

ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของน้ำมันรำข้าวต่อเซลล์มะเร็งตับ Antiproliferative Effect of Rice Bran Oil to Liver Cancer Cells

ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์,¹ รุ่งตะวัน สุภาพพล,² วรอนงค์ พฤกษากิจ,¹ พรรณนารี ชัยวิชิต¹

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวและสาร gamma-oryzanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับเป็นเวลา 1, 4 และ 7 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวจาก 2 แหล่ง ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 - 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่แปรตามขนาดและเวลาที่เพิ่มขึ้นด้วยค่าความเข้มข้น IC_{50} 0.274 $\pm$ 0.004 และ 0.127 $\pm$ 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 7 วัน โดยไม่สามารถกำหนดค่า IC_{50} ที่เวลา 1 และ 4 วัน ได้เนื่องจากผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวจาก 2 แหล่ง ที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้มากกว่า 50 % สันนิษฐานว่าน้ำมันรำข้าวอาจไม่เฉพาะเจาะจงต่อมะเร็งตับ หรือไม่ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งในทางตรง อาจออกฤทธิ์ทางอ้อมผ่านทางการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ขณะที่ gamma-oryzanol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้แม้ว่าจะใช้ขนาดความเข้มข้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวถึง 10 เท่า และให้เวลาเซลล์มะเร็งตับสัมผัสกับสาร gamma-oryzanol นานถึง 7 วัน ก็ยังไม่สามารถระบุค่า IC_{50} ได้ อาจเนื่องมาจากการที่ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวเป็นสารสกัดหยาบจึงมีสารช่วยการออกฤทธิ์ของ gamma-oryzanol ร่วมอยู่ด้วย หรือสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวไม่ใช่ gamma-oryzanol

คำสำคัญ : น้ำมันรำข้าว

Abstract

Two commercial rice bran oil at the concentration range of 0 - 0.6 mg/ml were studied for 1, 4 and 7 days. It was found that rice bran oil from 2 sources can significantly inhibit growth rate of liver cancer cells with dose - and time-dependent manner. IC_{50} of 1 and 4 day exposure were not assessed due to the lower growth rate than 50 % while IC_{50} of 7 days were 0.274 $\pm$ 0.004 and 0.127 $\pm$ 0.006 mg/ml. It might be possible that rice bran oil contains indirect effect, antimetastasis, or non-specificity

¹ อาจารย์ประจำ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย เบอร์โทรศัพท์ 02-577-1028-31 ต่อ 373

² อาจารย์ประจำ, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โทรศัพท์ 02-260-2112 ต่อ 4702, 4703

to liver cancer. The growth inhibition of ten times higher concentration of gamma-oryzanol compared to rice bran oil for 7 day exposure was lower than 50 %, IC_{50} was unable to be determined. Gamma-oryzanol may not be the active content in rice bran oil or some ingredients in rice bran oil might function as a co-factor or catalytic agent for gamma-oryzanol.

Keywords : Rice bran oil, anticancer, proliferation assay, inhibition concentration

ความนำ

น้ำมันรำข้าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากจมูกข้าว ประกอบด้วยสารสำคัญหลายกลุ่ม น้ำมันรำข้าวมีลักษณะเป็น phytonutrient ประกอบไปด้วย gamma oryzanol, tocopherol, กรดไขมันจำเป็นคือ omega-3 และ omega-6, phytosterol, ceramide, melatonin, beta-carotene, วิตามินเอ บีรวม วิตามินอี และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม แมงกานีส เหล็ก เซเลเนียม สังกะสี และโปรตีนอีกหลายชนิด (Jariwalla, R.J., 2001; Rogers, E.J., 1993)

ประโยชน์หรือคุณค่าที่น้ำมันรำข้าวถูกกล่าวถึงมาก ก็คือการรักษาเบาหวาน ไต มะเร็ง และฟื้นฟูสมรรถภาพของร่างกาย โดยเฉพาะการลดไขมันในหลอดเลือด (Sugano M, Koba K, Tsuji E., 1999; Sen CK, Khanna S, Roy S., 2007; Sugano M, 1996; Raghuram TC, Rukmini C., 1995; Prakash J., 1996; Rukmini C, Raghuram TC., 1991) ระยะหลังมีรายงานทางวิทยาศาสตร์กล่าวถึงความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันที่คาดว่าเนื่องมาจากสารในกลุ่ม phenolic, flavonoid, gamma-oryzanol, tocopherol, tocotrienol เป็นต้น (Juliano C, Cossu MI, Alamanni MC, Piu, L., 2005; Chatchawan Chotimarkorn, Soottawat Benjakul, Nattiga Silalai, 2008; Chitropas P, Priprem A, Siri B, Khamlert C, Sripanidkulchai B., 2004; Minhajuddin M, Beg ZH, Iqbal J., 2005) รวมทั้งสามารถลดไขมันหรือคอเลสเตอรอลในหลอดเลือดตั้งแต่ระดับสัตว์ทดลองขนาดเล็ก

