 ถึง 2.03 เท่า แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับอย่างจำเพาะ

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดย Resazurin assay

จากผลการทดลองก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่า สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีความจำเพาะต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หลังจากบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างการออกฤทธิ์กับเวลาที่บ่มเซลล์ พบว่าในหลุมควบคุมของทั้ง 3 เวลามีการเปลี่ยนสีของ resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูที่เข้มขึ้นตามเวลาและปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นที่ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีน้ำเงินของ resazurin เป็นสีม่วง แสดงให้เห็นการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ลดลง แต่ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Table 2, Figure 2a) ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ลดลงตามตามความเข้มข้นของสารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงที่ใช้เพิ่มขึ้นในลักษณะที่คล้ายกับ 24 ชั่วโมง แต่พบการเปลี่ยนสีของ resazurin เป็นสีม่วง ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด แสดงให้เห็นเซลล์รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และที่ความเข้มข้นสูงสุด 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดการตายของเซลล์ ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนสีน้ำเงินของ resazurin (Table 2, Figure 2b) ที่ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ ของสารสกัด (ยกเว้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของลดลงมากขึ้น สังเกตจากสีของ resazurin เริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วง และความเข้มข้นที่ 250 และ 375 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัด จะไม่พบการเปลี่ยนสีน้ำเงินของ resazurin เลย แสดงให้เห็นว่ามีการตายของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (Table 2, Figure 2c) ค่า IC_{50} ของสารสกัดที่เวลาบ่ม 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 262.14, 223.24 และ 138.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เพิ่มขึ้น

สารสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงมีสารสำคัญคือ สารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีโครงสร้าง

Table 2 The anti-proliferative and cytotoxic effects of red jasmine rice bran extract on HepG2 liver cancer cell line at 24, 48, and 72 h.

	The percentages of viable cells (mean ± SD)		
Red jasmine rice bran extract concentrations (µg/mL)	24 h	48 h	72 h
0	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
62.5	89.64 ± 2.53	88.58 ± 2.58	86.25 ± 4.50
125	84.50 ± 5.93	84.43 ± 3.01	63.61 ± 6.23
167	81.43 ± 3.83	78.52 ± 4.34	15.70 ± 4.09
250	54.03 ± 2.91	33.58 ± 6.38	-27.22 ± 6.62
375	25.89 ± 2.72	-18.92 ± 1.39	-57.52 ± 8.53

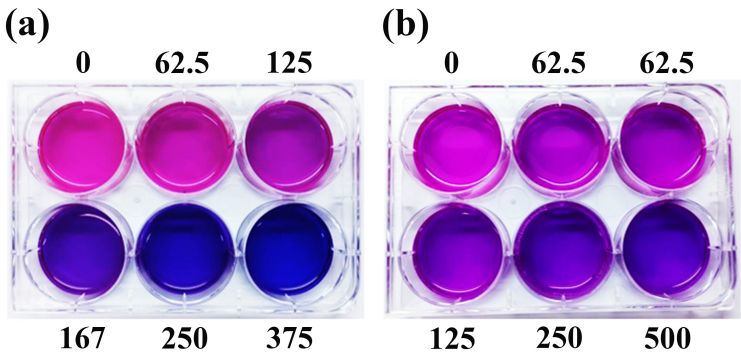

Figure 1 The anti-proliferative and cytotoxic effects of red jasmine rice bran extract (µg/mL) on HepG2 liver cancer cell line (a) and BNL CL2 normal cell line (b) using the resazurin assay.

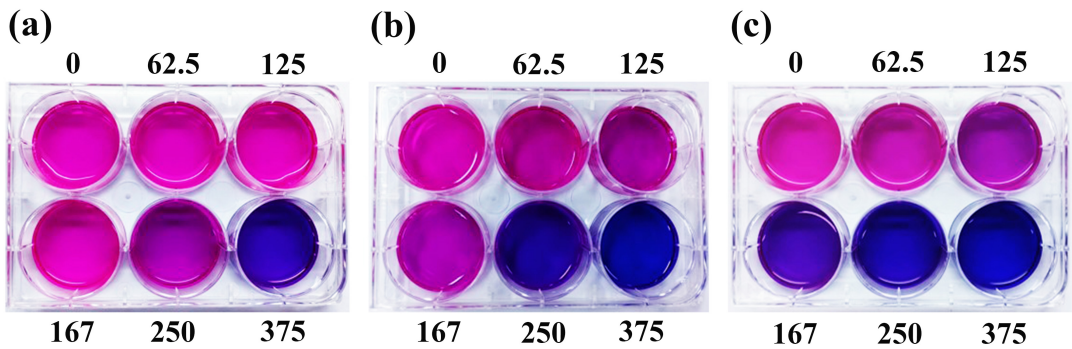

Figure 2 The anti-proliferative and cytotoxic effects of red jasmine rice bran extract (µg/mL) on HepG2 liver cancer cell line at 24 (a), 48 (b), and 72 h (c) using the resazurin assay.