หนู กระต่าย และแฮมสเตอร์ ไปจนถึงมนุษย์ สันนิษฐานว่าฤทธิ์ของน้ำมันรำข้าวน่าจะมาจากสารสำคัญ gamma-oryzanol และ tocotrienols (Cicero AFG and Gaddi A., 2001; Sugano M and Tsuji E., 1997; Berger, A., Rein, D., Schäfer A, Monnard, I., Gremaud, G., Lambelet, P. and Bertoli, C., 2005; Most MM, Tulley R, Morales S, and Lefevre M., 2005; Ha TY, Han S, Kim SR, Kim IH, Lee HY, Kim HK., 2005; Miura D, Ito, Y., Aya, M, Kise, M., Ato, H, Yagaski, K., 2006; Ausman, L. M, Rong N, Nicolosi, R. J., 2005) การผสมน้ำมันรำข้าวกับน้ำมันดอกคำฝอยจะยิ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดไขมันในหลอดเลือด (Malve H, Kerkar P, Mishra N, Loke S, Rege NN, Marwaha-Jaspal A, Jainani KJ., 2010) การผสมกับน้ำมันปาล์มก็ให้ผลลดไขมันได้ดีเช่นกัน (Utarwuthipong T, Komindr S, Pakpeankitvatana V, Songchitsomboon S, Thongmuang N., 2009) Cheng และคณะได้รายงานผลของน้ำมันรำข้าวที่ช่วยลดไขมันในหลอดเลือดของหนูทดลองพร้อมกับเพิ่มความไวต่ออินซูลินได้อีกด้วย (Cheng HH, Ma CY, Chou TW, Chen YY, Lai MH., 2010) นับเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งที่มีแนวโน้มจะนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาโรคเบาหวานได้ แต่ที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นก็คือ Iqbal และคณะ รายงานไว้ว่าน้ำมัน รำข้าวมีฤทธิ์ลดไขมันไปพร้อมกับสามารถต้านมะเร็งได้ด้วยการยับยั้งกระบวนการ carcinogenesis ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็ง

(carcinogen) ชนิดต่าง ๆ (Iqbal J, Minhajuddin M, Beg ZH., 2003; Iqbal J, Minhajuddin M, Beg ZH., 2003; Xu Z., Godber J.S., 1999)

ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์จากน้ำมันรำข้าวมาใช้เป็นอาหารเสริมกันอย่างแพร่หลายทั้งที่ยังไม่มีหลักฐานการวิจัยทางการแพทย์อย่างแน่ชัด โดยเฉพาะความสามารถในการต้านมะเร็งซึ่งมีหลักฐานน้อยมากจนไม่สามารถยืนยันได้แน่นอนว่ามีฤทธิ์ต้านหรือใช้รักษามะเร็งได้จริง ในขณะที่อุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวในการต้านมะเร็งโดยผ่านทาง การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับซึ่งเป็นมะเร็ง ลำดับต้น ๆ ที่พบมากในประเทศไทย พร้อมกันนี้ได้นำสาร gamma-oryzanol เปรียบเทียบผลกับผลิตภัณฑ์จาก น้ำมันรำข้าวอีกด้วย หากพิสูจน์ในเบื้องต้นได้ว่าผลิตภัณฑ์ จากน้ำมันรำข้าวสามารถต้านมะเร็งได้ก็จะเป็นประโยชน์ ในการใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน รวมทั้งช่วยในเรื่องจาก อุตสาหกรรมการส่งออกของประเทศ

สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมี ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันรำข้าวและ gamma-oryzanol ซื้อจากบริษัทที่เชื่อถือได้ในประเทศไทย มีการวิเคราะห์สารสำคัญและสามารถซื้อเพิ่มได้ในกรณีที่ ต้องทำโครงการวิจัยระยะยาว สารเคมีทั่วไปได้แก่ crystal violet, phosphate buffer saline, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ซื้อจากบริษัท Sigma สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์คือ trypsin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin และ streptomycin ซื้อจาก บริษัท Gibco

เครื่องมือ เครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการเพาะ เลี้ยงเซลล์ เช่น ตู้ปราศจากเชื้อ (laminar airflow hood) และตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator)

มาจากบริษัท NuAire กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จากบริษัท Hollywood เครื่องปั่น เหยือกควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) จาก บริษัท Juan และเครื่อง Elisa plate reader จากบริษัท Bio-Rad

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดย เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชื่อ HT 1080 ให้มีสุขภาพ สมบูรณ์แข็งแรง พร้อมทั้งจะใช้ทดสอบสารต่าง ๆ ได้ หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อครบเวลา ตามต้องการก็ศึกษาเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแล้ว ด้วยการนำมาย้อมสี MTT และ crystal violet ดังขั้นตอน ต่อไปนี้

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ ในโครงการวิจัยนี้ ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10 % fetal bovine serum (FBS) ร่วมกับ penicillin 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกรองให้ ปราศจากเชื้อในตู้ปราศจากเชื้อ ผ่าน membrane ขนาด 0.22 ไมครอน และเก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ. เมื่อต้องการใช้ ก็นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37° ซ. ก่อนเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งตับ มีลักษณะบอบบางและต้องการอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม เพื่อให้เซลล์เติบโตได้เต็มที่ โดยเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มเพาะ เซลล์ที่ 37° ซ. และมีบรรยากาศ 5 % CO₂ จนได้เซลล์ มะเร็งตับที่เจริญเต็มที่ และนำมา subculture สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง ตลอดการวิจัย

3. การทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร็งตับ เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร gamma-oryzanol หรือ ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 มก./มล. เป็นเวลา 1, 4 และ

7 วัน แล้วใช้วิธีหาค่าพิเศษคือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ย้อมสีเซลล์มะเร็งดับ ซึ่งจะให้ผลสีน้ำเงินเข้มภายในเซลล์เฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ต่อจากนั้นละลายผลสีน้ำเงินเข้มออกจากเซลล์ ด้วย DMSO นำน้ำสีน้ำเงินเข้มที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของสีที่จะแปรตามจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยเครื่อง Elisa plate reader นำไปคำนวณเป็น % การยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition percentage) โดยเปรียบเทียบให้หลุมควบคุม (control well) คือหลุมที่ได้มีผลสีจากน้ำมันรำข้าวผสมอยู่ ซึ่งจะมีค่าการอยู่รอดของเซลล์เป็น 100 % และ % inhibition มีค่าเป็นศูนย์ ทั้งนี้เซลล์การศึกษาผลของผลสีจากน้ำมันรำข้าวทุกครั้งจะใช้ยาต้านมะเร็งคือ doxorubicin เป็น positive control ต่อเซลล์มะเร็งดับ

4. การย้อมสีเซลล์มะเร็งดับด้วยสี crystal violet เลี้ยงเซลล์มะเร็งดับในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร gamma-oryzanol หรือผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1, 4 และ 7 วัน เช่นเดียวกับในข้อ 3 หลังจากนั้นย้อมสีเซลล์ด้วย crystal violet ซึ่งจะติดสีออกม่วง ทั้งข้างคั้นให้แห้งสนิท แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูปนับจำนวนเซลล์อย่างน้อย 5 field ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วนำมาทดสอบเชิงปริมาณเช่นเดียวกับ MTT ด้วยการละลาย crystal violet ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง หักค่าการดูดกลืนแสงของ blank ออก นำไปคำนวณเป็น % การมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ (survival percentage) โดยเปรียบเทียบให้หลุมควบคุมคือหลุมที่ได้มีผลสีจากน้ำมันรำข้าวจะมีค่าการอยู่รอดของเซลล์เป็น 100 %

5. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition)

$$\% \text{ inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{sample}}$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม คือหลุมที่ได้มีผลสีจากน้ำมันรำข้าว และ

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของหลุมที่ได้มีผลสีจากน้ำมันรำข้าว

6. การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลทุกส่วนจะต้องผ่านกระบวนการตรวจสอบทางสถิติ โดยวิธี analysis of variances, correlation และ regression analysis ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

Proliferation assay เมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งดับในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวหรือสาร gamma-oryzanol ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1, 4 และ 7 วัน แล้วใช้ cell proliferation assay ชนิดที่เรียกว่า MTT assay คือ นำสี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งจะย้อมเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เนื่องจากเซลล์มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถจะทำการ uptake สารสีนี้เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase จะทำการ reduce สีเหลืองของ MTT ให้กลายเป็นสีม่วงของ formazan และมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นั่นคือ MTT จะย้อมเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ให้เกิดเป็นผลสีม่วงเข้มที่มองเห็นได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ หลังจากนั้นก็จะนำ acidified isopropanol หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) มาละลายผลสีน้ำเงินเข้มออกจากเซลล์ แล้วจึงนำสารละลายน้ำสีม่วงที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่อง Elisa plate reader ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวมาแล้ว ความเข้มข้นของสีจะแปรตามจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การประเมินประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จะใช้ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 % หรือ inhibition concentration ที่ 50 % (IC_{50})

ผลการวิจัยในภาพรวม แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่แปรตามขนาดของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวหรือสาร gamma-oryzanol ที่เพิ่มขึ้นหรือที่เรียกว่า dose-dependent manner คือแปรตามความเข้มข้น และ time-dependent manner คือแปรตามระยะเวลาที่

เซลล์ได้สัมผัสกับสารนารินจิ้น ดังแสดงในภาพ 1 และ 3 จะต่างกันที่ความแรงของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวและสาร gamma-oryzanol ไม่เท่ากัน

Dose-response curve โดยปกติแล้ว dose-response curve ทั่ว ๆ ไปจะใช้ความเข้มข้นช่วงกว้างเป็น 10 เท่า จึงใช้ log concentration เพื่อให้สะดวกต่อการพิจารณาภาพรวมที่จะมีลักษณะเป็น sigmoid curve ที่มองเห็นช่วง steep portion ได้อย่างชัดเจน และหาค่า effective concentration ที่ 50 % ได้ง่าย แต่สำหรับโครงการวิจัยนี้ ค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวหรือสาร gamma-oryzanol ในแกน X ของกราฟภาพ 2 และ 4 ใช้มาตรฐานธรรมดาเนื่องจากช่วงความเข้มข้นที่ใช้แคบมาก สาเหตุที่การวิจัยนี้ใช้ช่วงความเข้มข้นแคบก็เพราะถูกกำหนด (limit) ด้วยความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและความจำกัดของค่าการละลาย (solubility) โดยทุกความเข้มข้นของสารจะมีการละลายดี ไม่มากหรือน้อยจนเกินไป รวมทั้งมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมด้วย

ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวจาก 2 บริษัท ที่มีค่าการละลายไม่แตกต่างกันเท่าใดนัก ผลการศึกษาแสดงไว้ในภาพ 1 และ 2 คือความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับมีค่าใกล้เคียงกันคือหลังจากให้ทดลองให้เซลล์

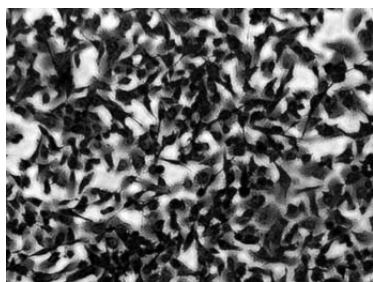
มะเร็งระดับสัมผัสกับผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะพบค่าความเข้มข้น IC_{50} ที่ 0.274 ± 0.004 และ 0.127 ± 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 274 ± 4 และ 127 ± 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่พอจะยอมรับได้ หากทดลองให้เซลล์มะเร็งระดับสัมผัสกับผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวเป็นเวลา 1 หรือ 4 วัน จะยับยั้งการเจริญเติบโตได้ไม่ถึง 50 % หรือเกิน 50 % ไปเพียงเล็กน้อย จึงไม่ควรนำข้อมูลไปใช้หาค่า IC_{50} เพราะมีแนวโน้มที่จะได้ค่า IC_{50} ที่มี accuracy และ precision ต่ำ