สารในการต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง คือวงอะโรมาติกและหมู่ไฮดรอกซิล โดยกลไกระดับโมเลกุลต่างๆ เช่น การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ผ่านการลดลงของ mitochondrial membrane potential การยับยั้ง mutant p53 protein [15,16] และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนซลล์มะเร็ง ผ่านวิถีการส่งสัญญาณต่างๆ เช่น วิถี RAS RAF mTOR MAPK Pl3K และไทโรซีนไคเนส [16-18] นอกจากนี้ พบว่าจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีผลต่อการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นผ่านกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ภาวะเครียดออกซิเดชั่นเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดเซลล์มะเร็งตับ [10,11,16]

4. สรุป

การสกัดรำข้าวหอมมะลิแดงโดยใช้ 40% เอทานอล ทำให้ได้สารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงที่มีฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ผ่านกลไกอื่นๆ ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากกองทุนวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

6. References

[1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.

[2] World Health Organization, Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality in Thailand, Available Source: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/764-thailand-fact-sheets.pdf, February 18, 2021.

[3] Daher, S., Massarwa, M., Benson, A. A., & Khoury, T., 2018, Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. J Clin Transl Hepatol, 6(1), 69-78.

[4] Upadhyay, R., 2018, Plant pigments as dietary anticancer agents. International Journal of Green Pharmacy, 12.

[5] Samyor, D., Das, A. B., & Deka, S. C., 2017, Pigmented rice a potential source of bioactive compounds: a review. International Journal of Food Science & Technology, 52(5), 1073-1081.

[6] Tan, B. L., & Norhaizan, M. E., 2017, Scientific Evidence of Rice By-Products for Cancer Prevention: Chemopreventive Properties of Waste Products from Rice Milling on Carcinogenesis *In vitro* and *In vivo*. Biomed Res Int, 2017, 9017902.

[7] Verma, D. K., & Srivastav, P. P., 2020, Bioactive compounds of rice (Oryza sativa L.): Review on paradigm and its potential benefit in human health. Trends in Food Science & Technology, 97, 355-365.

[8] Junmarkho, K., & Hansakul, P., 2019, Thai pigmented rice bran extracts inhibit production of superoxide, nitric oxide radicals and inducible nitric oxide

synthase in cellular models. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 9, 291.

[9] Junmarkho, K., 2019, Anti-oxidant and cellular protective effects of Thai purple and red rice bran extracts against oxidative stress for development of healthy instant powered beverage, Master Thesis, Thammasat University, Prathum Thani, 62 p.

[10] Wang, Z., Li, Z., Ye, Y., Xie, L., & Li, W., 2016, Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. Oxid Med Cell Longev, 2016, 7891574.

[11] Fu, Y., & Chung, F. L., 2018, Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. Hepatoma Res, 4.

[12] Pintha, K., Yodkeeree, S., Pitchakarn, P., & Limtrakul, P., 2014, Anti-invasive activity against cancer cells of phytochemicals in red jasmine rice (Oryza sativa L.). Asian Pac J Cancer Prev, 15(11), 4601-4607.

[13] Baek, J.-A., Chung, N.-J., Choi, K.-C., Hwang, J.-M., & Lee, J.-C., 2015, Hull extracts from pigmented rice exert antioxidant effects associated with total flavonoid contents and induce apoptosis in human cancer cells. Food Science and Biotechnology, 24(1), 241-247.

[14] Chen, M. H., Choi, S. H., Kozukue, N., Kim, H. J., & Friedman, M., 2012, Growth-inhibitory effects of pigmented rice bran extracts and three red bran fractions against human cancer cells: relationships with composition and antioxidative activities. J Agric Food Chem, 60(36), 9151-9161.

[15] Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V., 2016, An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutrition Journal, 15(1), 99.

[16] Kumar, S., & Pandey, A. K., 2013, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal, 2013, 162750.

[17] Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D., 2020, Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. Biomolecules, 10(2).

[18] Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., & Büsselberg, D., 2018, Flavonoids in Cancer and Apoptosis. Cancers (Basel), 11(1).