สาร gamma-oryzanol การวิจัยในส่วนที่ต้องใช้สาร gamma-oryzanol มีประเด็นที่น่าสนใจและข้อสังเกตที่ควรนำมาพิจารณา 2 ประการ คือ

1. งานวิจัยนี้ใช้สาร gamma-oryzanol จาก 2 บริษัท ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและค่าการละลายแตกต่างกันคือ 0-2 และ 0-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

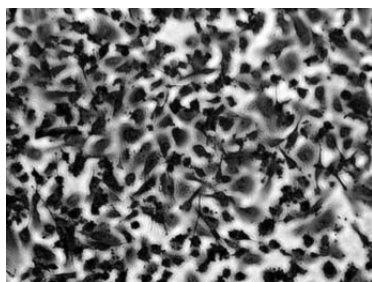
2. ความสามารถของสาร gamma-oryzanol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับแม้ว่าจะใช้ขนาดความเข้มข้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวถึง 10 เท่า (คือ ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวใช้ความเข้มข้นสูงสุด 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร gamma-oryzanol ใช้ความเข้มข้นสูงสุด 2 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และให้เวลาเซลล์มะเร็งระดับสัมผัสกับสาร gamma-oryzanol นานถึง 7 วัน ก็ยังไม่สามารถระบุค่า IC_{50} ได้

1 วัน



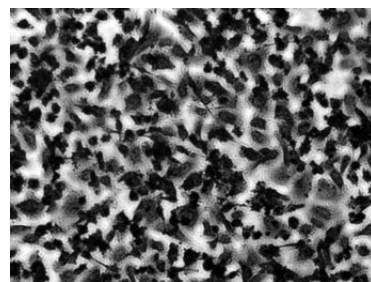
ภาพ 1.01

4 วัน



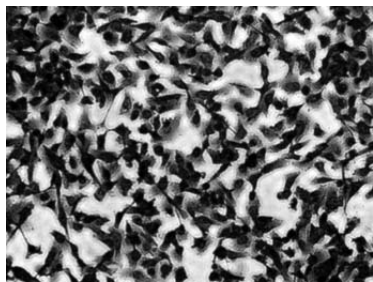
ภาพ 1.08

7 วัน

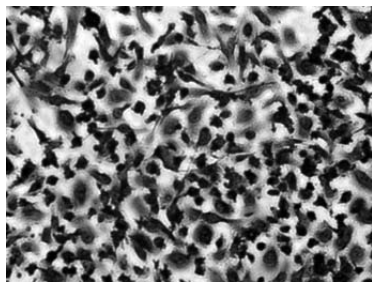


ภาพ 1.15

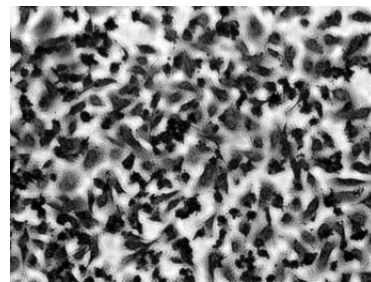
(กลุ่มควบคุม ; ผลัดภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 1.02

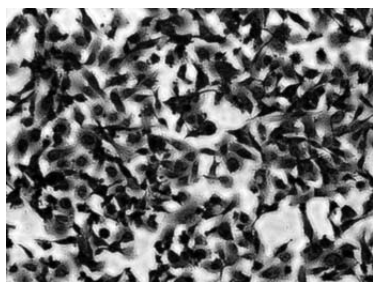


ภาพ 1.09

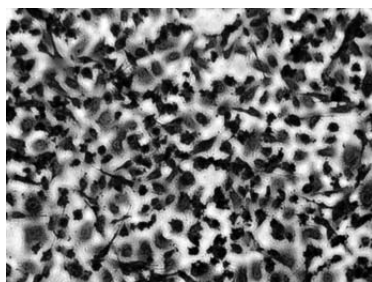


ภาพ 1.16

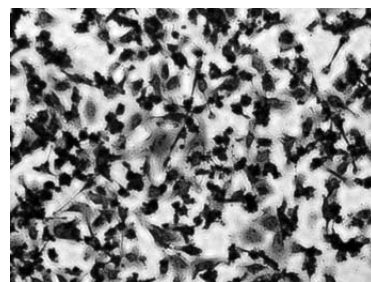
(ผลัดภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 1.03

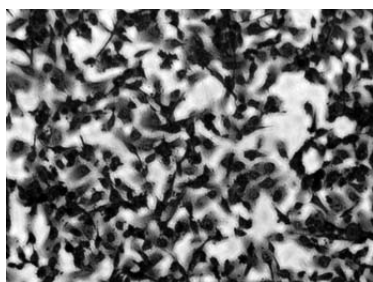


ภาพ 1.10



ภาพ 1.17

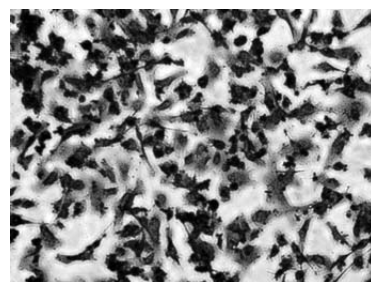
(ผลัดภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 1.04

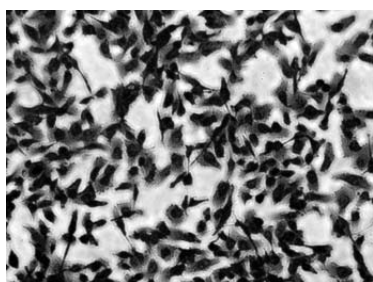


ภาพ 1.11

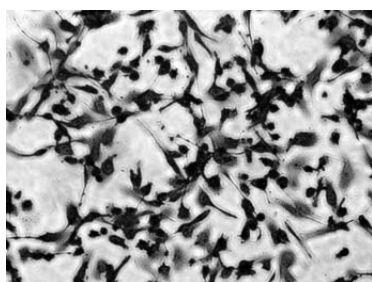


ภาพ 1.18

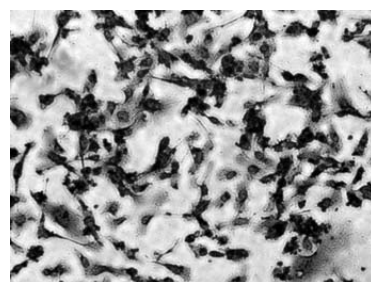
(ผลัดภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 1.05



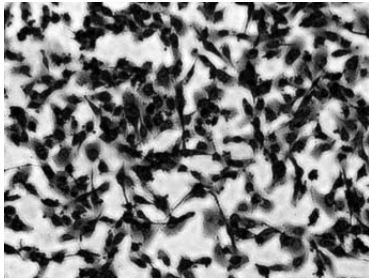
ภาพ 1.12



ภาพ 1.19

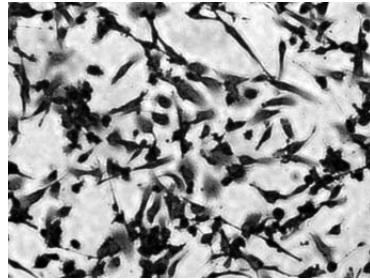
(ผลัดภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

1 วัน



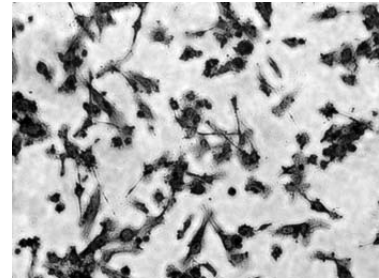
ภาพ 1.06

4 วัน



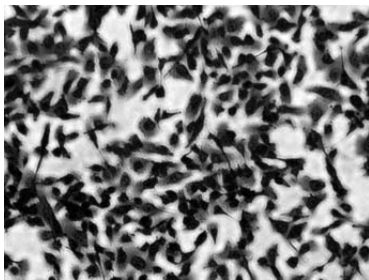
ภาพ 1.13

7 วัน



ภาพ 1.20

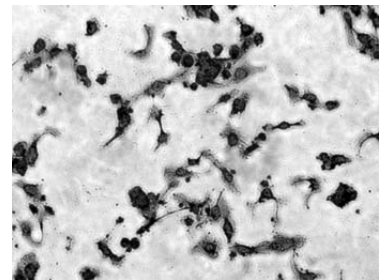
(ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 1.07



ภาพ 1.14

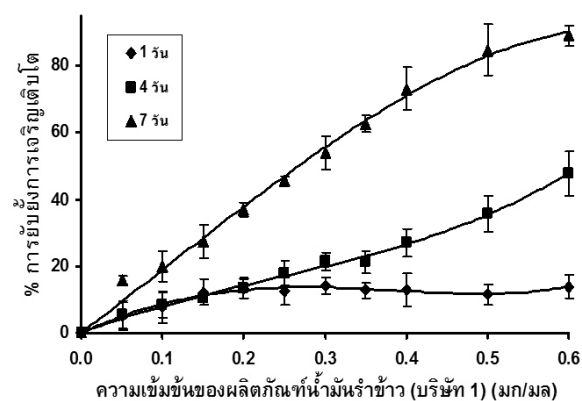


ภาพ 1.21

(ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

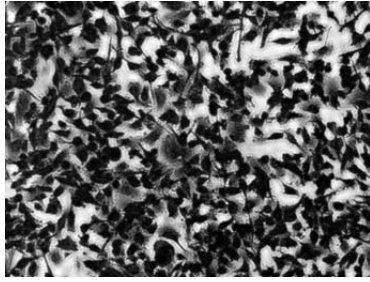
ฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งตับของ

ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1)



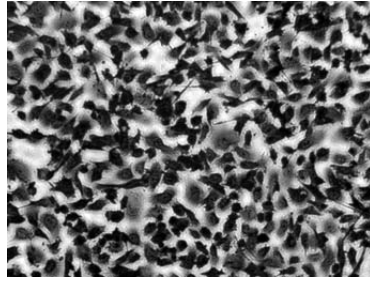
ภาพ 2 กราฟเปรียบเทียบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว (บริษัท 1) ความเข้มข้น 0 - 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์มะเร็งตับ (n = 3) ที่เวลา 1, 4 และ 7 วัน โดยมีค่าความเข้มข้น IC_{50} 274 $\pm$ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 7 วัน

1 วัน



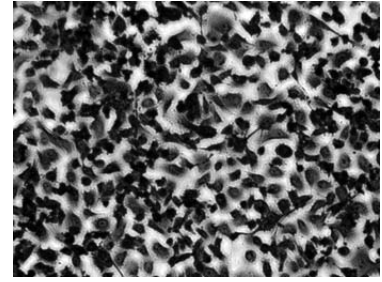
ภาพ 3.01

4 วัน



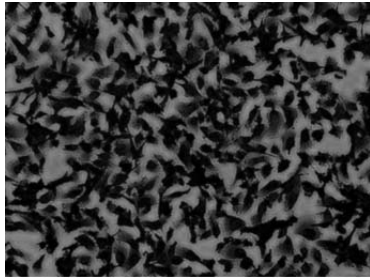
ภาพ 3.07

7 วัน

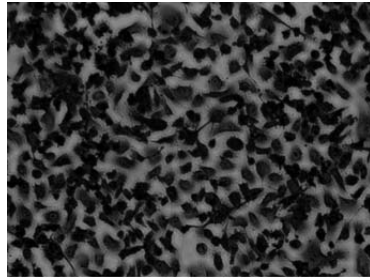


ภาพ 3.13

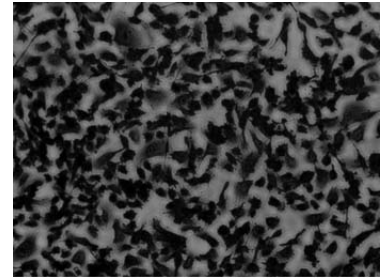
(กลุ่มควบคุม ; gamma-oryzanol (บริษั 1) 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 3.02

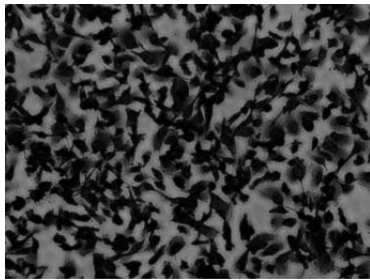


ภาพ 3.08

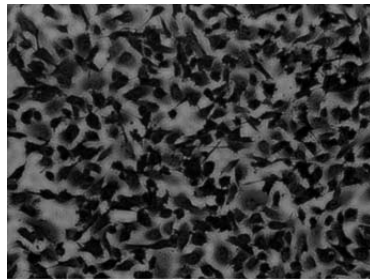


ภาพ 3.14

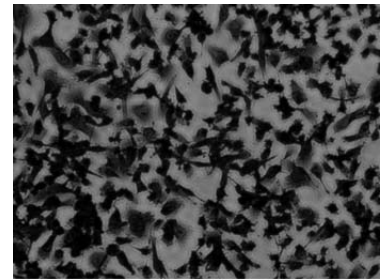
(gamma-oryzanol (บริษั 1) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 3.03

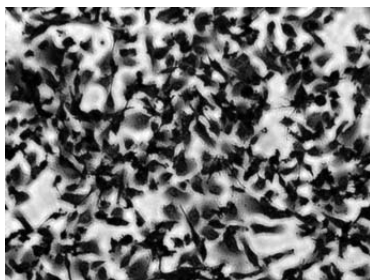


ภาพ 3.09

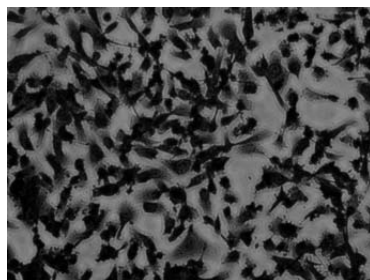


ภาพ 3.15

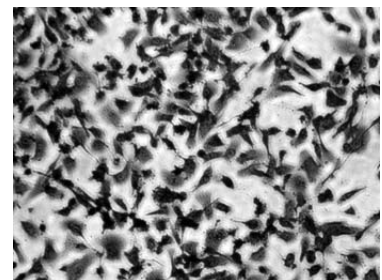
(gamma-oryzanol (บริษั 1) 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 3.04



ภาพ 3.10

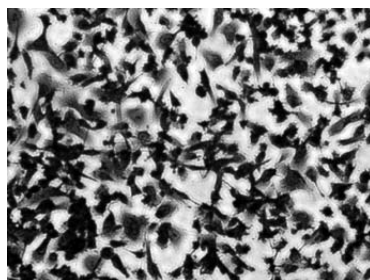


ภาพ 3.16

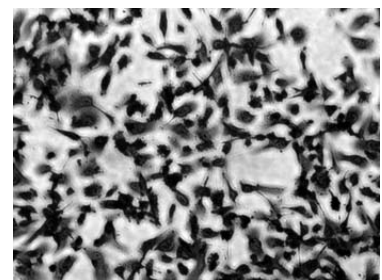
(gamma-oryzanol (บริษั 1) 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 3.05

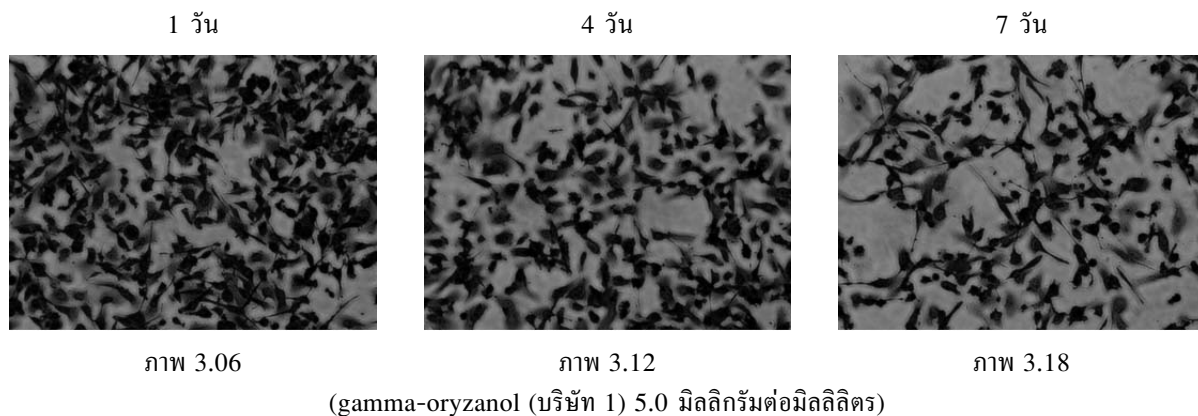


ภาพ 3.11



ภาพ 3.17

(gamma-oryzanol (บริษั 1) 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพ 3 แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็งตับคนในภาวะต่าง ๆ ที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1)

ณ เวลาที่เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 1 วัน

ภาพ 3.01 เซลล์มะเร็งตับคนภาวะควบคุม ไม่ได้ได้รับ gamma-oryzanol เลย

ภาพ 3.02 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.03 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.04 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.05 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.06 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ณ เวลาที่เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 4 วัน

ภาพ 3.07 เซลล์มะเร็งตับคนภาวะควบคุม ไม่ได้ได้รับ gamma-oryzanol เลย

ภาพ 3.08 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.09 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.10 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.11 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.12 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ณ เวลาที่เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ภาพ 3.13 เซลล์มะเร็งตับคนภาวะควบคุม ไม่ได้ได้รับ gamma-oryzanol เลย

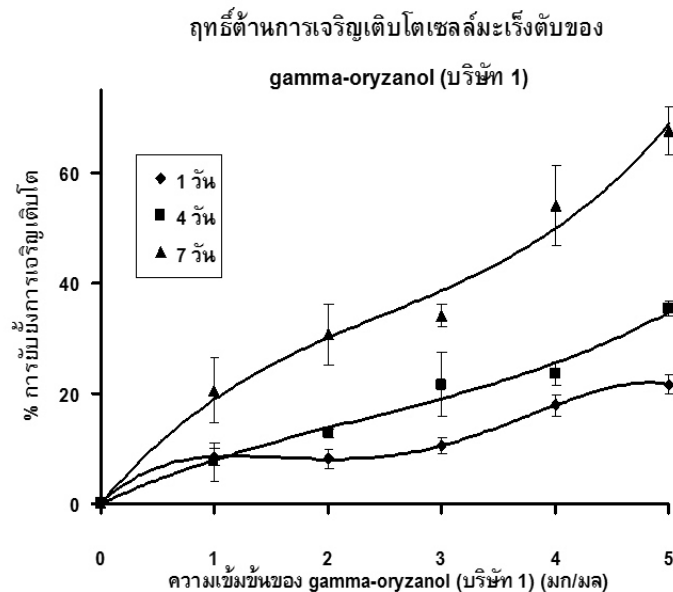
ภาพ 3.14 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.15 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.16 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.17 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพ 3.18 เซลล์มะเร็งตับคนที่ได้รับ gamma-oryzanol (บริษัท 1) 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพ 4 กราฟเปรียบเทียบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของสาร gamma-oryzanol (บริษัท 1) ความเข้มข้น 0 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์มะเร็งระดับ (n = 3) ที่เวลา 1, 4 และ 7 วัน

การอภิปรายผลและสรุปผล

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับจะเห็นได้ว่า ผลลัพธ์ที่น้ำมันรำข้าวและ gamma-oryzanol มีประเด็นสำคัญที่ควรพิจารณาสำคัญ 3 ประการ คือ

1. ผลลัพธ์ที่น้ำมันรำข้าวและ gamma-oryzanol อาจไม่มีฤทธิ์โดยตรง (direct effect) ในการเป็นพิษ (cytotoxic effect) ต่อเซลล์มะเร็งระดับ โดยเฉพาะสาร gamma-oryzanol ที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้แม้ว่าจะให้เซลล์มะเร็งระดับสัมผัสกับสาร gamma-oryzanol เป็นเวลานานถึง 7 วัน ก็ตาม สันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากสาเหตุบางประการ เช่น

- สารบางชนิดมีกลไกหรือรูปแบบการทำงานที่แตกต่างกันออกไป เช่น สารบางชนิดต้องถูก enzyme ในตับเปลี่ยนไปเป็นสาร active metabolite เสียก่อนจึงจะทำงานได้ สารบางชนิดต้องทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันหรือต้องถูกเร่งด้วยระบบภูมิคุ้มกันก่อนจึงจะออกฤทธิ์ได้

- สารบางชนิดมีกลไกการต้านมะเร็งที่แตกต่างกันออกไป เช่น สารบางชนิดไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรงหรืออาจต้องใช้ขนาด (dose) สูง แต่มีฤทธิ์ด้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง หรืออีกตัวอย่างที่นับเป็นข่าวดีสำหรับผู้ป่วยมะเร็งก็คือ วงการแพทย์อาจสามารถรักษามะเร็งได้ในระยะ 10 ปี หรือไม่เกิน 15 ปี ข้างหน้านี้ด้วยยาที่มีฤทธิ์ด้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ (antiangiogenic agent) ที่จะไม่ทำลายเซลล์มะเร็ง จึงไม่มีฤทธิ์ข้างเคียงต่อระบบภูมิคุ้มกัน ไ้กระดูก พร่อง ดังที่พบในการบำบัดด้วย chemotherapy ทั่ว ๆ ไป แต่จะมีกลไกที่ยังมีให้หลอดเลือดใหม่ออกไปหาก่อนเนื้อมะเร็ง กลุ่มเซลล์มะเร็งจึงไม่สามารถขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นได้เพราะขาดสารอาหารและมีการสะสมของเสียไว้ในเซลล์เป็นจำนวนมาก ปัจจุบันยากกลุ่มนี้ได้ผ่านเข้าสู่การวิจัยระดับคลินิก (clinical trial) ระยะ (phase) 2-3 แล้ว

2. ผลลัพธ์ที่น้ำมันรำข้าวและ gamma-oryzanol อาจไม่มีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งระดับเท่าใดนัก

ตัวอย่างเช่นนี้สามารถพบได้ในยาปฏิชีวนะที่แต่ละชนิดจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยาด้านมะเร็งในปัจจุบันบางตัวก็มีความเฉพาะเจาะจงต่อมะเร็งบางชนิดเท่านั้น

3. ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวมีความแรงในการทำละลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่สูงกว่า gamma-oryzanol ก็อาจเนื่องมาจากการที่ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวมีลักษณะและคุณสมบัติเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จึงมีสารต่าง ๆ หลายชนิดที่สามารถ

ทำหน้าที่เป็น co-factor ช่วยการทำงานของ gamma-oryzanol ได้ ขณะที่สาร gamma-oryzanol บริสุทธิ์ไม่มีสารช่วยอื่นใดมาเร่งการทำงานได้

อย่างไรก็ตาม ก็พอจะกล่าวในเบื้องต้นได้ว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวน่าจะมีกลไกบางอย่างในการต้านเซลล์มะเร็งได้บ้าง โดยอาจต้องทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น หรือทดสอบการต้านมะเร็งกลไกอื่น เช่น การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์มะเร็งบางชนิด การต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Ausman, L. M, Rong, N., & Nicolosi, R. J. (2005). Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem*, 16(9): 521-9.
- Berger, A., Rein, D., Schäfer, A., Monnard, I., Gremaud, G., Lambelet, P., & Bertoli, C. (2005). Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *Eur J Nutr*, 44(3), 163-73.
- Chatchawan Chotimarkorn, Soottawat Benjakul, & Nattiga Silalai. (2008). Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food Chem*, 111, 636-41.
- Cheng, H. H., Ma, C. Y., Chou, T. W., Chen, Y. Y., & Lai, M. H. (2010). Gamma-oryzanol ameliorates insulin resistance and hyperlipidemia in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Int J Vitam Nutr Res*, 80(1), 45-53.
- Chitropas, P., Pripem, A., Siri, B., Khamlert, C., & Sripanidkulchai, B. (2004). Factor affecting antioxidation and gamma-oryzanol in developed Hom Dok Mali 105 rice bran tablets. *KKU Res J*, 9(2), 59-67.
- Cicero, A. F. G., & Gaddi, A. (2001). Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytother Res*, 15, 277-89.
- Ha, T. Y., Han, S., Kim, S. R., Kim, I. H., Lee, H. Y., & Kim, H. K. (2005). Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr Res*, 25, 597-606.
- Iqbal, J., Minhajuddin, M., & Beg, Z. H. (2003). Suppression of 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil. *Eur J Cancer Prev*, 12(6), 447-53.

- Jariwalla, R. J. (2001). Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res*, 27(1), 17-26.
- Juliano, C., Cossu, M. I., Alamanni, M. C., & Piu, L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidation stability of pharmaceutical oils. *Int J Pharm*, 299, 146-154.
- Malve, H., Kerkar, P., Mishra, N., Loke, S., Rege, N. N., Marwaha-Jaspal, A., & Jainani, K. J. (2010). LDL-cholesterol lowering activity of a blend of rice bran oil and safflower oil (8:2) in patients with hyperlipidaemia: a proof of concept, double blind, controlled, randomised parallel group study. *J Indian Med Assoc*, 108(11), 785-8.
- Minhajuddin, M., Beg, Z. H., Iqbal, J. (2005). Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol*, 43(5), 747-53.
- Miura, D., Ito, Y., Aya, M., Kise, M., Ato, H., & Yagaski, K. (2006). Hypocholesterolemic action of pregerminated brown rice in hepatoma-bearing rats. *Life Sci*, 79, 259-64.
- Most, M. M., Tulley, R., Morales, S., & Lefevre, M. (2005). Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 64-8.
- Prakash, J. (1996). Rice bran proteins: properties and food uses. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 36(6), 537-52.
- Raghuram, T. C., & Rukmini, C. (1995). Nutritional significance of rice bran oil. *Indian J Med Res*, 102, 241-4.
- Rogers, E. J., Rice, S. M., Nicolosi, R. J., Carpenter, D. R., McClelland, C. A., & Romanczyk, L. J. (1993). Identification gamma-oryzanol and quantitation of components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *J Am Oil Chem Soc*, 70(3), 301-7.
- Rukmini, C., & Raghuram, T. C. (1991). Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J Am Coll Nutr*, 10(6), 593-601.
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2007). Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. *Mol Asp Med*, 28, 692-728.
- Sugano, M., & Tsuji, E. (1996). Rice bran oil and human health. *Biomed Environ Sci*, 9(2-3), 242-6.
- Sugano, M., & Tsuji, E. (1997). Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J Nutr*, 127(3), 521S-524S.
- Sugano, M., Koba, K., & Tsuji, E. (1999). Health benefits of rice bran oil. *Anticancer Res*, 19(5A), 3651-7.
- Utarwuthipong, T., Komindr, S., Pakpeankitvatana, V., Songchitsomboon, S., Thongmuang, N. (2009). Small dense low-density lipoprotein concentration and oxidative susceptibility changes after consumption of soybean oil, rice bran oil, palm oil and mixed rice bran/palm oil in hypercholesterolaemic women. *J Int Med Res*, 37(1), 96-104.
- Xu, Z., & Godber, J. S. (1999). Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran oil. *J Agri Food Chem*. 47, 2724-8.